

Transkriptionsfaktor AP-2 γ in der Entwicklung des Trophektooderms

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

vorgelegt von Sandra Buhl
aus Rhede (Ems)
im Dezember 2007

1. Referent: Prof. Dr. H. Schorle
2. Referent: Prof. Dr. K. Willecke

Transkriptionsfaktor AP-2 γ in der Entwicklung des Trophektooderms

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

vorgelegt von Sandra Buhl
aus Rhede (Ems)
im Dezember 2007

1. Referent: Prof. Dr. H. Schorle
2. Referent: Prof. Dr. K. Willecke

Tag der Promotionsprüfung: 11. April 2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.
Erscheinungsjahr 2008

Erklärung zur Urheberschaft

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

Sandra Buhl, im Dezember 2007

Danksagung

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

Außerdem danke ich Prof. Klaus Willecke für die Übernahme des Koreferats.

Ich möchte Prof. Dieter Fürst und Prof. Oliver Brüstle für die Bereitschaft danken, als Mitglieder meiner Prüfungskommission zu fungieren.

Danken möchte ich allen Kollegen und Kolleginnen für ihre großen und kleinen Hilfen im Laboralltag.

Großer Dank geht auch an meine Eltern und Geschwister, ihr Interesse und die Unterstützung war großartig.

Ich bedanke mich bei all meinen Freunden für ihre uneingeschränkte Unterstützung, besonders bei meinem Freund Michael Becker.

Zusammenfassung

Die erste differenzierte Zelllinie, die beim Säugerembryo noch vor dessen Implantation mit der Bildung der Blastozyste einhergeht, ist das Trophektoderm. Die molekularen Mechanismen und die transkriptionelle Regulation durch zelllinienspezifische Faktoren, die diese erste Differenzierung aus den Blastomeren der Morula herbeiführen, sind bisher nur wenig untersucht und bekannt. Ein Gen, das während dieses frühen Entwicklungsstadiums exprimiert wird, ist der Transkriptionsfaktor AP-2 γ . AP-2 γ kann im Morulastadium detektiert werden und ist ab dem Blastozystenstadium an Tag 3,5 der Embryonalentwicklung auf die trophektodermale Linie beschränkt. Die Expression bleibt während der weiteren Plazentaentwicklung in allen trophektodermalen Linien bestehen. AP-2 γ defiziente Mäuse sterben nach der Implantation an Tag 7,5 der Embryogenese aufgrund von Defekten bei der Plazentaentwicklung, der Embryo ist kaum implantiert und stirbt an Mangelernährung. Diese Tatsache spiegelt die bedeutende Rolle von AP-2 γ während der frühen Embryogenese wider.

In meiner Dissertation wurde die Funktion von AP-2 γ in der Trophektodermentwicklung näher untersucht, dazu wurden zuerst murine Trophoblaststammzellkulturen etabliert. Expressionsanalysen aller AP-2 Gene zeigten, dass hauptsächlich AP-2 γ in der trophektodermalen Linie exprimiert wird, was auf eine wichtige Funktion in dieser Zelllinie hinweist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AP-2 γ für die Etablierung und für die Erhaltung von Trophoblast-Stammzellen essentiell ist.

AP-2 γ spielt, wie der Transkriptionsfaktor Cdx2, eine Schlüsselrolle in der Determinierung der trophektodermalen Zelllinie im Blastozystenstadium. Um dieses zu analysieren wurde AP-2 γ in embryonalen Stammzellen überexprimiert; hierbei konnte zuerst eine morphologische Veränderung der ES-Zellen beobachtet werden. In Expressionsanalysen konnten trophektodermale Marker, wie Eomes, Cdx2 und Hand1 nachgewiesen werden, dieses ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die ES-Zellen durch Überexpression von AP-2 γ zu TS-Zellen differenziert sind. Die Teilnahme der durch Überexpression von AP-2 γ erzeugten TS-Zellen an der Plazenta verdeutlicht, dass funktionale Trophoblast-Stammzellen durch Induktion von AP-2 γ entstanden sind. Analysen der Wechselwirkungen von AP-2 γ in dieser Arbeit weisen darauf hin, dass AP-2 γ von Cdx2 aktiviert werden konnte und das AP-2 γ das Pluripotenzgen Nanog reprimiert. Am Ende dieser Arbeit wird ein Modell diskutiert, in dem AP-2 γ in das regulatorische Netzwerk der Transkriptionsfaktoren zur Kontrolle der Erhaltung und Differenzierung von Stammzellen integriert wird.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung der Urheberschaft	II
Danksagung	III
Zusammenfassung	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1 Murine Embryogenese: Plazentation, Determinierung von Stammzelllinien und molekulare Regulation	1
1.1.1 Entwicklung der murinen Plazenta	1
1.1.2 Linienentwicklung in der Blastozyste	4
1.1.3 Stammzellen aus Zelllinien der Blastozyste	5
1.1.4 Molekulare Mechanismen und Transkriptionsfaktoren in der Linienspezifizierung und -erhaltung in der Blastozyste	6
1.2 Die Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren	13
1.2.1 Allgemeiner Aufbau, Vorkommen und Funktionen	13
1.2.2 Murine AP-2-Proteine	15
1.2.3 AP-2 γ	16
1.3 Zielsetzung	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1.1 Chemikalien	23
2.1.1.2 Enzyme	25
2.1.1.3 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.1.4 Kits	25
2.1.1.5 Geräte	26
2.1.1.6 Plasmide	26
2.1.1.7 Oligonukleotide	27
2.1.1.8 Oligonukleotide quantitative RT-PCR (Taqman)	28
2.1.1.9 Antikörper	28
2.1.1.10 Bakterien	28
2.1.1.11 Mauslinien	29
	V

2.1.1.12 Zellen	29
2.1.1.13 Lösungen, Medien, Puffer	29
2.1.2 Zellkultur	31
2.1.2.1 Chemikalien, Medien	31
2.1.2.2 Lösungen/ Medien für die Zellkultur	32
2.1.2.3 Verbrauchsgegenstände	32
2.2. Methoden	33
2.2.1.1 Tierhaltung	33
2.2.1.2 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien der Maus	33
2.2.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	33
2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese	34
2.2.1.5 Analytischer und präparativer Verdau von DNA	35
2.2.1.6 Präparation von Dialyse-Schläuchen	35
2.2.1.7 Elektroelution von DNA-Fragmenten	35
2.2.1.8 Phenol-/Chloroform-Extraktion von DNA-Lösungen	35
2.2.1.9 Ethanol-Präzipitation von DNA-Lösungen	35
2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten	36
2.2.1.11 Herstellung von LB-Amp-Agarplatten	36
2.2.1.12 TOPO-Klonierung von PCR-Produkten	36
2.2.1.13 Präparation kompetenter Zellen	36
2.2.1.14 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen	37
2.2.1.15 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA („Mini-Präp“)	37
2.2.1.16 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA („HiSpeed-Maxi-Präp“)	37
2.2.1.17 DNA-Konzentrationsbestimmung im Photometer	38
2.2.1.18 Linearisierung eines Targetingvektors	38
2.2.1.19 RNA-Isolierung aus Zellen	38
2.2.1.20 cDNA-Synthese	39
2.2.1.21 Isolierung von Proteinextrakten aus kultivierten Zellen	39
2.2.1.22 Bestimmung der Proteinmenge	39
2.2.1.23 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.2.1.24 Western-Blot und Detektion von Proteinen auf Membranen	40
2.2.1.25 Immunfluoreszenzfärbungen	40
2.2.1.26 LacZ-Färbung von Embryonen	41
2.2.2 Trophoblast-Stammzellkultur	41
2.2.2.1 Präparation, Kultivierung und Inaktivierung embryonaler Fibroblasten	41

2.2.2.2 Zählen von Zellen	42
2.2.2.3 Einfrieren von Zellen	42
2.2.2.4 Auftauen von Zellen	42
2.2.2.5 Herstellung von konditioniertem Medium (CM-Medium)	42
2.2.2.6 Isolation von Blastozysten	42
2.2.2.7 Kultivierung von Trophoblast-Stammzellen	43
2.2.2.8 Trennung der Trophoblast-Stammzellen von Feederzellen	43
2.2.2.9 Cre-Transduktion von TS-Zellen	43
2.2.3 Embryonale Stammzellkultur	44
2.2.3.1 Gelatinisieren von Gewebekulturschalen	44
2.2.3.2 Generierung embryonaler Stammzellen	44
2.2.3.3 Kultivierung embryonaler Stammzellen	44
2.2.3.4 Splitten von ES-Zellen	45
2.2.3.5 Elektroporation von ES-Zellen	45
2.2.3.6 Selektion	45
2.2.3.7 Picken der selektionierten ES-Klone	45
2.2.3.8 Isolierung der ES-Zell-DNA	46
2.2.3.9 Transfektionen von MG1.19 ES-Zellen	46
3. Ergebnisse	47
3.2 AP-2 γ wird <i>in vitro</i> in Trophoblast-Stammzellkulturen exprimiert	48
3.3 AP-2 γ defiziente Embryonen bilden keine TS-Linien <i>in vitro</i>	53
3.4 ES-Linien können aus AP-2 γ ^{-/-} Blastozysten generiert werden	55
3.5 AP-2 γ wird bei der Erhaltung und Selbsterneuerung in TS-Kulturen gebraucht	56
3.6 Überexpression von AP-2 γ in ES-Zellen induziert Differenzierung zu Tropektoderm	59
3.7 AP-2 γ defiziente ES-Zellen zeigen eine verzögerte Herunterregulation von Nanog nach Induktion von Cdx2	64
3.8 Teilnahme der AP-2 γ induzierten TS-Zellen an der Plazenta	70
4. Diskussion	72
5. Ausblick	80
6. Literatur	82
7. Anhang	87

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Plazentaentwicklung in der Maus	2
Abb. 1.2: Zelllinienentwicklung und Stammzellen der späten Blastozyste (modifiziert (Rossant, 2007))	5
Abb. 1.3: Netzwerk der Transkriptionsfaktoren zur Kontrolle der Erhaltung und Differenzierung von Stammzellen (modifiziert (Niwa, 2007))	9
Abb. 1.4: Proteinstruktur von AP-2-Proteinen am Beispiel AP-2 α (Eckert et al., 2005)	13
Tab. 1.1: Übersicht der murinen AP-2-Proteine	15
Abb. 1.5: AP-2 γ Expression während der Entwicklung des Trophoblasts (Shi and Kellems, 1998)	18
Abb. 1.6: AP-2 γ -Knockout (Werling, Schorle 2002)	19
Abb. 3.1: AP-2 γ wird im Blastozystenstadium in trophektodermalen Zellen exprimiert	47
Abb. 3.2: Differenzierung von Trophoblast-Stammzellen	48
Abb. 3.3: RT-PCR Analyse von AP-2 γ und Trophoblast-Stammzell-Markergenen während der Differenzierung von TS-Zellen	49
Abb. 3.4: Western-Blot-Analyse von allen fünf AP-2 Proteinen während der Differenzierung von Wildtyp TS- und ES-Zellen	51
Abb. 3.5: AP-2 γ ist <i>in vitro</i> in den Zellkernen von TS-Zellen lokalisiert	52
Abb. 3.6: PCR-Genotypisierung von TS-Zellen P ₃ -P ₅	54
Tab. 3.1: AP-2 γ ^{-/-} Blastozysten bilden keine TS-Kulturen <i>in vitro</i>	54
Abb. 3.7: Phasenkontrastaufnahmen von AP-2 γ ^{+/+} (A) und AP-2 γ ^{-/-} (B) Blastozysten an Tag 4 in Kultur	55
Abb. 3.8: PCR-Genotypisierung von ES-Zellen P ₃ -P ₅	56
Tab. 3.2: AP-2 γ ^{-/-} Blastozysten bilden ES-Kulturen <i>in vitro</i>	56
Abb. 3.9: Transduktion von AP-2 γ ^{fl^{ox}/fl^{ox}} TS-Zellen mit dem Cre-Protein	57
Abb. 3.10: Genotypisierung von TS-Klonen von AP-2 γ ^{fl^{ox}/fl^{ox}} nach Cre-Transduktion	58
Abb. 3.11: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionsplasmide	59
Abb. 3.12 : Überexpression von AP-2 γ in ES –Zellen	60
Abb. 3.13: Immunfluoreszenzfärbungen von trophektodermalen Zellen, die durch die Überexpression von AP-2 γ (A) und Cdx2 (B) generiert wurden	61
Abb. 3.14: RT-PCR Analysen der Genexpression	63
Abb. 3.15: Schema des Tamoxifen-induzierbaren Cdx2-Expressionsplasmids	64
Abb. 3.16: AP-2 γ defiziente ES-Zellen differenzierten zu TS nach Induktion von Cdx2	65

Abb. 3.17: AP-2 γ defiziente ES-Zellen differenzierten verzögert zu TS nach Induktion von Cdx2	66
Abb. 3.18: Quantitative RT-PCR	69
Abb. 3.19: Schema des Tamoxifen-induzierbaren AP-2 γ -Expressionsplasmids	70
Abb. 3.20: Chimäre Embryonen, die aus ROSA β geo-ES-Zellen generiert wurden	71

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
ddNTPs	Didesoxynukleotid-Triphosphate
DDT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
dpc	Tage post coitum
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Embryonale Feeder(zelle)
ES	Embryonale Stamm(zelle)
et al.	Et altera
FBS	fötal bovine Serum
FCS	fötale Kälberserum
FGF4	Fibroblast Growth Factor 4
h	Stunde
H ₂ O _{dd}	Doppelt destilliertes Wasser
kb	Kilobasenpaare
Kda	Kilodalton (1000 Da)
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LIF	Leukaemia Inhibiting Factor

M	Molar
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
min	Minute(n)
ml	Mililiter
mM	Milimolar
mm	Milimeter
MMC	Mitomycin C
ng	Nanogramm
nm	Nanomolar
OD	optische Dichte
pBS	Plasmid Bluescript
PBS	Phosphat-gefufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pM	Pikomolar
rpm	Umdrehungen/Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TS	Trophoblast-Stamm(zelle)
TSR	Template Suppression Reagent
U	Enzymeinheiten
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1 Murine Embryogenese: Plazentation, Determinierung von Stammzelllinien und molekulare Regulation

1.1.1 Entwicklung der murinen Plazenta

Die Plazenta ist das erste Organ, das sich während der Säugerentwicklung bildet und erlaubt die Entwicklung des Embryos im Mutterleib. Folglich ist ihre Bildung aus extraembryonalen Geweben eine absolute Notwendigkeit, um das Wachstum und das Überleben des Embryos während der Entwicklung im Uterus zu sichern. Wichtige Zelltypen der Plazenta sind die Zellen der Trophoblast-Linie; diese vermitteln die Einnistung der Blastozyste in den Uterus und schaffen die hauptsächlichen strukturellen und funktionellen Komponenten zur Verbindung der fötalen und maternalen Blutsysteme. Dieses sichert die ausreichende Ernährung und gleichzeitig Entsorgung von Stoffwechselendprodukten des wachsenden Embryos.

Die Entwicklung der extraembryonalen Gewebe beginnt noch vor der Implantation im Blastozystenstadium an Tag 3,5 der murinen Embryogenese, der Embryo durchläuft seine erste Differenzierung in zwei bestimmte Zelllinien, die innere Zellmasse (inner cell mass, ICM) und das Trophektoderm (TE) (Abb. 1.1). In der Maus beginnt diese Differenzierung mit dem Prozess der Kompaktation und Polarisierung im 8-Zell-Stadium; dabei wird in jedem Blastomer eine Asymmetrie in der Adhäsionsfähigkeit geschaffen. Bei der Initiation und Orientierung der Polarität nimmt man an, dass das Zell-Zell-Adhäsionsprotein E-Cadherin eine zentrale Rolle übernimmt. Während der nächsten Zellteilung führen radiär orientierte Teilungen einiger Blastomere zur Auftrennung in verschiedene Tochterblastomere, auf diese Weise werden zwei verschiedene Zellpopulationen gebildet. Die äußeren, polarisierten Blastomere bilden den epithelialen Zell-Monolayer des Trophektooderms der Blastozyste, dieser umschließt die inneren, stark kohäsiven, nicht-polarisierten Blastomere der inneren Zellmasse und das flüssigkeitsgefüllte Blastozoel. Diese beiden Zellpopulationen beginnen sich sofort auf der molekularen Ebene zu unterscheiden, sie exprimieren ein unterschiedliches Repertoire an Genen und Proteinen und besitzen verschiedene Schicksale: die pluripotenten Zellen der inneren Zellmasse bilden den Embryo und einige extraembryonale Membranen, wie Allantois und Amnion, während die Zellen des Trophektooderms in ihrem Potential auf die unterschiedlichen Trophoblast-Zelltypen der

Plazenta beschränkt sind (Fleming et al., 2001; Hemberger, 2007; Rossant and Cross, 2001).

Zum Zeitpunkt der Implantation werden die epithelialen Trophektodermzellen zu einer invasiven Zellpopulation, den Trophoblast-Riesenzellen; diese vermitteln das Einnisten des Embryos in den Uterus und die Bildung der Verbindungen zur mütterlichen Blutzufuhr. Beim Übergang vom Trophektoderm zum Trophoblast sind Änderungen in der Zellpolarität, der Zellbewegungsfähigkeit und der interzellulären Adhäsion beteiligt (Hemberger, 2007).

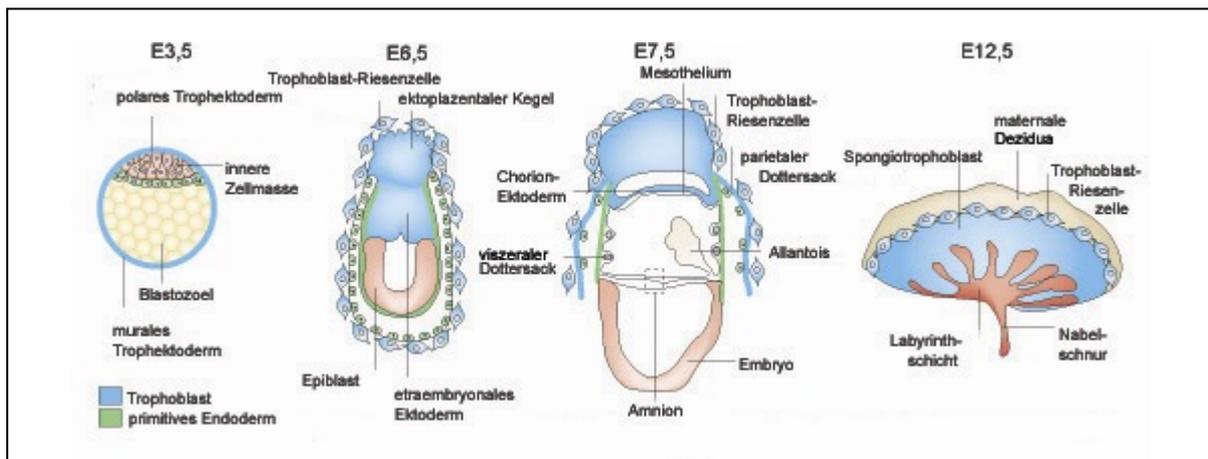


Abb. 1.1: Plazentaentwicklung in der Maus (Rossant and Cross, 2001)

Die frühe Entwicklung des murinen Embryos von E3,5 bis E12,5 zeigt den Ursprung der extraembryonalen Linien und Komponenten der Plazenta.

Das Trophektoderm kann in zwei Regionen, das polare und murale Trophektoderm, unterteilt werden (Abb. 1.1). Das murale Trophektoderm, das keinen Kontakt zur inneren Zellmasse hat, differenziert nach der Implantation zuerst. Die muralen Trophoblast-Zellen teilen sich nicht, aber sie vermehren weiterhin ihre DNA durch Endoreduplikation und bilden die polyploiden primären Riesenzellen des Trophoblast. Im Gegensatz dazu bleibt das polare Trophektoderm, welches die innere Zellmasse überdeckt, durch Signale von der naheliegenden inneren Zellmasse im proliferativen, undifferenzierten Zustand. Die Zellen des polaren Trophektoderms bilden das extraembryonale Ektoderm und den ektoplazentalen Kegel. Das extraembryonale Ektoderm expandiert und bildet das Chorion, welches von einer dünnen Zellschicht mesothelialer Zellen gesäumt ist. Im ektoplazentalen Kegel setzt sich der Prozess der Riesenzelldifferenzierung fort, er enthält eine Population von Trophoblast-Stammzellen (TS-Zellen), die für einen kontinuierlichen Nachschub an differenzierten Trophoblast-Riesenzellen, den sekundären Trophoblast-Riesenzellen, sorgt (Hemberger, 2007; Sutherland, 2003). Die physische Verbindung des Fötus zur maternalen

Vaskulisation wird von sekundären Trophoblast-Riesenzellen aufgebaut, die am Rand des ekto-plazentalen Kegels differenzieren. Von hier dringen sie in den Uterus ein und treffen auf die maternalen Arterien, wo sie die endothelialen Zellen verdrängen und die Blutgefäße gänzlich von Trophoblastzellen umranden. Durch diesen Prozess werden die sinusoiden Kanäle gebildet, sie transportieren das maternale Blut zur Implantationsstelle in die zukünftige Plazenta.

Nach der Determinierung der Trophoblast-Linie findet in der Blastozyste ein weiterer wichtiger Differenzierungsschritt ab, das primitive Ektoderm, welches den Embryo bildet, trennt sich vom primitiven Endoderm (Abb. 1.1). Wie das Trophektoderm bildet das primitive Endoderm ausschließlich extraembryonale Gewebe und bildet die parietale und viszerale Endodermis des Dottersacks. Noch weiter hervorgehoben ist die Wichtigkeit der extraembryonalen Gewebe durch das Anlegen einer dritten Zelllinie, um das intrauterine Wachstum zu sichern: bei der Gastrulation differenziert das extraembryonale Mesoderm und bildet die Allantois und die mesodermalen Komponenten des viszeralen Dottersacks, Amnion und Chorion.

Die Allantois, die aus dem Mesoderm am posterioren Ende des Embryos entsteht, fusioniert mit dem ektodermalen Chorion etwa an Tag 8,5 dpc und bildet die Chorionallantois-Plazenta (Hemberger, 2007; Sutherland, 2003). Dabei unterstützt die Allantois das extraembryonale Mesoderm und dringt in die flachen Schichten des Chorions ein und verzweigt sich, um endotheliale Zellschichten zu bilden. Diese sind von einem hochkomplexen vaskulären Netzwerk an plazentalen Blutgefäßen umgeben und bilden später auch die Nabelschnur aus. Die fötalen Gefäße vermischen sich eng mit den vom Trophoblast umrandeten Sinusoiden, die das maternale Blut führen. Solch eine Architektur sichert einen minimalen Transferabstand zwischen beiden Blutkreisläufen. Zusätzlich wird die Transferkapazität der fötalen und maternalen Blutkreisläufe durch eine Orientierung im Gegenstrom weiter gesteigert. Wegen der komplexen Struktur wird diese Region in der Plazenta Labyrinth-schicht genannt (Abb. 1.1). In der Labyrinth-schicht findet man neben dem Chorion-Trophoblast und Blutgefäßen auch zwei Zellschichten von multinukleären Synzytiotrophoblastzellen. Die Labyrinth-schicht wird vom Spongiotrophoblast umgeben, der eine kompakte Zellschicht aus nicht-synzytialen Zellen und glykogenlagernden Zellen zwischen den Labyrinth- und äußeren Riesenzellen bildet. Man geht davon aus, dass der Spongiotrophoblast hauptsächlich von Zellen aus dem ekto-plazentalen Kegel abstammt. Den Spongiotrophoblast umfassen eine Schicht von äußeren Trophoblast-Riesenzellen am Rand der maternalen Dezidua (Hemberger, 2007; Rossant and Cross, 2001).

Eine gestörte und unvollständige Integration der Plazenta in den maternalen Uterus kann von der embryonalen, maternalen oder der Komponente des Trophoblast verursacht werden, Defekte am Trophoblast sind allerdings die überwiegenden (Hemberger, 2007; Rossant and Cross, 2001). So konnten anhand von vielen zielgerichteten Mutationen, die mit embryonaler Letalität verbunden sind, Defekte in der Plazentaentwicklung näher analysiert werden. Beispielsweise verursachen Mutationen der Transkriptionsfaktoren *Cdx2* und *Eomes* frühe Defekte bereits bei der Entwicklung der trophektodermalen Linie (Chawengsaksophak et al., 1997; Russ et al., 2000); Störungen in der Erhaltung der Trophoblast-Stammzellen werden durch Mutationen im Nuclear hormone Receptor *Esrrb* ausgelöst (Luo et al., 1997). Die Funktion des ekto-plazentalen Kegels wird durch Mutationen des *Ets2*-Transkriptionsfaktors beeinträchtigt (Yamamoto et al., 1998), ein Beispiel für Defekte bei der Ausbildung der Labyrinthschicht sind Mutationen in den Genen *FgfR2*, *Gcm1* und *Map2k1* (*Mek1*) (Anson-Cartwright et al., 2000; Bissonauth et al., 2006; Giroux et al., 1999; Xu et al., 1998).

1.1.2 Linienentwicklung in der Blastozyste

Nach der Befruchtung der Oozyte findet die erste Zellteilung statt, im 2-Zellstadium der Maus wird die Expression der maternalen Gene durch die Expression von zygotischen Genen ersetzt, diese Transition wird zygotische Genaktivierung (ZGA, zygotic gene activation) genannt (Schultz, 2002). Nach zwei weiteren aufeinander folgenden Runden von Zellteilungen bildet sich die Morula. Zur Bildung der Blastozyste führen zwei aufeinander folgende Differenzierungsschritte, zuerst die Differenzierung von Trophektoderm und anschließend die Bildung von primitiven Endoderm. Das erste erkennbare Differenzierungsereignis zeigt sich im späten Morulastadium, die äußeren Zellen der Morula nehmen eine epitheliale Struktur an, das Trophektoderm. Die frühe Blastozyste enthält somit zwei Zelltypen, die innere Zellmasse und das Trophektoderm. Die innere Zellmasse durchläuft einen zweiten Differenzierungsschritt und wird zu Epiblast und primitiven Endoderm. So hat die späte Blastozyste zum Zeitpunkt der Implantation drei Zelltypen, den Epiblast, das Trophektoderm und das primitive Endoderm (Abb. 1.2). Diese drei Zelllinien sind jetzt nicht mehr totipotent, sie alle haben distinkte Schicksale in der späteren Embryogenese (Ralston and Rossant, 2005).

So gehen aus dem Trophektoderm alle Trophoblast-Zelltypen des fötalen Plazentaanteils hervor. Aus dem Epiblast bildet sich das primitive Ektoderm, aus dem der Embryo

hervorgeht. Das primitive Endoderm bildet ausschließlich extraembryonale Gewebe; das Endoderm, welches sich von der inneren Zellmasse separiert bildet das parietale Endoderm; das primitive Endoderm, dass über dem Epiblast verbleibt bildet das viszerale Endoderm, was später zur viszeralen Endodermis des Dottersacks wird (Abb. 1.2) (Rossant, 2007). Das primitive Ektoderm kann weder Trophektoderm noch primitives Endoderm bilden; es ist die einzige Zelllinie, in der in diesem Entwicklungsstadium Pluripotenz erhalten bleibt, was es dazu fähig macht, alle drei Keimblätter des Embryos und primordiale Keimzellen und zu bilden (Niwa, 2007). Aus den drei Zelllinien der Blastozyste können permanente Zelllinien generiert werden, die im Folgenden kurz beschrieben werden.

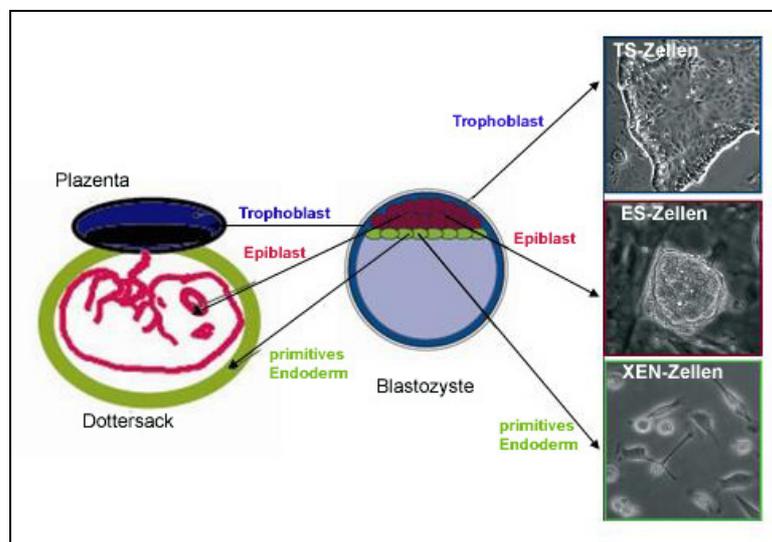


Abb. 1.2: Zelllinienentwicklung und Stammzellen der späten Blastozyste (modifiziert (Rossant, 2007))

Aus dem Trophektoderm (blau) der Blastozyste bildet sich der Trophektoderm der Plazenta, der Epiblast (rot) bildet den Embryo selbst und das primitive Endoderm (grün) bildet die endodermalen Schichten des visceralen und parietalen Dottersack. In *in vitro*-Kulturen werden TS-Zellen aus dem Trophektoderm (blau) generiert, ES-Zellen aus dem Epiblast (rot) und XEN-Zellen aus Zellen aus dem primitiven Endoderm (grün).

1.1.3 Stammzellen aus Zelllinien der Blastozyste

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) können aus den pluripotenten Zellen der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden (Abb. 1.2) und sind dazu imstande, sich an allen Zelltypen des Embryos zu beteiligen. Murine ES-Zellen sind pluripotent, nicht totipotent (Evans and Kaufman, 1981). ES-Zellen wachsen als Kolonien aus rundlichen

Zellen, die Pluripotenz wird durch Vermeidung von Differenzierung und Förderung der Proliferation erhalten. In murinen ES-Zellen ist LIF (Cytokine Leukaemia Inhibitory Factor) der Schlüsselfaktor, der die Differenzierung unterdrückt und murine ES-Zellen im selbsterneuerbaren, undifferenzierten Zustand hält (Niwa, 2007). LIF gehört zur Interleukin-6-Cytokin-Familie und bindet an einen heterodimeren Rezeptor, dieses resultiert in der Aktivierung des kanonischen Jak/Stat-Pathways. Stat3-Aktivierung ist notwendig, um in murinen ES-Zellen die Pluripotenz aufrecht zu erhalten, c-Myc ist wahrscheinlich ein Zielgen von Stat3 (Cartwright et al., 2005). Pluripotente ES-Zellen können in primitives Ektoderm differenzieren und bilden alle Zelltypen eines Embryos; nur bei bestimmten Kulturbedingungen verbunden mit der Induktion oder Repression von entsprechenden Faktoren können sie in primitives Endoderm und in trophektodermale Zellen differenzieren (Niwa, 2007; Niwa et al., 2005).

Aus der Blastozyste oder aus frühem extraembryonalem Ektoderm kann man Trophoblast-Stammzelllinien (TS-Zellen) generieren (Abb. 1.2). Die TS-Kulturen wachsen als epitheliale Kolonien in Anwesenheit des Wachstumsfaktors FGF4 mit Heparin als Kofaktor von FGF4 und in Fibroblast-konditioniertem Medium. Nach Wegnahme von FGF4 zeigen sich in der Kultur Zellen mit differenzierter Morphologie und beginnen entsprechende TS-Differenzierungsmarker zu exprimieren. Werden kultivierte TS-Zellen in eine Blastozyste injiziert, nehmen diese Zellen an allen Zelltypen der Trophoblast-Linie teil, nie jedoch am Embryo in den resultierenden Chimären (Tanaka et al., 1998).

Zellen des extraembryonalen Ektoderms (XEN-Zellen) werden aus Blastozysten mit primitivem Endoderm gewonnen (Abb 1.2). In der XEN-Zellkultur zeigen die Zellen zwei verschiedene Morphologien, einmal einen rundlichen Zelltyp und einen mehr sternförmigen epithelialen Zelltyp. Die Injektion von XEN-Zellen in Blastozysten zeigte ausnahmslos eine Teilnahme an Zelltypen des extraembryonalen Endoderms, vornehmlich am parietalen Endoderm (Kunath et al., 2005).

1.1.4 Molekulare Mechanismen und Transkriptionsfaktoren in der Linienspezifizierung und -erhaltung in der Blastozyste

Die Eigenschaft der Pluripotenz wird mit der Expression vom Pit-Oct-Unc (POU)-domain Transkriptionsfaktor Oct4 assoziiert. In der Maus wird Oct4 bereits in der Oozyte exprimiert und nach der Befruchtung in allen präimplantiven Furchungsstadien in den Zellkernen, ab dem Blastozystenstadium und der ersten Differenzierung des Trophektoderms ist die

Expression auf die Zellen der inneren Zellmasse beschränkt (Palmieri et al., 1994). Im Mausembryo wird Oct4 auch in den primordialen Keimzellen exprimiert (Pesce and Scholer, 2001). Der Verlust von Oct4 führt dazu, dass Embryonen sich bis zum Blastozystenstadium entwickeln, aber unfähig sind, pluripotente Zellen der inneren Zellmasse zu bilden, Derivate der inneren Zellmasse wie Epiblast und Dottersack fehlen, alle Zellen zeigen stattdessen Eigenschaften der extraembryonalen Trophoblast-Linie. Darüber hinaus wird in den Mutanten die Proliferation des Trophoblast nicht aufrechterhalten, da Oct4 Signale von den Stammzellen zum Trophektoderm durch den parakrinen Wachstumsfaktor FGF4 determiniert. Darüber hinaus ist es nicht möglich, aus Oct4 defizienten Blastozysten ES-Zelllinien zu generieren (Nichols et al., 1998). Etablierte ES-Zellen mit konditionalen Oct4-Allelen verlieren nach einem Ausschalten von Oct4 ihre Pluripotenz und differenzieren zu trophektodermalen Zellen. Wird Oct4 in ES-Zellen überexprimiert, differenzieren die Zellen hauptsächlich in Zellen ähnlich dem primitiven Endoderm (Niwa et al., 2000). Oct4 verhindert die Differenzierung zu Trophektoderm indem es mit Cdx2 interagiert und einen Repressor-Komplex bildet. Dieser Komplex interferiert mit der Autoregulation dieser beiden Transkriptionsfaktoren und schafft ein wechselseitiges Inhibitionssystem, was ein gegenseitiges Ausschließen ihrer Expression begründet (Niwa et al., 2005). In diesem System resultiert eine Repression von Oct4 in eine steigende Expression von Cdx2 und umgekehrt- dieser Mechanismus könnte zu zwei verschiedenen Signalwegen führen, die zu pluripotenten Stammzellen und trophektodermalen Zellen führen (Abb. 1.3) (Niwa, 2007).

Sox2, ein Mitglied der Sox-Familie (SRY-related HMG box), nimmt innerhalb des Netzwerks der Transkriptionsfaktoren zur Erhaltung der Pluripotenz eine wichtige Position ein. Sox2 wird im frühen murinen Embryo, wie Oct4, in den Zellen der inneren Zellmasse, im Epiblast und in Keimzellen exprimiert, zusätzlich findet man noch in Zellen des extraembryonalen Ektoderms Sox2-Expression. Sox2 defiziente Embryonen bilden Blastozysten, sterben aber kurz nach der Implantation, Trophoblast-Stammzell-Kulturen konnten aus Sox2-defizienten Blastozysten nicht generiert werden (Avilion et al., 2003). Der Verlust von Sox2 in murinen ES-Zellen induziert die Differenzierung in mehrere Zelllinien, hauptsächlich in Trophektoderm, was auf eine Funktion von Sox2 bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz hinweist (Ivanova et al., 2006; Masui et al., 2007). Von Sox2 ist bekannt, dass es mit Oct4 kooperiert, um Oct-4 Zielgene zu aktivieren (Abb. 1.3). In Enhancerbereichen von Genen, die spezifisch für ES-Zellen sind und mit Pluripotenz assoziiert sind, findet man Bindestellen für den Oct4/Sox2-Komplex, so in den Genen *Fgf4*, *Fbxo15*, *Nanog* und *Lefty*.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der in pluripotenten Zellen der inneren Zellmasse und in ES-Zellen exprimiert wird, ist das Homeodomänen-Protein Nanog. Im murinen Embryo ist Nanog mRNA das erste Mal in der kompaktierten Morula detektiert worden, Nanog Expression fand man hier in den inneren Zellen der Morula, in der zukünftigen inneren Zellmasse. In der frühen Blastozyste ist Nanog in den Zellen der inneren Zellmasse, jedoch nicht im Trophektoderm zu finden, in der späten Blastozyste ist die Expression ebenfalls auf die innere Zellmasse beschränkt und ist im Trophektoderm und im primitiven Endoderm ausgeschlossen. Zum Zeitpunkt der Implantation wird die Expression von Nanog herunterreguliert (Chambers et al., 2003). An Tag 6,5 dpc erscheint im proximalen Teil des Epiblasten wieder Nanog Expression und bleibt in der weiteren Embryogenese auf den Epiblast beschränkt (Hart et al., 2004). Beim Verlust von Nanog wird kein Epiblast gebildet, alle Zellen der inneren Zellmasse differenzieren zu Zellen des primitiven Endoderms. In ES-Zellen führt das Ausschalten von Nanog zum Verlust von Pluripotenz, sie differenzieren in Zellen, die morphologisch parietalen Endodermzellen ähnlich erscheinen, Expression von GATA-6 wird dabei auslöst. Zugleich ähneln diese differenzierten Nanog defizienten ES-Zellen morphologisch ES-Zellen, in denen GATA-6 überexprimiert wurde (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Eine Überexpression von Nanog in murinen ES-Zellen kann diese in Abwesenheit von LIF in einem undifferenzierten Zustand halten; deshalb ist Nanog theoretisch ein guter Kandidat als GATA-6-Repressor (Abb. 1.3) (Mitsui et al., 2003). Die Expression von Nanog wird teilweise durch Oct4 und Sox2 reguliert, bisher gibt es noch keine direkten Beweise, dass *Gata6* durch Nanog reprimiert wird (Niwa, 2007; Rodda et al., 2005).

In den regulatorischen Elementen von Oct4, Sox2 und Nanog sind mit Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitations-Analysen (ChIP) gemeinsame Zielsequenzen identifiziert worden, was auf eine Bildung eines regulatorischen Rückkopplungszyklus dieser drei Transkriptionsfaktoren schließen lässt, der die Pluripotenz in ES-Zellen erhält. In diesem Zyklus regulieren sich die drei Faktoren sowohl selbst, als auch untereinander (Boyer et al., 2005). Dieses Regulationsmodell ist in ES-Zellen bisher noch nicht bestätigt worden. Allerdings wäre eine positive Rückkopplung allein nicht ausreichend, um die Pluripotenz zu erhalten, da beispielsweise der Pluripotenzstatus sensitiv gegenüber der Expressionsstärke von Oct4 ist und zum Ausgleich im regulativen Netzwerk deshalb auch eine negative Rückkopplung benötigt (Niwa et al., 2000). Dazu sind bisher als stammzellspezifische Enhancer von Oct4 ein distaler und ein proximaler Enhancer identifiziert worden, an die viele positive (z.B. Lrh1, Liver receptor homolog 1) und negative (z.B. Gcnf, germ cell

welcher die Differenzierung zum primitiven Endoderm unterstützt. Der Übergang vom pluripotenten Zustand in eine dieser Differenzierungsstadien kann in dieser Modelldarstellung mit positiven und negativen Rückkopplungsschleifen erklärt werden, denn in solch einem System kann eine kleine quantitative Asymmetrie eines Rückkopplungszyklus in seine ausschließliche Expression umgewandelt werden (Abb. 1.3) (Niwa, 2007).

Ein Transkriptionsfaktor, der in der Trophektoderm- und Trophoblastentwicklung in der Blastozyste beteiligt ist, ist das Caudal-related Homeobox Protein Cdx2. Cdx2 Expression ist ab dem 8-Zellstadium detektierbar und wird noch vor der Bildung der Blastozyste in den äußeren Zellen hochreguliert. Die ubiquitäre Expression von Cdx2 beginnt mit dem Zeitpunkt der Zellpolarisation, aber der Zellpolarisationsprozess ist unabhängig von der Transkription von zygotischem Cdx2. Folglich scheint Cdx2 nach der ersten Linienentscheidung zu agieren und wird vermutlich von Prozessen, die Zuweisung und Morphogenese der Zelllinien beeinflussen, reguliert (Ralston and Rossant, 2007). Der Verlust in Cdx2 resultiert in embryonaler Letalität zwischen Tag 3,5 dpc und 5,5 dpc, die Cdx2 defizienten Tiere initiieren die Bildung der Blastozyste, aber das Blastozoele kollabiert und es werden keine Marker von differenziertem Trophektoderm exprimiert, die Blastozysten implantieren sich nicht. Interessanterweise werden die Pluripotenzgene Oct4 und Nanog, die nur in Zellen der inneren Zellmasse exprimiert werden, ektopisch in den äußeren Zellen der mutierten Blastozysten exprimiert. Dieses weist darauf hin, dass in den äußeren Zellen ein pluripotentes Zellstadium aufrechterhalten wird (Chawengsaksophak et al., 1997; Strumpf et al., 2005). Aus Cdx2 defizienten Blastozysten konnten keine TS-Zelllinien etabliert werden, wohl aber ES-Zellen (Strumpf et al., 2005). Cdx2 ist essentiell für die Selbsterneuerung von Trophoblast-Stammzellen, aber nicht für die Differenzierung des Trophektoderms (Niwa et al., 2005). Es wurde spekuliert, dass möglicherweise maternale Cdx2 mRNA an der Bildung des Trophektoderms beteiligt ist, diese konnte vor dem 8-Zellstadium detektiert werden. In dieser Arbeitsgruppe zeigten Experimente, in denen die Expression von Cdx2 mit Hilfe von RNA Interferenz unterdrückt wurde, Letalität vor dem Blastozystenstadium. (Deb et al., 2006). Allerdings führte dieselbe Herabregulation von Cdx2 durch siRNA bei einer anderen Gruppe zu einer Phänokopie von zygotischen Cdx2 defizienten Mutanten (Meissner and Jaenisch, 2006), so dass die genaue Rolle von maternalem Cdx2 weiter unklar ist. Wird Cdx2 in ES-Zellen überexprimiert, differenzieren diese zu TS-ähnlichen Zellen, ähnlich dem Ausschalten von Oct4, und exprimieren Marker des Trophektoderms. Nach einer Blastozysteninjektion dieser TS-Zellen, die durch

Überexpression von Cdx2 in ES-Zellen generiert wurden, nehmen diese Zellen nur an den trophektodermalen Linien der Plazenta in Chimären teil. Wie bereits beschrieben, interagiert Cdx2 mit Oct4 und bildet einen Repressor-Komplex und schafft so ein wechselseitiges Inhibitionssystem (Abb. 1.3) (Niwa et al., 2005).

Ein weiterer Transkriptionsfaktor bei der Trophektodermspezifizierung ist das T-Box-Gen Eomes. Die Expression von Eomes-Protein wurde bereits in der Oozyte detektiert und bleibt im präimplantiven Embryo bis zur Bildung der frühen Blastozyste in allen Zellkernen bestehen (McConnell et al., 2005). Eomes defiziente Mäuse bilden Blastozysten und implantieren, aber die weitere Proliferation und Differenzierung des Trophektoderms ist blockiert (Russ et al., 2000; Strumpf et al., 2005). In Eomes defizienten Blastozysten werden die Gene Cdx2 und Oct4 in den für sie normal entsprechenden Zellen detektiert, deshalb wird Eomes in der Transkriptionsfaktorkaskade hinter Cdx2 gestellt (Strumpf et al., 2005).

Kürzlich wurde von einem weiteren Gen in der frühen Entwicklung des Trophektoderm berichtet, der Transkriptionsfaktor TEAD4 spielt demnach eine Rolle bei der Spezifizierung der trophektodermalen Zelllinie (Yagi et al., 2007). TEAD4 mRNA wurde ab dem 2-Zellstadium bis zum Blastozystenstadium detektiert. Der Verlust von TEAD4 resultierte in einem letalen Phänotyp noch vor der Implantation des Embryos. TEAD4 defiziente Blastozysten exprimieren das trophoblastspezifische Gen Cdx2 nicht, aber Oct4, infolgedessen bilden TEAD4 defiziente Morulas kein Trophektoderm, keine Trophoblast-Stammzellen und kein Blastozoele und folglich implantieren diese Embryonen sich nicht. Da TEAD4 bereits im 2-Zellstadium exprimiert wird, Cdx2 aber erst im 8-Zellstadium (Niwa et al., 2005), wird die Hypothese aufgestellt, dass TEAD4-Aktivität durch Cdx2 vorgeschaltet ist und dass TEAD4 Cdx2 direkt aktivieren könnte (Abb. 1.3). Ein Experiment, welches diese Hypothese bestätigt, ist bisher allerdings noch nicht gezeigt worden. Weitere Markergene für das Trophektoderm, wie FgfR2 und Cdh1, werden in TEAD4 defizienten und Cdx2 defizienten Blastozysten exprimiert, was darauf hinweist, dass TEAD4 nur einen Teil der an der Trophektodermbildung beteiligten Gene reguliert (Yagi et al., 2007).

An der Spitze der Hierarchie der Transkriptionsfaktoren für primitives Endoderm sind die GATA-Transkriptionsfaktoren GATA-6 und GATA-4. Der Verlust von GATA-6 oder GATA-4 führt in vivo nicht zu einer kompletten Unterbindung der Bildung des primitiven Endoderms, sondern nur zu späteren Defekten bei der Differenzierung des visceralen Endoderms, vermutlich wegen funktioneller Redundanz zwischen GATA-6 und GATA-4. GATA-6 Mutanten sterben etwa 4 Tage nach Bildung der Blastozyste (Koutsourakis et al., 1999;

Rossant, 2007). Bei einem Verlust der GATA-Faktoren werden auch andere endodermspezifische Transkriptionsfaktoren, wie HNF-4 (Hepatic Nuclear Faktor 4) nicht mehr exprimiert, während GATA-6 noch immer in HNF-Mutanten exprimiert wird. Ektopische Expression von GATA-6 in ES-Zellen führt zu einer Differenzierung in einen XEN-Phänotyp. Für die GATA-6 Expression und die Bildung des parietalen Endoderms werden Wachstumsfaktoren der Fibroblast Growth Factor (FGF) – Familie gebraucht. Mäuse, denen *Fgf4* oder dessen Rezeptor *FgfR2* fehlt, bilden kein parietales Endoderm; dieser Phänotyp kann durch Überexpression von GATA-6 oder GATA-4 gerettet werden (Yamanaka et al., 2006).

Ebenfalls bilden *Grb2* defiziente Mäuse kein parietales Endoderm und exprimieren nur Marker der inneren Zellmasse. *Grb2* kodiert für ein Adapter-Protein, welches für die Aktivierung der Ras-MAPK-Kaskade durch Rezeptortyrosinkinasen wichtig ist. In den *Grb2* Mutanten wird im frühen Blastozystenstadium kein GATA-6 in den Zellen der inneren Zellmasse exprimiert, Nanog dagegen in allen Zellen in diesem Stadium (Chazaud et al., 2006). Diese Ergebnisse ergeben ein Model, in dem Grb2/RTK-Signale einige Zellen der inneren Zellmasse für das Schicksal zu parietalem Endoderm auswählen, dies wird durch GATA-Faktoren verstärkt. So werden in der späten Blastozyste Zellen mit dem Schicksal für das parietale Endoderm und für die innere Zellmasse aussortiert. Wie aber die Aktivität der Grb2/RTK-Signale auf nur einige ausgewählte Zellen in der inneren Zellmasse begrenzt bleibt, ist unklar (Yamanaka et al., 2006).

Wie beschrieben ist somit ein ganzes Netzwerk an Transkriptionsfaktoren an der molekularen Kontrolle zur Erhaltung der Pluripotenz und der Differenzierung beteiligt. Erwähnt sei an dieser Stelle, dass neben den molekularen Mechanismen zusätzlich auch epigenetische Mechanismen, auf die hier nicht genauer eingegangen werden soll, bei der Etablierung und Erhaltung der Pluripotenz eine essentielle Rolle spielen.

1.2 Die Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren

1.2.1 Allgemeiner Aufbau, Vorkommen und Funktionen

Im Jahr 1988 gelang die Isolierung des ersten AP-2- (Aktivator-Protein 2) Transkriptionsfaktors aus Hela-Zellen, dieser wird mittlerweile als AP-2 α bezeichnet (Williams et al., 1988). Bis heute zählt man vier weitere Transkriptionsfaktoren, die bei Mensch und Maus vorkommen, zu dieser Familie, AP-2 β (Moser et al., 1995), AP-2 γ (Oulad-Abdelghani et al., 1996), AP-2 δ (Zhao et al., 2001) und AP-2 ϵ (Feng and Williams, 2003). Alternativ werden sie mittlerweile auch als TCFAP2A ([ENSG00000137203](#)), TCFAP2B ([ENSG00000008196](#)), TCFAP2C ([ENSG00000087510](#)), TCFAP2D ([ENSG00000008197](#)) und TCFAP2E ([ENSG00000116819](#)) bezeichnet, wobei TCF für "transcription factor" steht.

Alle Mitglieder der AP-2-Familie besitzen eine gemeinsame, charakteristische Proteinstruktur (Abb. 1.4). Am C-Terminus befindet sich eine hochkonservierte Helix-Span-Helix Dimerisierungsdomäne und ein DNA-Bindemotiv, welches sich aus der Dimerisierungsdomäne und einer basischen Region zusammensetzt (Williams and Tjian, 1991).

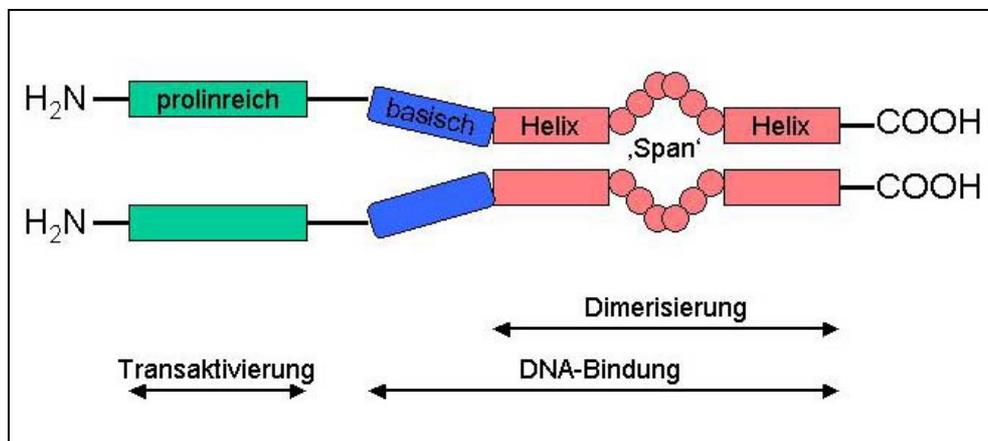


Abb. 1.4: Proteinstruktur von AP-2-Proteinen am Beispiel AP-2 α (Eckert et al., 2005)

Die AP-2 Proteine gliedern sich in drei funktionelle Domänen: 1. N-terminale prolinreiche Transaktivierungsdomäne (89 AS, grün), 2. eine C-terminale Dimerisierungsdomäne, die aus einem für diese Proteine charakteristischem Helix-Span-Helix-Motiv (131 AS, rot) besteht und 3. eine DNA-Bindedomäne, die sich aus der Dimerisierungsdomäne und einer zentralen basischen Region (20 AS, blau) zusammensetzt (Quelle: SwissProt. ID: P34056).

Die N-terminale, weniger konservierte prolinreiche Region, die bei allen AP-2-Proteinen außer AP-2 δ ein konserviertes PY-Motiv (XPPXY) enthält, vermittelt die Transkriptionsaktivierung (Feng and Williams, 2003; Williams and Tjian, 1991).

Die Proteine dieser Familie bestehen aus 437 AS bis 452 AS und besitzen ein Molekulargewicht von 46 kDa bis 52 kDa. Sie binden an die palindromische Erkennungssequenz 5'-GCCN₃GGC-3', wenn auch das Protein AP-2 δ eine spezifische Variation dieses Motivs bevorzugt (Zhao et al., 2001). In späteren Studien wurde gezeigt, dass AP-2-Proteine auch an die Sequenzen 5'-GCCN₄GGC-3' und 5'-GCCN_{3/4}GGG-3' binden können (Mohibullah et al., 1999). Andere Bindestellen weichen von diesen Sequenzen ab, beispielsweise im SV40-Enhancer mit dem Motiv 5'-CCCCAGGC-3', deshalb wahrscheinlich können AP-2-Proteine sowohl als Homodimere oder Heterodimere mit unterschiedlicher Affinität an verschiedenste GC-reiche Sequenzen binden (Mitchell et al., 1987).

Insgesamt zeigt ein Sequenzvergleich der fünf Mitglieder eine hohe Konservierung innerhalb der AP-2-Genfamilie, besonders am C-Terminus der Proteine. Dabei sind AP-2 α , AP-2 β , AP-2 γ und AP-2 ϵ in der DNA-Bindedomäne höher konserviert, als AP-2 δ (Feng and Williams, 2003).

Neben AP-2-Proteinen in Mensch und Maus wurden Mitglieder dieser Transkriptionsfaktor-Familie („Ensembl Familie“: ENSF 00000001105, <http://www.ensembl.org>) auch in anderen Spezies gefunden. In Wirbeltieren finden sich Vertreter der AP-2-Familie in *R. norvegicus*, *G. gallus* (Shen et al., 1997), *D. rerio* (Knight et al., 2003), *X. laevis* (Snape et al., 1991), *X. tropicalis* und *P. troglodytes* (<http://www.ensembl.org>). Im Genom des Protochordaten *Ciona intestinalis* wurde eine putative AP-2-Sequenz gefunden, die große Ähnlichkeit zum AP-2 α -Protein zeigt. Die AP-2-Proteine der Wirbellosen *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* zeigen die schwächste Verwandtschaft mit den Wirbeltier- AP-2-Proteinen (Eckert et al., 2005). In *D. melanogaster* findet man ein Protein mit einer Homologie von 42-45% zu Wirbeltier-AP-2-Proteinen. Exprimiert wird Drosophila-AP-2 sowohl während der Embryogenese in Gehirn, Auge und in Zellen des ventralen Nervenstranges, als auch im adulten Tier (Bauer et al. 1998). In Hefe konnte kein AP-2-Gen nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass sich die AP-2-Proteine erst später in der Evolution entwickelt haben (Eckert et al., 2005).

Die AP-2-Transkriptionsfaktoren findet man überwiegend im Zellkern, wo sie an die Promotorregionen ihrer Zielgene binden und so die Transkription dieser regulieren. Dazu zählt eine Reihe von Genen, die für die Proliferation und Differenzierung verschiedenster

Zelltypen während der Entwicklung von entscheidender Bedeutung ist (Hilger-Eversheim et al. 2000). Von AP-2 Proteinen aktiviert werden beispielsweise Adenosin Deaminase (*ADA*) (Shi und Kellems 1998), das humane Metallothionin IIa Gen (Mitchell et al. 1987) *Östrogen-Rezeptor* (McPherson et al. 1997) und *Kit* (Huang et al. 1998). Neben der Aktivierung kann AP-2 auch eine reprimierende Wirkung auf die Transkription haben. So wird zum Beispiel MCAM/MUC18, ein Glykoprotein, dessen Expression mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert ist, von AP-2 reprimiert (Jean et al. 1998). AP-2 wird auch eine Rolle beim programmierten Zelltod zugeschrieben. Nullmutanten für *AP-2 α* , *β* und *γ* zeigen verstärkt Apoptosen in den betroffenen Geweben. Transgene Mäuse, die *AP-2 γ* in der Brustdrüse überexprimieren, zeigen eine vermehrte Proliferation des Brustepithels, aber auch vermehrte Apoptosen (Jager et al. 2003).

1.2.2 Murine AP-2-Proteine

Die fünf murinen Mitglieder der AP-2-Familie (Tab. 1.1) spielen besonders in der Embryogenese der Maus eine wichtige Rolle, hier sind sie an der Kontrolle der Zellproliferation, Differenzierung, Morphogenese und am Überleben von Zellen beteiligt.

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

Tab. 1.1: Übersicht der murinen AP-2-Proteine

In der Embryonalentwicklung werden verschiedene AP-2-Proteine sowohl in extraembryonalen Geweben, als auch im sich entwickelnden Embryo exprimiert und zeigen dabei ein sehr dynamisches, zellspezifisches Expressionsmuster; teilweise werden auch sie koexprimiert, was auf Redundanzen innerhalb der Familie hinweist.

Die Expression von AP-2-Proteinen konnte in der murinen Embryogenese bereits vor der Implantation detektiert werden, mit Ausnahme von AP-2 δ (Winger et al., 2006). Die früheste

Expression von AP-2 α wurde in der Blastozyste detektiert, in situ Hybridisierungen zeigen, dass die Expression auf die äußere Zellschicht, das Trophektoderm konzentriert ist, allerdings ist auch in der inneren Zellmasse schwach AP-2 α mRNA nachgewiesen worden (Winger et al., 2006). Nach der Implantation ist AP-2 α -Expression zunächst nur im Trophoblast detektiert worden. In der weiteren Embryonalentwicklung ist AP-2 α hauptsächlich für die kraniofaziale Entwicklung notwendig; AP-2 α defiziente Mäuse sterben perinatal, sie zeigen eine schwere Kranio-Abdominoschisis und Fehlentwicklungen in Gesicht, Rumpf, sensorischen Organen und kranialen Ganglien (Schorle et al., 1996; Zhang et al., 1996). AP-2 β mRNA wurde bereits in der unbefruchteten Oozyte detektiert, nach der Befruchtung im 2-Zell-Stadium und noch sehr schwach im 4-Zell-Stadium, in nachfolgenden Stadien nicht mehr. Höchstwahrscheinlich handelt es sich in diesen präimplantiven Stadien um maternale mRNA, die nach der Befruchtung schnell degradiert wird (Winger et al., 2006). AP-2 β defiziente Mäuse beenden die Embryonalentwicklung, sterben aber postnatal in den ersten 24 Stunden an einer polyzystischen Niereninsuffizienz (Moser et al., 1997). AP-2 ϵ Transkripte wurden in allen präimplantiven Stadien detektiert; in der unbefruchteten Oozyte, in 2- und 4-Zell-Stadium, schwächer in der Morula und nur noch sehr schwach in der Blastozyste (Winger et al., 2006).

Im folgenden Kapitel wird auf das AP-2-Protein AP-2 γ als Hauptaugenmerk dieser Arbeit genauer eingegangen, auf dessen orts- und zeitspezifische Expression und Regulation; besonders wird dabei der Fokus auf die Stadien vor der Implantation des Embryos und die Entwicklung der extraembryonalen Gewebe gerichtet.

1.2.3 AP-2 γ

Das murine Gen des Transkriptionsfaktors AP-2 γ wurde erstmals aus der murinen P19 embryonalen Carcinoma Zelllinie isoliert und zunächst als AP-2.2 bezeichnet (Chazaud et al., 1996). Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen mit den Proteinen AP-2 α und AP-2 β zeigt das Protein AP-2 γ im basischen Teil der DNA-Bindedomäne eine fast vollständige Konservierung (AP-2 γ gegenüber AP-2 α : 99%; AP-2 β : 96%).

AP-2 γ Transkripte konnten bereits in der unbefruchteten Oozyte nachgewiesen werden, auch weiterhin vor der Implantation im 2- und 4-Zellstadium, in der Morula und in der Blastozyste; AP-2 γ ist in diesen präimplantiven Stadien das vorherrschende Protein der AP-2-Familie (Winger et al., 2006). Genauere Untersuchungen, ob es sich in diesem frühen

Stadium um maternale oder zygotische Expression handelt erbrachten, dass maternale AP-2 γ mRNA zwischen dem 2- und 4-Zellstadium degradiert wird, paternale AP-2 γ mRNA war nicht detektierbar. Gleichzeitig mit der zygotischen Genaktivierung (ZGA) im 2-Zell-Stadium beginnt die Transkription von zygotischer AP-2 γ mRNA. Die maternale mRNA war wahrscheinlich auch der Grund dafür, dass in AP-2 γ defizienten Blastozysten von Auman et al. noch AP-2 γ -Protein detektiert wurde und die Expression kurz nach der Implantation verschwindet (Auman et al., 2002).

Im Morula- und Blastozystenstadium war das AP-2 γ -Protein in den Kernen aller Zellen zu finden, in der frühen Blastozyste wurde es in der inneren Zellmasse und im Trophektoderm detektiert (Winger et al., 2006). Ab Tag E 5,5 ist die Expression auf die extraembryonalen Linien beschränkt (Auman et al., 2002). Während der murinen Entwicklung ist AP-2 γ in der Plazenta der vorherrschende Faktor der AP-2-Familie. AP-2 α konnte schwach detektiert werden, AP-2 β wurde kaum detektiert, insgesamt wurde AP-2 γ höher als AP-2 α in der Plazenta detektiert (Shi and Kellems, 1998). An Tag 6,5 dpc konnte AP-2 γ in den primären Trophoblast-Riesenzellen um den Embryo herum, in den diploiden Zellen des polaren Trophektoderms, die den ekto-plazentalen Kegel bilden und im extraembryonalem Ektoderm, welches über der proamniotische Höhle liegt, detektiert. Im embryonalen Ektoderm und im primitiven Endoderm, das den Dottersack bildet, wurde AP-2 γ nicht detektiert, die Expression ist auf die Trophoblastlinie beschränkt. An Tag 7,5 dpc wurde AP-2 γ Expression im ekto-plazentalen Kegel detektiert. Die Expression blieb im wachsenden und proliferierenden extraembryonalem Ektoderm und im Chorion bestehen (Abb. 1.5, A) (Shi and Kellems, 1998). AP-2 γ wird außerdem in den innersten Zellen der Dezidua und stark in den Trophoblast-Riesenzellen exprimiert. In denselben extraembryonalen Regionen wurde auch an Tag 8,5 dpc starke Expression gefunden (Oulad-Abdelghani et al., 1996).

An etwa Tag 9,5 dpc fusioniert die Allantois mit dem ektodermalen Chorion und bildet die Chorionallantois-Plazenta, AP-2 γ ist zu diesem Zeitpunkt in den Riesenzellen am Übergang vom maternalen zum fötalen Bereich und in den Spongiotrophoblastzellen der Labyrinthenschicht angereichert. Im extraembryonalem Mesoderm und dessen Derivaten wurde AP-2 γ nicht gefunden (Abb. 1.5, B). An Tag 11,5 dpc mit dem Wachstum der Plazenta und der Bildung des hybriden vaskulären Systems ist AP-2 γ überall in der Plazenta exprimiert, in den Trophoblast-Riesenzellen und in den Trophoblastzellen der Junktionalzone und Labyrinthenschicht (Abb. 1.5, C). In der murinen Entwicklung erscheint somit zygotische AP-2 γ Expression erstmals mit Beginn der Trophoblastdifferenzierung und

bleibt bei fortschreitender Plazentaentwicklung in allen Zellen der Trophoblastlinie bestehen (Sapin et al., 2000; Shi and Kellems, 1998).

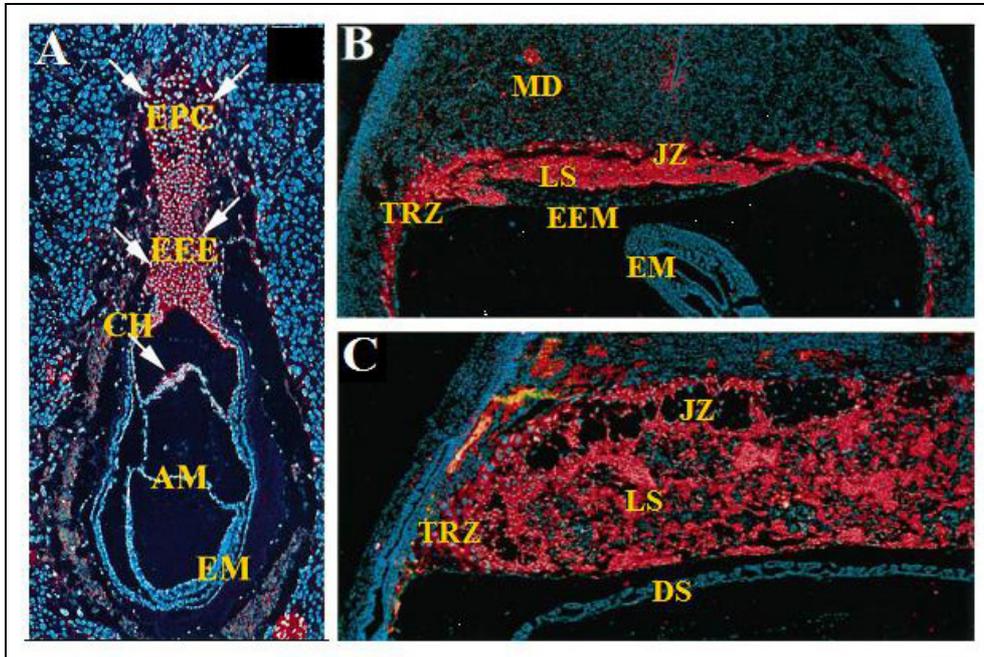


Abb. 1.5: AP-2 γ Expression während der Entwicklung des Trophoblasts (Shi and Kellems, 1998)

In situ Hybridisierungen an Schnitten von murinen Konzeptus an Tag 7,5 dpc (A) und murinen Plazenten an Tag 9,5 dpc (B) und 11,5 dpc (C). Bei roter Färbung handelt es sich um Signale der AP-2 γ -Antisense-Sonde, in (A) durch Pfeile verdeutlicht, die Kernfärbung ist blau. Abkürzungen: EPC: ekto-plazentaler Kegel (ectoplacental cone), EEE: extraembryonales Ektoderm, CH: Chorion, AM: Amnion, EM: Embryo, TRZ: Trophoblast-Riesenzellen, LS: Labyrinthenschicht, JZ: Junctionalzone, EEM: extraembryonales Mesoderm, DS: Dottersack.

Aber auch im sich entwickelnden Embryo ist AP-2 γ nachweisbar, ab Tag 7,5 dpc an der Grenze zwischen der Neuralplatte und dem Oberflächenektoderm (Chazaud et al., 1996). An Tag 8,5 dpc findet man es nur am Rand der Neuralfalte, einen Tag später zusätzlich im frontonasalen Mesenchym, das hauptsächlich aus Neuralleistenzellen, die aus dem Vorderhirn stammen, besteht. AP-2 γ Transkripte findet man zwischen Tag 9,5 bis Tag 12,5 im sich entwickelnden Gesicht, im Gehirn, den Gliedmaßenknospen und im Urogenitalsystem eine AP-2 γ Expression. In den Keimzellen konnte die Expression von AP-2 γ auf RNA-Ebene erst um den Tag 11,5 nachgewiesen werden, dabei handelt es sich vermutlich um eine transiente Expression, da bereits am Tag 14,5 keine RNA im embryonalen Ovar mehr nachgewiesen werden konnte (Chazaud et al., 1996). Im adulten Gewebe befindet sich AP-2 γ in den Lungen, in den wachsenden Follikeln des Ovars und in

den Hoden. In Gehirn, Herz, Leber, Niere und Milz konnte keine Expression nachgewiesen werden. AP-2 γ wurde auch in den meisten Epithelien und in exokrinen Drüsen gefunden (Chazaud et al., 1996).

Studien mit AP-2 γ defizienten Tieren zeigen eine essentielle Funktion von AP-2 γ in der frühen Embryonalentwicklung (Werling, Schorle 2002; Auman, Nottoli 2002). Homozygote AP-2 γ defiziente Embryonen zeigen an Tag 7,5 der Entwicklung ein deutlich geringeres Wachstum, als Wildtyp-Vergleichstiere, sie sterben und sind an Tag 9,5 dpc resorbiert (Abb. 1.6) (Werling, Schorle 2002).

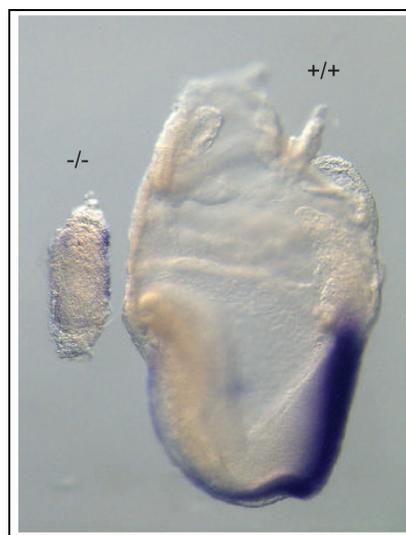


Abb. 1.6: AP-2 γ -Knockout (Werling, Schorle 2002)

AP-2 γ -defizienter Embryo und Wildtyp-Embryo E 8,0; der AP-2 γ ^{-/-}-Embryo ist wachstumsretardiert. Die Blaufärbung markiert die Expression von *brachyury*, einem mesodermalen Marker.

In den Mutanten wurde an Tag 7,5 keine AP-2 γ Expression im Embryo oder in den extraembryonalen Membranen und in den Riesenzellen detektiert; nur im maternalem Teil der Dezidua, allerdings verschwindet diese maternale Expression nach Tag 7,5 dpc (Auman et al., 2002). Auman beobachtete, dass in manchen Fällen die primäre embryonale Achse (dorsoventral) fehlerhaft ausgerichtet und der Embryo in Hinblick auf die extraembryonalen Gewebe untypisch orientiert war. Einige Mutanten bildeten kein Mesoderm, was bedeutete, dass sie die Gastrulation nicht durchlaufen. Die extraembryonalen Gewebe waren unterentwickelt oder fehlorganisiert: der ektoplazentale Kegel ist aufgrund einer verminderten Proliferation seiner Zellen reduziert und schlecht integriert; die Zellzahl der Riesenzellen ist verringert und die Labyrinthenschicht bildet sich nicht aus. Bei etwa 20% der

Mutanten ist die Grenze zwischen embryonalem und extraembryonalem Gewebe schwierig zu definieren (Auman et al., 2002). Somit führt der Verlust von AP-2 γ zur Reduktion der proliferativen Fähigkeiten der extraembryonalen Gewebe und dies hat zur Folge, dass der Embryo an Mangelernährung leidet und stirbt (Werling and Schorle, 2002). Auch Ergebnisse von Auman et. al mit verschiedenen chimären Mäusen zeigen, dass AP-2 γ für die Ausbildung der extraembryonalen Gewebe nach der Implantation essentiell ist, der Embryo selbst sich aber in Abwesenheit von AP-2 γ entwickeln kann (Auman et al., 2002).

Um die zellulären und molekularen Konsequenzen in den Trophoblastzellen genauer zu untersuchen, wurden Blastozysten isoliert und *in vitro* kultiviert. Hält man Blastozysten von AP-2 γ heterozygoten Verpaarungen in Kulturen ohne Fibroblast-Nährzellen und dem Leukaemia Inhibiting Factor (LIF), differenziert bei Wildtyp- und heterozygoten Blastozysten der Auswuchs des Trophektoderms in eine epitheliale Morphologie und bildet auch Riesenzellen. AP-2 γ ^{-/-}-Blastozysten haben im Gegensatz zu Wildtyp- oder heterozygoten Blastozysten einen sehr kleinen Auswuchs, der die epitheliale Morphologie verloren hat, und nur wenig Riesenzellen. In Hinblick auf die innere Zellmasse bilden Wildtypen und Mutanten vergleichbare Kolonien, die der Mutanten setzen sich allerdings nicht so gut fest (Auman et al., 2002; Werling and Schorle, 2002).

Weiterführende Expressionsanalysen von molekularen Markern an extraembryonalen Geweben in AP-2 γ Mutanten an Tag 7,5 dpc zeigen, dass die Gene Pl-1 (*Placental lactogen 1*), Ada (*Adenosine Deaminase*) und der Transkriptionsfaktor Hand1 (*Heart And Neural crest Derivatives expressed transcript 1*) im verbliebenen Trophoblast normal exprimiert werden, wenn auch die Gesamtanzahl der Riesenzellen vermindert ist. Expression von Mash-2 (*achaete-scute complex homolog-like 2*) wurde im ektoplazentalen Kegel der Mutanten gefunden, wenn auch reduziert. FgfR2 (*fibroblast growth factor receptor 2*) und Bmp4 (*bone morphogenetic protein 4*) wurden exprimiert, obwohl die normale morphologische Organisation in den Mutanten fehlte. Die Expression von Cdx2 (*Caudal-related homeobox 2*) wurde im Wildtyp im extraembryonalem Ektoderm und Mesoderm gefunden, in den Mutanten war die Expression signifikant reduziert bzw. nicht mehr detektierbar. Ein weiteres Gen, das im extraembryonalen Ektoderm exprimiert wird, Eomes, konnte nicht detektiert werden. Auman et al. spekuliert deshalb, dass eine direkte Korrelation zwischen den Anwesenheit von AP-2 γ und der extraembryonalen Expression von Cdx2 und Eomes bestehen könnte; oder aber dass die Gewebe, in denen diese Gene normalerweise exprimiert werden, in den Mutanten fehlen oder abnormal sind (Auman et al., 2002).

In Studien mit Doppelmutanten wurde beobachtet, dass der Verlust von AP-2 α und AP-2 γ gleichzeitig die embryonale Letalität beschleunigt im Vergleich zum Verlust von einem der beiden Gene, was die existierende genetische Redundanz dieser beiden Gene im präimplantiven Stadium zeigt (Winger et al., 2006).

1.3 Zielsetzung

Bei der Analyse von homozygot AP-2 γ -defizienten Embryonen zeigte sich, dass diese Tiere an Tag 7,5 der Entwicklung ein deutlich geringeres Wachstum aufwiesen, als Wildtyp-Vergleichstiere; sie sterben und sind an Tag 9,5 dpc resorbiert (Werling and Schorle, 2002). Der ektoplazentale Keigel ist aufgrund einer verminderten Proliferation seiner Zellen reduziert und schlecht integriert; die Zellzahl der Trophoblast-Riesenzellen ist verringert und die Labyrinthschicht bildet sich nicht aus (Auman et al., 2002). Offensichtlich ist AP-2 γ an der Bildung des Trophektoderms und der extraembryonalen Gewebe beteiligt.

In meiner Dissertation soll die regulatorische Funktion von AP-2 γ in der Trophektodermentwicklung näher untersucht werden, dazu sollen zuerst murine Trophoblaststammzellkulturen (TS-Zellen) etabliert werden um zu analysieren, wie sich der Verlust von AP-2 γ in diesen *in vitro* TS-Kulturen auswirkt. Promotorstudien in embryonalen Stammzellen haben gezeigt, dass die drei Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog, die für Pluripotenz in ES Zellen verantwortlich sind, am Promotor von AP-2 γ gebunden sind und somit vermutlich dessen Transkription in ES-Zellen reprimieren. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass AP-2 γ , wie der Transkriptionsfaktor Cdx2, eine Schlüsselrolle in der Spezifizierung der trophektodermalen Zelllinie im Blastozystenstadium spielen könnte. Um dieses zu analysieren soll AP-2 γ in embryonalen Stammzellen überexprimiert werden und entsprechende Expressionsanalysen, insbesondere in Hinblick auf die Wechselwirkungen mit Cdx2 und anderen Pluripotenzgenen, durchgeführt werden.

Diese Analysen sollen einen Einblick in die Rolle von AP-2 γ in der frühen Embryogenese geben.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1.1 Chemikalien

100bp Leiter	New England Biolabs, Schwalbach
1kb Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
2-Propanol	Merck, Darmstadt
4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, München
6x Loading Dye Solution	Fermentas, St. Leon-Rot
Acrylamid Mix (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Antarktische Phosphatase Puffer	New England Biolabs, Schwalbach
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs, Schwalbach
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dinatriumhydrogensulfat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
Dodecylsulfatnatriumsalz (SDS)	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycerol	Sigma-Aldrich, München
Hefe-Extrakt	Merck, Darmstadt
HPLC-Aqua	Merck, Darmstadt
IGEPAL CA-630 (NP-40)	Sigma-Aldrich, München
Kalium-hexacyanoferrat (II)	Merck, Darmstadt

Kalium-hexacyanoferrat (III)	Merck, Darmstadt
Laemmli Probenpuffer 4x	Roth, Karlsruhe
Ligase-Puffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRad, München
Natriumacetat, 3M, pH4,6	Applied Biosystems, Warrington, GB
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natrium-Deoxycholat	Sigma-Aldrich, München
Natriumdihydrogensulfat	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide (Primer)	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS Tabletten	Sigma-Alrich, München
PCR Nucleotide Mix	Roche, Penzberg
Phenol/ Chloroform	Roth, Karlsruhe
PierceSuper Signal West Pice	Perbio, Bonn
PMSF (complete mini)	Roche, Mannheim
Präparierwerkzeuge	FST, Heidelberg
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Proteinleiter, prestained, 10-180 kDa	Fermentas, St. Leon-Rot
Puffer für Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Rediprime Labelling Kit	Amersham, Freiburg
Sephadex G50	Amersham, Freiburg
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
T4-Polymerase-Puffer (10x)	New England Biolabs, Schwalbach
Taqman Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Template Suppression Reagent (TSR)	Applied Biosystems
Tris-Base	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypton	Merck, Darmstadt
TWEEN 20	Sigma-Aldrich, München
X-Gal	Sigma-Aldrich
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe

2.1.1.2 Enzyme

Antarktische Phosphatase	New England Biolabs, Schwalbach
FideliTaq DNA Polymerase	USB, Staufen
M-MuLV Reverse Transkriptase	New England Biolabs, Schwalbach
Platinum Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
RNase A	Boehringer, Mannheim
RNase Out	Invitrogen, Karlsruhe
T4-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
T4-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.1.3 Verbrauchsmaterialien

4-Loch-Platten	Nunc, Wiesbaden
96-Loch-Platten (Falcon)	Becton Dickinson, France
Blaukappenröhrchen 15 ml	Greiner Labortechnik, Solingen
Blaukappenröhrchen 50 ml	Greiner Labortechnik, Solingen
Kanülen	Becton Dickinson, France
Küvette, Elektroporation	BioRad, München
PCR-Reaktionsgefäße 100 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Petrischalen 9cm	Greiner Labortechnik, Solingen
Platten Taqman	4titude, Berlin
QPCR Adhesive Clear seals	4titude, Berlin
Reaktionsgefäße 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme	Kodak, Rochester, USA
Roti-PVDF-Membran	Roth, Karlsruhe
Spritzen 1ml	Becton Dickinson, France

2.1.1.4 Kits

Qiagen Omniscript	Qiagen, Hilden
BCA Protein Assay Reagent Kit	Perbio, Bonn
Qiagen HiSpeed Maxi Kit	Qiagen, Hilden
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.1.5 Geräte

Bakterienschüttler	Innova 4000	New Brunswick Scientific
Blotting Chamber	Mini-PROTEAN-Tetra Cell	BioRad
Elektroporator	Gene Pulser II	Bio-Rad
ES-Zell-Inkubator	Cytoperm 2	Heraeus
Gelsysteme	50ml, 100ml, 250ml	Peqlab
Multiwell Plate washer		Sigma-Aldrich
Netzgerät	E143	Consort
Photometer	Bio-Photometer	Eppendorf
Speed-Vac	Concentrator 5301	Eppendorf
Sterilbank	Hera Safe	Kendro
Taqman	7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems
Thermocycler	PTC-200	MJ Research
Thermocycler	Gene Amp PCR System 2700	Applied Biosystems
Thermoschüttler	Thermomixer compact	Eppendorf
UV-System/ Kamera	Classic Uno	Intas
Wasserbad		GFL
Zentrifuge	Biofuge fresco	Haereus
Zentrifuge	5415D	Eppendorf
Zentrifuge	5417	Eppendorf

2.1.1.6 Plasmide

pBlueskript II KS +/-	Stratagene, Heidelberg
pCR2.1	Invitrogen, Karlsruhe
pCRII	Invitrogen, Karlsruhe
pCAGIP-Cdx2	erhalten von H. Niwa, Japan
pCAGIP-Cdx2ER	erhalten von H. Niwa, Japan
pCAGIP-AP-2 γ	hergestellt von F. Seiffe, Bonn
pCAGIP-AP-2 γ ER	selbst hergestellt

2.1.1.7 Oligonukleotide

Gen	Oligonukleotid-Sequenz (5' → 3')	Ann (°C)	Länge (bp)	evtl. Referenz
Eomes	F: TGATCATCACCAAACAGGGC R: ACTGTGTCTCTGAGAAGGTG	60	425	(Hemberger et al., 2004)
Oct4	F: GCGTTCGCTTTGGAAAGGTGTTG R: CTCGAACCACATCCTTCTCT	60	312	(Hattori et al., 2004)
Tpbpa	F: TGAAGAGCTGAACCACTGGA R: CAGGCAGTTCATATGTTGGG	60	522	(Hemberger et al., 2004)
PI-1	F: CTGCTGACATTAAGGGCA R: AACAAAGACCATGTGGGC	58	300	(Hemberger et al., 2004)
AP-2 γ	F: ATTTGATGACCAAGAACCCTTTG R: CACGAGAGACGTGAGGAGAGTGAC	60	326	
Cdx2	F: AAAGTGAGCTGGCTGCCACACTTG R: TCCATCAGTAGATGCTGTTTCGTGG	60	426	
Hand1	F: CAAGGCTGAACTCAAAAAGACGG R: AGATGGGTTGGAAGGGTGTGTC	60	487	(Tolkunova et al., 2006)
β -Actin	F: CCATCCTGCGTCTGGACCTG R: GTAACAGTCCGCCTAGAAGC	59	620	(Kunath et al., 2005)
AFP	F: TGCTGCAAATTACCCATGAT R: AAGGTTGGGGTGAGTTCTTG	60	191	(Ishii et al., 2007)
Gata-6	F: GCAATGCATGCGGTCTCTAC R: CTCCTGGTAGCACCAGCTCA	60	554	(Hay et al., 2004)
Nanog	F: AAAGGATGAAGTGCAAGCGGTGG R: CTGGCTTTGCCCTGACTTTAAGC	53	519	
Geno- typ	P1: AACAGGTTATCATTGTTGGGATT P2: CAATTTTGTCCAATTCTCCCTCAA P3: AATAGTCAGCCACCGCTTTACTAGG	55	300 334 700	(Werling and Schorle, 2002)
mAP2 γ cDNA	F1: GGACGCCATGTTGTGGAAAATAAC R: GGATCCCTTCCTGTGCTTTTCCATTTT	61	1300	
mESR	F: GGATCCCGAATTGAAATGGGTGCT R: GGATCCTCAGATCGTGTGGGGAAGCC	61	961	

2.1.1.8 Oligonukleotide quantitative RT-PCR (Taqman)

Gen	Assay ID
Eomes	Mm01351985_m1
Pou5f1 (Oct4)	Mm00658129_gH
Sox2	Mm0048869_s1
Nanog	Mm02019550_s1
Hand1	Mm00433931_m1
β -Actin	4352933E

2.1.1.9 Antikörper

Primäre Antikörper

AP-2 α	Active Motif, Rixensart, Belgium
AP-2 β	M. Moser, München
AP-2 γ (6E4/4)	Upstate, New York, USA
AP-2 γ (H77)	Santa Cruz, Heidelberg
AP-2 δ	M. Moser, München
AP-2 ϵ	M. Moser, München
Cdh3 (56C1)	NEOMARKERS, Fremont, CA
Oct3/4 (C10)	Santa Cruz, Heidelberg
β -Aktin	DAKO, Hamburg, Germany

Sekundäre Antikörper

anti-rabbit-HRP	DAKO, Hamburg, Germany
anti-mouse-HRP	DAKO, Hamburg, Germany
Alexa Fluor 488 oder 594	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.1.10 Bakterien

E.coli DH5 α	rekombinationsdefekter, suppressiver Bakterienstamm; EndA1, gryA96, hsdR17($r_k^- m_k^+$), lac, recA1, relA1, supE44, thi-1, F'[proAB, lac ^q ZDM15, Tn10=>tet ^r
---------------------	--

TOP10 F'

E.coli - Stamm:
 F' lacIq Tn10(TetR) mcrA Δ (mrr-hsdRMSmcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 rec A1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) end A1 nupG,
 Invitrogen, Karlsruhe

2.1.1.11 Mauslinien

129/SV-AP-2 γ heterozygote AP-2 γ -Linie, genetischer Hintergrund: 129/SV

129/SV-AP-2 γ flox heterozygot konditionale AP-2 γ -Linie, genetischer Hintergrund: 129/SV B6; CBA-Tg (Pou5f1-EGFP) 2Mnn/J, genetischer Hintergrund: C57/Bl6J

2.1.1.12 Zellen

TS AP-2 γ ^{+/+}	murine Trophoblast-Stammzellen,
TS AP-2 γ ^{flox/flox}	selbst etabliert
ES MG1.19	murine embryonale Stammzellen erhalten von M. Gassmann, Schweiz
ES AP-2 γ ^{+/+}	murine embryonale Stammzellen
ES AP-2 γ ^{-/-}	selbst etabliert
CJ7-ROSA β geo#31	murine embryonale Stammzellen, erhalten von R. Jäger, Bonn

2.1.1.13 Lösungen, Medien, Puffer

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Lösungen mit H₂O dd angesetzt.

10x Ladepuffer	49% Glycerol; 49% H ₂ O; 2% 50x TAE; 1 Spatelspitze Bromphenolblau; 1 Spatelspitze Xylencyanol
Lysispuffer für Zellen	10 mM NaCl; 10 mM Tris pH7,5; 10 mM EDTA; 0,5% Sarcosyl; 0,4 mg/ml Proteinase K
Lysispuffer Schwanzspitzen	50 mM Tris-HCl pH8; 100 mM EDTA; 100

1x TE pH8,0	mM NaCl; 1% SDS; 0,5 mg/ml Proteinase K
20x SSC pH7	10 mM Tris pH8,0; 1 mM EDTA
50x TAE	174g NaCl ; 88,2g Na-Citrat ; add 1l H ₂ O
5x LB-Medium	2M Tris; 1M NaOAc; 50 mM EDTA;
Ampicillin-Stammlösung	50g Trypton; 25 g NaCl; 25g Hefe-Extrakt;
Ethidiumbromid-Stammlösung	add 1l H ₂ O; autoklavieren
Qiagen-Puffer P1	100mg/ml Ampicillin
Qiagen-Puffer P2	10mg/ ml Ethidiumbromid
Qiagen-Puffer P3	50 mM Tris-HCl pH8; 10 mM EDTA; 100 µg/
Qiagen-Puffer QBT	ml RnaseA
Qiagen-Puffer QC	200 mM NaOH; 1% SDS
Qiagen-Puffer QF	3,0 M KAc pH 5,5
RIPA	750mM NaCl; 50mM MOPS pH7; 15%
PBST	Isopropanol; 0,15% Triton
PBSTM	1M NaCl ; 50mM MOPS pH7 ; 15%
10 x Laufpuffer	Isopropanol
10 x Transferpuffer	1,25 mM NaCl ; 50 mM Tris-HCl pH8,5 ;
1 x Transferpuffer	15% Isopropanol ;
Stripping-Puffer (Western)	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH7,2; 0,1%
Fixierlösung (LacZ)	SDS; 1% Triton X-100; 1%
Rinse-Solution I (LacZ)	Natriumdeoxycholat; 5 mM EDTA; 1mM
Rinse-Solution II (LacZ)	PMSF (complete mini)
	PBS; 0,1% TWEEN 20
	PBST; 5% Magermilchpulver
	30g/l Tris; 142g/l Glycin; 1% SDS;
	200 mM Tris-HCl; 150 mM Glycin ; 0,1%
	SDS
	10% 10x Transferpuffer ; 20% Methanol
	100 mM β-Mercaptoethanol ; 2% SDS ; 62,5
	mM Tris/HCl pH 6,7
	2% Formaldehyd; 0,125% Glutaraldehyd; in
	PBS
	2 mM MgCl ₂ ; in PBS
	2 mM MgCl ₂ ; 0,01% Natriumdeoxycholat;

Färbelösung (LacZ)

0,02% NP-40; in PBS

5 mM Kalium-hexacyanoferrat (II); 5 mM Kalium-hexacyanoferrat (III); 2 mM MgCl₂; 0,01% Natriumdeoxycholat; 0,02% NP-40; 50mg/ml X-Gal

2.1.2 Zellkultur

2.1.2.1 Chemikalien, Medien

4-Hydroxy-Tamoxifen	Sigma-Aldrich, München
BSA, fraction V	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco's MEM + Glutamax-1	GibcoBRL, Karlsruhe
FGF4, 1000x	R & D Systems, Wiesbaden
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Gelatine	Sigma-Aldrich, München
Heparin, 1000x	Sigma-Aldrich, München
Hepes	GibcoBRL, Karlsruhe
Leukaemia inhibiting factor (LIF)	Chemicon, Hofheim am Taunus
L-Glutamine	GibcoBRL, Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma-Aldrich, München
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, München
Nicht-essentielle Aminosäuren	GibcoBRL, Karlsruhe
PBS without Ca ²⁺ / Mg ²⁺	GibcoBRL, Karlsruhe
PD 98059 (MEK1 Inhibitor)	New England Biolabs, Schwalbach
Penicillin/ Streptomycin	Biochrome AG, Berlin
Puromycin	Sigma-Aldrich, München
RPMI 1640 – L-Glutamine + Phenolred	GibcoBRL, Karlsruhe
Sodium pyruvate	GibcoBRL, Karlsruhe
Trypsin 0,05%	PAN Biotech, Wien, Österreich
β-Mercaptoethanol	GibcoBRL, Karlsruhe

2.1.2.2 Lösungen/ Medien für die Zellkultur

Einfriermedium	10% DMSO; 90% FCS
ES-Zell-Medium	Dulbecco's MEM mit Glutamax-1; 50U/ml Pen/Strep; 1x nicht-essentielle Aminosäuren; 100 nM β -Mercaptoethanol; 1000U LIF/ml Medium; 15% FCS; 200 nM L-Glutamin
Feeder-Medium	500 ml Dulbecco's Mod Eagle Eye Medium; 10% FCS; 50U/ml Pen/Strep; 200 nM L-Glutamin
Gelatine	0,1% (w/v) Gelatine
Lysispuffer	100mM Tris pH8,5; 5mM EDTA; 0,2% SDS; 200mM NaCl; 100 μ g/ml Proteinase K
CM + F4H-Medium	75% CM-Medium, 25% TS-Medium, 1000x FGF4 (25ng/ml); 1000x Heparin (1 μ g/ml)
Einfriermedium TS	30% TS-Medium, 20% DMSO, 50% FBS
TS + F4H-Medium	10ml TS-Medium; 10 μ l 1000x FGF4 (25ng/ml); 10 μ l 1000x Heparin (1 μ g/ml)
TS-Medium	400ml RPMI 1640; 100ml FBS (20%); 5ml Sodium pyruvate (100mM); 5ml L-Glutamine (2mM); 1ml β -Mercaptoethanol (100 μ M); 5ml Pen/Strep (50U/ml)

2.1.2.3 Verbrauchsgegenstände

12-Lochplatte	Becton Dickinson, France
24-Lochplatte	Becton Dickinson, France
48-Lochplatte	Becton Dickinson, France
6-Lochplatte	Becton Dickinson, France
96-Lochplatte	Becton Dickinson, France
Aspirator tube assembly for microcapillary pipets	Sigma-Aldrich, München
Blaukappenröhrchen	Corning, USA
Cell scratcher	TPP, Schweiz

Cryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturschalen 10 cm	Becton Dickinson, France
Gewebekulturschalen 15cm	Greiner Labortechnik, Solingen
Reaktionsgefäße 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter (0,45µm)	Corning, USA

2.2. Methoden

2.2.1.1 Tierhaltung

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

2.2.1.2 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien der Maus

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

2.2.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient der exponentiellen Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten. Zur Genotypisierung der Mäuse wurde eine PCR durchgeführt, als Template wurde DNA aus Schwanzbiopsien der Mäuse verwendet. Bei einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielt ein Reaktionsansatz 10 µl DNA, jeweils 1 µl (15pM) forward und reverse Primer

(In4down, Ex5up, Ex6up), 1 µl (10mM) dNTPs, 5µl PCR-Puffer, 5µl (25mM) MgCl₂, sowie 0,5 µl (5U/µl) Polymerase und H₂O ad 50 µl. Die DNA wurde im Thermocycler für 45 sec bei 94°C denaturiert, die Annealingtemperatur betrug 55°C für 30 sec, die Extensionstemperatur betrug 72°C für 1 min für 8 min, die Zyklenzahl betrug 37.

Bei der Durchführung der Reverse-Transkriptase-PCRs enthielt ein Reaktionsansatz 1µl DNA, 5µl PCR-Puffer, 4µl MgCl₂ (25 mM), 1µl dNTPs (10mM), jeweils 1 µl forward- und reverse-Primer (10pM/µl) sowie 0,3 µl Taq-Polymerase (5U/µl) und wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50µl gebracht.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen im Gene Amp PCR System 2700 gefahren:

2 min 94°C

30 sec 94°C Denaturierung

30 sec 53-61°C Annealing Zyklenzahl: 25-35

50 sec 72°C Extension

3 min 72°C

Zur Amplifikation der mAP-2 γ cDNA und der mESR cDNA wurde eine Fidelity-Taq-Polymerase verwendet, diese besitzt eine Proofreading-Aktivität. Dabei enthielt ein Reaktionsansatz 1µl DNA, 5µl PCR-Puffer, 5µl MgCl₂ (25 mM), 1µl dNTPs (10mM), jeweils 1 µl forward- und reverse-Primer (10pM/µl) sowie 0,25 µl Fidelity-Taq-Polymerase (5U/µl) und wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50µl gebracht. Die DNA wurde im Thermocycler für 30 sec bei 94°C denaturiert, die Annealingtemperatur betrug 61°C für 30 sec, die Extensionstemperatur betrug 68°C für 1:30 min, die Zyklenzahl betrug 35.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Gemischen und deren Größenbestimmung. In Abhängigkeit der aufzutrennenden Fragmentgrößen wurden horizontale 0,8%ige, 1%ige, 1,5%ige und 2%ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde mit 1x TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid (0,5µg/ml) zugegeben, in die Gelkammer gegossen und ein entsprechender Kamm gewählt. Das erhärtete Gel wurde mit 1x TAE-Puffer überschichtet, die Proben mit 1/10 Volumen 10x Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 50-100V. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenz unter UV-Licht (320nm).

2.2.1.5 Analytischer und präparativer Verdau von DNA

Bei einem analytischem Verdau wurden 5µl Plasmid-DNA mit 2µl 10x Restriktionsenzym puffer und 0,5 µl (10U/µl) Restriktionsenzym versetzt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20µl gebracht. Der Ansatz wurde für 2h bei 37°C inkubiert.

Bei einem präparativen Verdau mit einem Gesamtvolumen von 70µl wurden 5-10µg Plasmid-DNA eingesetzt. Dem wurden 7µl 10x Restriktionsenzym puffer und 3µl (10U/µl) Restriktionsenzym zugegeben und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.1.6 Präparation von Dialyse-Schläuchen

Dialyseschläuche von 25mm Breite wurden in etwa 7 cm lange Stücke geschnitten und in 2%Na₂CO₃; 1mM EDTA 10 Minuten gekocht. Anschließend wurden die Stücke zwei Mal in destilliertem Wasser gewaschen, in 1mM EDTA autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.1.7 Elektroelution von DNA-Fragmenten

Die gewünschte Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in einen mit H₂O gespülten und unten mit einer Klammer verschlossenen Dialyseschlauch überführt. Zu dem Gelstück wurden 350µl TE gegeben und der Schlauch oben mit einer weiteren Klammer luftblasenfrei verschlossen. In eine Gelkammer mit 1x TAE wurde dieser Schlauch so platziert, dass die DNA aus dem Gel in den Puffer wandern konnte. Es wurde eine Spannung von 90V angelegt, nach 45min wurde die Polrichtung für 1min umgekehrt. Die DNA-haltige Lösung wurde aus dem Schlauch herauspipettiert, Phenol-/Chloroform-extrahiert und Ethanol präzipitiert.

2.2.1.8 Phenol-/Chloroform-Extraktion von DNA-Lösungen

Die Nukleinsäurelösung wurde mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gevortext und 5min bei 13.000rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, in dem im gleichen Volumen Chloroform vorgelegt war, wiederum gemischt und 5min bei 13.000rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde nochmals in ein neues Gefäß überführt und die DNA schließlich Ethanol-präzipitiert.

2.2.1.9 Ethanol-Präzipitation von DNA-Lösungen

Der DNA-Lösung wurde 1/10 des Volumens Natriumacetat (3M, pH4,6) und das 2-3fache Volumen an 100% Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde 30min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gefällt und anschließend für 20min bei 4°C zentrifugiert. Um überschüssige Salze

zu entfernen, wurde das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen und für 20min bei 37°C oder für 5min im Speed-Vac getrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte in H₂O bei -20°C.

2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

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

2.2.1.11 Herstellung von LB-Amp-Agarplatten

Eine 1 Liter Flasche LB-Agar wurde in der Mikrowelle bei geringer Wärmezufuhr erhitzt, bis sich der Agar vollständig gelöst hatte. Vor dem Gießen wurde der Agar auf etwa 60°C heruntergekühlt, Ampicillin (100µg/ml) hinzugegeben und ca. 20 Agarplatten (9cm Durchmesser) gegossen.

2.2.1.12 TOPO-Klonierung von PCR-Produkten

Für die TOPO-Klonierung wurde das TOPO-TA-Cloning Kit von Invitrogen verwendet, dabei wurde streng nach dem Herstellerprotokoll verfahren. 4 µl des aus dem Gel eluierten und Ethanol-präzipitierten PCR-Produkts wurden mit 1µl Salzlösung und 1µl des TOPO-Vektors versetzt und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Von diesem Reaktionsgemisch wurden 2µl zu den im Kit mitgelieferten kompetenten Zellen gegeben und 30min auf Eis inkubiert. Es schloss sich ein Hitzeschock von 42°C für 30sec an. Die Zellen wurden wieder für 3min auf Eis inkubiert, danach wurden 250µl SOC-Medium aus dem Kit zugegeben und die Zellen für 1h bei 37°C bei 300rpm geschüttelt. 50µl dieses Ansatzes wurden auf einer LB-Amp-Platte ausgestrichen, die übrigen Bakterien wurden für 2min bei 3000rpm pelletiert, in 50µl SOC-Medium aufgenommen und auf einer zweiten LB-Amp-Platte ausgestrichen. Es folgte die Inkubation ü.N. bei 37°C.

2.2.1.13 Präparation kompetenter Zellen

Eine Bakterienkultur wurde über Nacht in 50ml LB-Medium bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Von dieser Kultur wurde am folgenden Morgen 1ml in 100ml LB-Medium transferiert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,3 (Beginn der logarithmischen Teilungsphase) wachsen lassen. Dann wurden die Zellen auf 4°C abgekühlt und bei 2000rpm für 5min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50ml 50mM CaCl₂ resuspendiert und für 20min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 2000rpm für 5min wurde das Zellpellet in

10ml eiskalter CaCl_2 -Lösung mit 15% Glycerol resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Eis aliquotiert (100 μl), in flüssigen Stickstoff eingefroren und konnte dann bei -80°C aufbewahrt werden.

2.2.1.14 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen

100 μl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 5ng des zu transformierenden Plasmids oder mit 5 μl des Ligationsansatzes gemischt und für 20min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30sec, anschließend wurden die Bakterien nochmals für 3min auf Eis inkubiert. Dann wurden 500 μl 1x LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz für 30min bei 37°C und 750rpm geschüttelt. 50 μl wurden auf eine LB-Amp-Platte ausgestrichen, der Rest wurde 2min bei 3000rpm pelletiert, in 50 μl 1xLB-Medium resuspendiert und auf eine weitere LB-Amp-Platte ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

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

Von einer 3ml Übernachtskultur wurden ca. 1,5ml in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1min bei 13.000rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 150 μl Qiagen-Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300 μl Qiagen-Puffer P2 wurden die Zellen lysiert, die Neutralisation des Lysats und Fällung von SDS erfolgte durch Zugabe von 150 μl Qiagen-Puffer P3. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13.000rpm wurde der Überstand (600 μl) in ein neues Reaktionsgefäß, in dem 300 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vorgelegt waren, transferiert, gevortext und abermals 5min bei 13.000rpm zentrifugiert. Die in der oberen, wässrigen Phase sich befindende DNA wurde schließlich Ethanol-präzipitiert und in 40 μl H_2O aufgenommen.

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

Es wurde das HiSpeed Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet, dabei wurde streng nach Herstellerprotokoll verfahren. Eine 200ml Übernachtskultur wurde für 15min bei 5000rpm abzentrifugiert, das Bakterienpellet in 10ml Qiagen-Puffer P1 resuspendiert. Es wurden 10ml Qiagen-Puffer P2 zugegeben und die Zellen für 5min lysiert. Während dieser Zeit wurde eine Kappe auf eine „QIA-Filter-Maxi-Cartridge“ geschraubt und diese aufgestellt. Durch Zugabe von 10ml gekühltem Qiagen-Puffer P3 wurde das Lysat präzipitiert, genomische DNA und Proteine fallen aus. Das Lysat wurde sofort auf die „Cartridge“ gegeben und 10min inkubiert. In dieser Zeit wurde eine HiSpeed-Maxi-Säule mit 10ml Qiagen-Puffer QBT equilibriert. Das Lysat wurde auf die Säule ausgepresst, nach dem

Durchlaufen wurde mit 60ml Qiagen-Puffer QC gewaschen. Danach wurde ein 50ml Blaukappenröhrchen unter die Säule gestellt und die DNA mit 15ml Qiagen-Puffer QF eluiert. Zur DNA-Lösung wurden 10,5ml Isopropanol gegeben, gemischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch einen Qia-Präzipitator gepresst, die sich im Präzipitator befindliche DNA wurde mit 2x 600µl H₂O in ein Reaktionsgefäß eluiert.

2.2.1.17 DNA-Konzentrationsbestimmung im Photometer

Die Konzentration einer bestimmten DNA-Lösung lässt sich mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmen. Dabei misst man die DNA gegen ihr Lösungsmittel bei einer Wellenlänge von 260nm. Eine Absorption von 1 OD bei 260nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50µg/ml dsDNA. Der Quotient der Absorption bei 260nm und 280nm ist ein Maß für die Reinheit der DNA-Lösung, er sollte bei 1,8 liegen.

2.2.1.18 Linearisierung eines Targetingvektors

30µg Vektor-DNA wurden mit 7µl Puffer und 5µl (10U/µl) Restriktionsenzym versetzt, mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 70µl aufgefüllt und bei 37°C ü.N. inkubiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließend eine Ethanol-Präzipitation. Die DNA wurde in 70% Ethanol bei -20°C bis zur Elektroporation aufbewahrt.

2.2.1.19 RNA-Isolierung aus Zellen

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

2.2.1.20 cDNA-Synthese

Für eine cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA eingesetzt. Die RNA wurde mit 1 µl Oligo-d(T)-Primer, 2 µl dNTPs (10 mM) versetzt, auf 12 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt und 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl RT-Puffer, 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNase OUT und 1 µl M-MuLV-Reverse Transkriptase (15 U/µl) zugegeben. Die Reaktion wurde nun zur Erststrangsynthese 1 h bei 42°C und schließlich 5 min bei 85°C inkubiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

2.2.1.21 Isolierung von Proteinextrakten aus kultivierten Zellen

Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann in kaltem PBS von der Kulturplatte abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 1000 rpm für 3 min. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1ml RIPA-Puffer (bei einer 10cm Zellkulturschale) resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und dabei einige Male gevortext. Anschließend folgt ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13.000 rpm für 10 min. Der Überstand, der den Proteinextrakt enthält, wird abgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.1.22 Bestimmung der Proteinmenge

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte photometrisch mit dem BCA Proteinbestimmungs-Kit (BCA Protein Assay Kit, Pierce) und ermöglichte, dass für die semiquantitative Western-Blot-Analyse gleiche Mengen Protein aufgetragen werden konnten.

2.2.1.23 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach der Methode von Lämmli (Laemmli 1970). Es wurden 10%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet. Die aufgetragenen Proteinmengen je Gelspur betrug 20µg. Die zu analysierenden Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit 4fach konzentriertem Lämmli-Probenpuffer versetzt, und anschließend für 10min auf 95°C gekocht und so denaturiert. Die Proben wurden auf das Gel geladen und bei einer Stromstärke von 30 mA und einer Spannung von ca. 170 Volt für etwa 2 h elektrophoretisch aufgetrennt. Nach diesem Vorgang wurde das Gel von den Glasplatten gelöst.

2.2.1.24 Western-Blot und Detektion von Proteinen auf Membranen

Zum Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran wurde ein Elektrotransfer durchgeführt. PVDF-Membranen mussten vor dem Transfer in Methanol für 3 min aktiviert werden und wurden anschließend 2 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Protein-Transfer aus den Gelen wurde in einer Trans-Blot-Cell (BioRad) in gekühltem Transferpuffer über Nacht bei 30 V und 4°C durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran 5 min in PBS geschwenkt und anschließend eine Stunde bei RT in PBSTM geblockt. Die Detektion von Antigenen erfolgte indirekt; durch Inkubation der Membran mit einem Primärantikörper und der Behandlung mit dem entsprechenden sekundären Antikörper, an den das Enzym Meerrettichperoxidase (und, ECL-Detektionssystem, Amersham) gekoppelt ist, kann mittels Umsetzung von Substraten und Emission von Chemilumineszenz die spezifische Proteinbande in einer Dunkelkammer mit Hilfe von Entwicklergerät und Film sichtbar gemacht werden. Primäre und sekundäre Antikörper wurden in PBSTM entsprechend verdünnt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper betrug mindestens 2 h bei RT bzw. erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach dem Entfernen der Antikörper-Lösung wurde die Membran drei Mal mit PBST für 10 Minuten gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Der peroxidasegekoppelte Zweitantikörper wurde 1:5000 für 60 Minuten eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde die Membran für 5 Minuten mit ECL-Reagenz bedeckt. In einer Dunkelkammer wurde anschließend die Chemilumineszenz durch Exposition der Membran auf sensitiven Filmen (HyperFilm) detektiert. Die Verwendung von PVDF-Membran und der Antigen-Nachweis mittels des ECL-Systems ermöglichten durch sogenanntes „Stripping“ die Primärantikörper zu entfernen und die Membran mit einem anderen primären Antikörper erneut zu inkubieren. Dazu wurde die Membran 30 Minuten mit Stripping Buffer bei 60°C inkubiert und abschließend zwei Mal mit PBST für 20 Minuten gewaschen.

2.2.1.25 Immunfluoreszenzfärbungen

Die zu färbenden Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 4% PFA für 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden erneut zweimal mit PBS gewaschen, dann mit 0,1% Triton X-100/PBS für 5 min permeabilisiert und wieder zweimal mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in entsprechenden Verdünnungen in 10% FCS/0,1% Triton X-100/PBS bei 1h RT bis zu 4°C über Nacht. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit PBS und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, 1:400 in 10% FCS/0,1% Triton X-100/PBS für 1h bei RT. Für die Kernfärbung wurden die Zellen 5min mit

DAPI/PBS 1:500 für 5 min inkubiert, nach erneutem waschen mit PBS wurden von den Zellen Aufnahmen unter dem Fluoreszenzmikroskop gemacht.

2.2.1.26 LacZ-Färbung von Embryonen

Die präparierten Embryonen wurden in PBS gewaschen und mit kalter Fixierlösung für 1h inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen dreimal für 2 min in Rinse-Solution I und dann dreimal für 2 min in Rinse-Solution II gewaschen. Die Inkubation der Embryonen in der Färbelösung erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach einem Waschschrift mit PBS/3%DMSO wurden die Embryonen in PBS aufbewahrt.

2.2.2 Trophoblast-Stammzellkultur

Soweit nicht anders beschrieben, handelt es sich bei dem verwendeten PBS immer um PBS ohne Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen.

2.2.2.1 Präparation, Kultivierung und Inaktivierung embryonaler Fibroblasten

Fibroblasten (Feederzellen) wurden aus den Rümpfen von 14 Tage alten Embryonen gewonnen. Diese Mischpopulation besteht zum größten Teil aus Fibroblasten, die für eine spätere Selektion die gleiche Antibiotikaresistenz besitzen müssen, wie der Targetingvektor. Die trächtigen Weibchen wurden am entsprechenden Schwangerschaftstag durch zervikale Dislokation getötet, der Uterus entnommen und in PBS überführt. Die extraembryonalen Gewebe sowie die Organe und der Kopf der Embryonen wurden entfernt und die Rümpfe in 0,25% Trypsin transferiert. Das Gewebe wurde mit einer Schere zu einer breiartigen Masse zerkleinert, zusätzlich mit einer Pipette noch mehrmals auf- und abpipettiert und anschließend bei 37°C für 30min inkubiert. Danach wurden die Zellen durch ein Zellsieb vom übrigen Gewebe getrennt und in einem 50ml Blaudeckelröhrchen gesammelt. Es wurde Feedermedium zugegeben, 3min bei 1200rpm abzentrifugiert, in Feedermedium resuspendiert und auf 15cm-Platten ausplattiert (etwa 1 Platte pro Embryo). Die Feederzellen wurden in den folgenden Tagen gesplittet, wenn sie konfluent waren. Feederzellen sollten nicht öfter als 7 mal gesplittet werden, weil etwa ab dieser Passage Seneszenz auftritt. Durch die Behandlung der Feederzellen mit Mitomycin C (10µg/ml) für 2h im Inkubator bei 37°C wurde deren Proliferation gestoppt. MMC-behandelte Feederzellen sollten so kurz wie möglich in Kultur gehalten werden, deshalb wurde nach der Abnahme des Mitomycin C Feedermedium auf die Zellen gegeben und die Zellen am folgenden Tag eingefroren.

2.2.2.2 Zählen von Zellen

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

2.2.2.3 Einfrieren von Zellen

Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen trypsinisiert, vereinzelt, gewaschen und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in einem geeigneten Volumen Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) aufgenommen und ü.N. bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff transferiert.

2.2.2.4 Auftauen von Zellen

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

2.2.2.5 Herstellung von konditioniertem Medium (CM-Medium)

Die Trophoblast-Stammzellkulturen wachsen auch ohne Feederzellen auf nicht-gelatinisierten Gewebekulturplatten, wenn das Medium mit konditioniertem Medium angereichert wurde. Um dieses konditionierte Medium herzustellen, wurden auf eine 15cm Gewebekulturschale in 15ml TS-Medium 6×10^6 Feederzellen ausplattiert und für mindestens 3 Tage bei 37°C kultiviert. Dann wurde das Medium gesammelt, filtriert ($0,45\mu\text{m}$), aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Feederzellen konnten noch für die Herstellung von zwei weiteren Chargen von konditioniertem Medium verwendet werden.

2.2.2.6 Isolation von Blastozysten

Trächtige Weibchen wurden am Tag 3,5 nach der Befruchtung durch zervikale Dislokation getötet und das Abdomen mit 70% Ethanol desinfiziert. Bauchfell und Bauchdecke wurden eingeschnitten, der Uterus entnommen und auf einem Papiertuch von Fettgewebe befreit. In einer Schale wurden die beiden Uterusschenkel mit EF-Medium aus einer Spritze durchspült und die Blastozysten mit einer Transferkapillare in ein neues Schälchen mit einem Tropfen EF-Medium überführt. In eine 24-Loch-Platte, auf der $1,3 \times 10^6$ c/pl Feederzellen in TS + F4H-Medium ausplattiert waren, wurde in jedes Well eine Blastozyste platziert und im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.2.2.7 Kultivierung von Trophoblast-Stammzellen

Allgemein wurden für die Kultivierung der Trophoblast-Stammzellen während der gesamten Kultivierung die Feederzellen immer in der halben Dichte verwendet, wie sie sonst für die embryonale Stammzellkultur verwendet werden. Nach etwa 3 Tagen hat sich die Blastocyste auf den Feederzellen festgesetzt, die Zellen werden dann mit TS + F4H gefüttert. Nach einem weiteren Tag hat sich ein kleiner Auswuchs gebildet, der manchmal zerfällt, in diesem Zustand wurde dieser Zellklumpen passagiert und dabei disaggregiert. Dazu wurde das Medium entnommen und die Zellen zweimal mit 500 µl PBS gewaschen, 200 µl 0,05% Trypsin hinzugefügt und für 3min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Zellklumpen durch energisches auf- und abpipettieren mit einer 10µl-Pipette vereinzelt, die Trypsinisierung durch Zugabe von 200µl TS + F4H-Medium abgestoppt und die Zellen auf eine neue 24-Lochplatte gegeben, auf der bereits $1,3 \times 10^6$ Feederzellen in 1ml TS + F4H-Medium vorgegeben waren. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C kultiviert, das TS + F4H-Medium, das jedes Mal frisch hergestellt wurde, wurde alle 2 Tage gewechselt. Nach etwa 3-4 Tagen wurden flache, epitheliale Kolonien sichtbar, die Zellen wurden alle 4-5 Tage oder wenn sie zu 50% konfluent waren, passagiert. Dabei wurde bei jeder Passage eine jeweils größere Gewebekulturschale gewählt, also zuerst ein 24-Lochplatte, dann eine 12-Lochplatte, eine 6-Lochplatte und eine 10cm Gewebekulturschale. Die Zellen wurden dabei bis zur 10cm-Gewebekulturschale auf Feederzellen gehalten.

2.2.2.8 Trennung der Trophoblast-Stammzellen von Feederzellen

Ab der 10cm-Gewebekulturschale wurden die Trophoblast-Stammzellen in Abwesenheit von Feederzellen in CM + F4H-Medium gehalten. Zur Trennung der Trophoblastzellen von den Feederzellen wurden die Zellen nach der Trypsinisierung auf eine Gewebekulturschale gegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Dann wurde der Überstand abgenommen und in eine neue Schale überführt, die Feederzellen, die sich schneller absetzen, bleiben dabei auf der alten Platte; auf der neuen Platte befindet sich eine aus Trophoblast-Stammzellen bestehende Kultur.

2.2.2.9 Cre-Transduktion von TS-Zellen

TS-Zellen wurden auf eine 6-Lochplatte ausgesät. Bei der Cre-Transduktion wurde das in Glycerin gelöste Protein in der Endkonzentration von 7,5 µM dem CM + FGF4-Medium

zugegeben und auf die Zellen gegeben. Nach 18-20h Inkubation wurde das Medium gewechselt.

2.2.3 Embryonale Stammzellkultur

Soweit nicht anders beschrieben, handelt es sich bei dem verwendeten PBS immer um PBS ohne Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen.

2.2.3.1 Gelatinisieren von Gewebekulturschalen

Die Gewebekulturschalen und Platten wurden mit Gelatinelösung (0,1% in H_2O) beschickt, kurz im Inkubator inkubiert und anschließend die Lösung wieder abgesaugt.

2.2.3.2 Generierung embryonaler Stammzellen

Trächtige Weibchen wurden am Tag 3,5 nach der Befruchtung durch zervikale Dislokation getötet und das Abdomen mit 70% Ethanol desinfiziert. Bauchfell und Bauchdecke wurden eingeschnitten, der Uterus entnommen und auf einem Papiertuch von Fettgewebe befreit. In einer Schale wurden die beiden Uterusschenkel mit ES-Medium aus einer Spritze durchspült und die Blastozysten mit einer Transferkapillare in ein neues Schälchen mit einem Tropfen ES-Medium überführt. In eine 48-Loch-Platte, auf der $2,1 \times 10^6$ c/pl Feederzellen in ES-Medium + MEK1-Inhibitor (50 $\mu M/ml$) ausplattiert waren, wurde in jedes Well eine Blastozyste platziert und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach etwa 3 Tagen hat sich die Blastozyste auf den Feederzellen festgesetzt, nach einem weiteren Tag hat sich ein kleiner Auswuchs gebildet, der manchmal zerfällt, in diesem Zustand wurde dieser Zellklumpen passagiert und dabei disaggregiert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit 500 μl PBS gewaschen, 200 μl 0,05% Trypsin hinzugefügt und für 3min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Zellklumpen durch energisches auf- und abpipettieren mit einer 10 μl -Pipette vereinzelt, die Trypsinisierung durch Zugabe von 200 μl ES-Medium + MEK1-Inh. abgestoppt und die Zellen auf eine neue 24-Lochplatte gegeben, auf der bereits $2,1 \times 10^6$ Feederzellen in 1ml ES-Medium + MEK1-Inh. vorgegeben waren. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C kultiviert, das Medium wurde täglich gewechselt.

2.2.3.3 Kultivierung embryonaler Stammzellen

Pluripotente, murine embryonale Stammzellen werden durch die Kultivierung der inneren Zellmasse aus Blastocysten in Anwesenheit des Leukaemia Inhibiting Factors (LIF) gewonnen. Eine Wegnahme von LIF und eine zu hohe Zelldichte der embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) führt zu Differenzierungsprozessen und somit zu einem Verlust

der Pluripotenz. Deshalb wurden die Zellen regelmäßig gesplittet. Die embryonalen Stammzellen wurden auf gelatinisierten Gewebekulturschalen auf einer Schicht embryonaler Feederzellen in ES-Medium kultiviert und das Medium täglich gewechselt.

2.2.3.4 Splitten von ES-Zellen

Um die Differenzierung der ES-Zellen aufgrund einer zu hohen Zelldichte zu verhindern, wurden diese bei Bedarf im Verhältnis 1:2 bis 1:10 gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 0,05% Trypsin für 4min im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Nach dem Vereinzeln durch mehrmaliges auf- und abpipettieren wurden die Zellen mit ES-Medium gewaschen, bei 1200rpm für 4min pelletiert, in einer entsprechenden Menge ES-Medium aufgenommen und ausplattiert.

2.2.3.5 Elektroporation von ES-Zellen

Die ES-Zellen einer 10cm-Schale (1×10^7 Zellen) wurden trypsinisiert, vereinzelt und zweimal in eiskaltem RPMI 1640-Medium gewaschen. Die Zellen wurden in 800µl eiskaltem RPMI 1640-Medium resuspendiert und in eine eiskalte Elektroporationsküvette gegeben, in die 30µg des linearisierten Targetingvektors vorgelegt waren. Die ES-Zellen wurden mit 230V/cm und 500µF elektroporiert, weitere 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in unterschiedlichen Konzentrationen ausplattiert.

2.2.3.6 Selektion

24h nach der Elektroporation wurde mit der Puromycinselektion (1,4µg/ml) begonnen und die Zellen in Selektionsmedium überführt, das Medium wurde täglich gewechselt. Nach etwa 3-4 Tagen unter Selektion waren resistente Kolonien sichtbar.

2.2.3.7 Picken der selektionierten ES-Klone

Nach Erreichen der gewünschten Koloniegröße wurden die Klone gepickt, in einer 96-Lochplatte trypsinisiert und auf einer weiteren 96-Lochplatte, die bereits mit Feederzellen und ES-Medium beschickt war, ausplattiert. Als die Zellen dieser Platte konfluent waren, wurden sie im Verhältnis 1:2 auf 2 neue 96-Lochplatten mit Feederzellen gesplittet. Eine dieser beiden 96-Lochplatten wurden bei gewünschter Koloniegröße bei -80°C eingefroren. Dabei wurden die einzelnen Wells nach Zugabe des Einfriermediums mit Mineralöl überschichtet, welches die Kondensierung beim späteren Auftauen verhindert. Die Zellen der zweiten Platte wurden lysiert und die DNA präpariert.

2.2.3.8 Isolierung der ES-Zell-DNA

Die Zellen der 96-Lochplatte wurden mit 55µl/well Lysispuffer + Proteinase K ü.N. bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten auf Raumtemperatur abgekühlt, pro Well 100µl 100% Ethanol hinzugeben und die Platte bei RT für 2h leicht geschwenkt, die DNA wurde in Fäden sichtbar. Das Ethanol wurde anschließend abgenommen, die DNA dann zweimal mit 80% Ethanol gewaschen, die Platte bei RT etwa 30min getrocknet und in 50µl H₂O aufgenommen.

2.2.3.9 Transfektionen von MG1.19 ES-Zellen

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf ein 6-well in entsprechender Zellzahl (1×10^6 c/well) so ausplattiert, dass sie am nächsten Tag etwa 90% konfluent waren. Zum Transfizieren wurde Lipofectamine 2000 verwendet, 10 µl Lipofectamine 2000 wurden mit 250µl ES-Medium ohne FCS gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 4µg Plasmid-DNA wurden ebenfalls mit 250 µl ES-Medium ohne FCS gemischt. Anschließend wurden beide Proben vereinigt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit 1500 µl frischem ES-Medium/Loch versetzt und das Lipofectamine-DNA-Gemisch zugegeben. 24h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt, wobei dabei von ES-Medium auf CM + F4H –Medium gewechselt wurde, sowie die Selektion mit 1,4µg/ml Puromycin begonnen. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen fotografiert und anschließend aus ihnen RNA isoliert oder Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von AP-2 γ wurde vor der Implantation im Trophektoderm detektiert

Es war bereits publiziert, dass AP-2 γ ab dem Morulastadium im murinen Embryo exprimiert wird und bei fortschreitender Entwicklung nach der Implantation im Trophektoderm weiterhin exprimiert wird (Auman et al., 2002). Um einen genaueren Einblick in die Rolle von AP-2 γ in der frühen murinen Entwicklung zu erhalten, wurde die Expression von AP-2 γ in präimplantiven Embryonalstadien untersucht. Durch eine RT-PCR konnte AP-2 γ mRNA im Morula- und Blastozystenstadium nachgewiesen werden (Abb. 3.1 A).

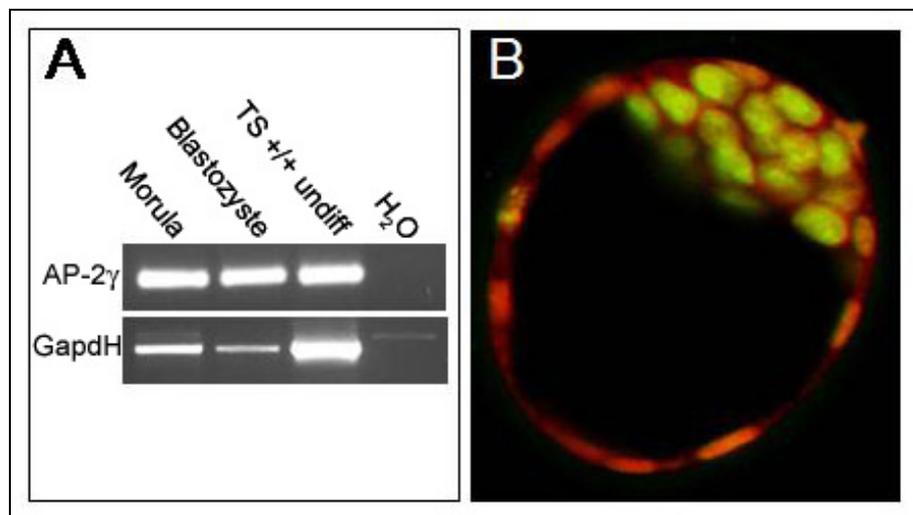


Abb. 3.1: AP-2 γ wird im Blastozystenstadium in trophektodermalen Zellen exprimiert

A: RT-PCR zum Nachweis von AP-2 γ in präimplantiven Embryonalstadien. RNA wurde aus mehreren Morulas bzw. Blastozysten gewonnen, als Positivkontrolle wurden undifferenzierte TS-Zellen verwendet, als endogene Kontrolle GapdH. B: Immunfluoreszierende Lokalisation von AP-2 γ in einer Blastozyste (E3,5), die Expression von AP-2 γ (rot) kann in den Zellkernen der äußeren Zellen detektiert werden, das Protein von Oct4 (grün) wird in den Zellkernen der inneren Zellmasse nachgewiesen.

Desweiteren wurden zur genaueren Lokalisation der AP-2 γ -Expression Immunfluoreszenzfärbungen an Blastozysten durchgeführt, dabei konnte das AP-2 γ Protein in den Zellkernen der äußeren Zellschicht, dem Trophektoderm, detektiert werden; in den Zellen der inneren Zellmasse wird AP-2 γ nicht exprimiert, in den Nuklei dieser Zellen konnte die Expression des Pluripotenzgens Oct4 nachgewiesen werden (Abb. 3.1 B).

3.2 AP-2 γ wird *in vitro* in Trophoblast-Stammzellkulturen exprimiert

Da AP-2 γ im murinen Embryo bereits vor der Implantation im Trophektoderm exprimiert wird, sollte die genaue Aufgabe, Funktion und Regulation dieses Transkriptionsfaktors in dieser trophektodermalen Zelllinie näher analysiert werden. Zu diesem Zweck mussten zunächst *in vitro*-Zellkulturen von Trophoblast-Stammzellen (TS-Zellen) generiert und charakterisiert werden.

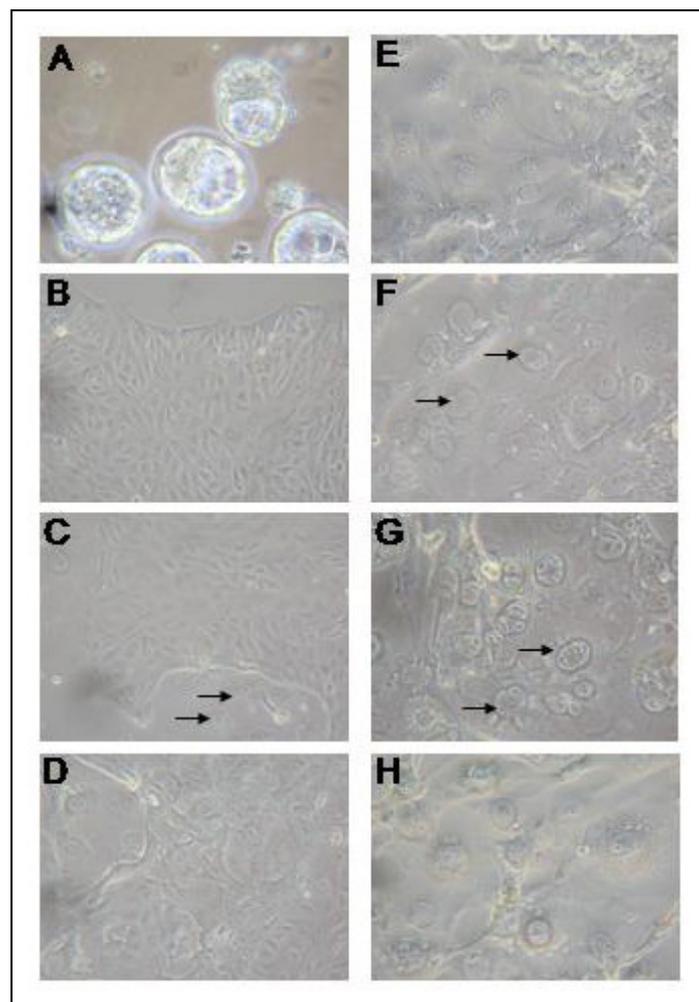


Abb. 3.2: Differenzierung von Trophoblast-Stammzellen

Trophoblast-Stammzellkulturen (TS-Zellen) wurden aus Blastozysten (A) etabliert. In Phasenkontrastaufnahmen zeigten sie im undifferenzierten Zustand (B) eine flache, epitheliale Koloniemorphologie. Durch die Wegnahme von FGF4 wurde die Differenzierung induziert, die Morphologie wurde an Tag 1 (C), Tag 2 (D), Tag 4 (E), Tag 8 (F), Tag 10 (G) und Tag 13 (H) nach Induktion der Differenzierung dokumentiert. Die TS-Zellen differenzierten zu Riesenzellen aus (Pfeile in C, F und G).

Die aus Blastozysten (Abb. 3.2 A) etablierten TS-Kolonien zeigten im undifferenzierten Stadium die typische epitheliale, flache Morphologie von Trophoblast-Stammzellen (Abb. 3.2 B) (Tanaka et al., 1998). Mit der Wegnahme des Wachstumsfaktors FGF4 konnte die Differenzierung der TS-Zellen induziert werden, bereits nach einem Tag konnte man einige sehr große, polynukleäre Zellen, die Riesenzellen, erkennen (Abb. 3.2 C). Bei fortschreitender Differenzierung waren immer mehr dieser invasiven Riesenzellen in der Kulturschale zu finden (Abb. 3.2 D-F), bis sie ab etwa Tag 10 der Differenzierung beinahe ausschließlich vorhanden waren (Abb. 3.2 G, H). Die morphologischen Beobachtungen weisen darauf hin, dass es sich bei diesen etablierten Zellkulturen um TS-Zellkulturen handelt.

Um diesen Hinweis nicht nur auf morphologischer Beobachtung, sondern auch auf molekularer Ebene zu überprüfen, wurden RT-PCR Analysen mit charakteristischen TS-Markern im undifferenzierten Zustand und während der Differenzierung durchgeführt (Abb. 3.3).

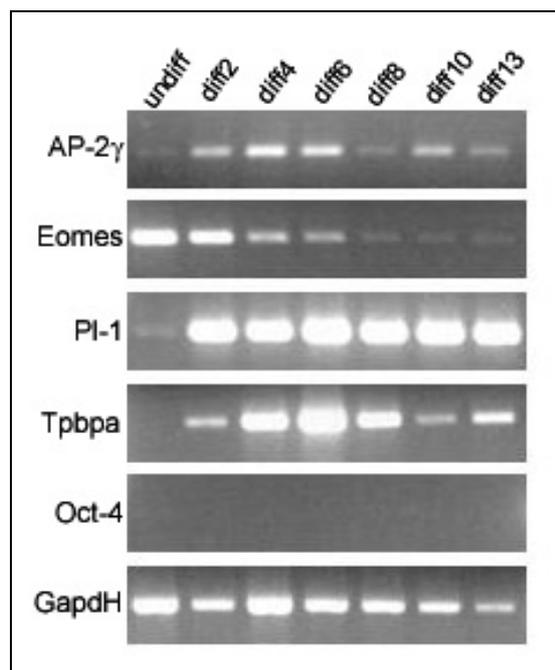


Abb. 3.3: RT-PCR Analyse von AP-2 γ und Trophoblast-Stammzell-Markergenen während der Differenzierung von TS-Zellen

Die TS-Zellen wurden in CM + FGF4-Medium gehalten; um die Differenzierung zu induzieren, wurde der Wachstumsfaktor FGF4 weggenommen. Als endogene Ladekontrolle diente GapdH.

Die Expression einiger bekannter TS-Marker (Tanaka et al., 1998) verhielt sich wie erwartet; Eomes, als Marker für undifferenzierte TS-Zellen, wurde in undifferenzierten TS-Zellen stark exprimiert und während der Differenzierung langsam, aber stetig herunterreguliert. Dagegen wurde der Marker PI-1, als frühes Markergen für die Differenzierung zu Riesenzellen, in undifferenzierten TS-Zellen sehr schwach exprimiert, aber direkt mit beginnender Differenzierung an Tag 2 bereits stark hochreguliert und konnte bis zum Ende der Differenzierung an Tag 13 detektiert werden. Der Marker für spätere Differenzierung Tpbpa wurde ab Tag 4 stark exprimiert, hatte seine stärkste Expression an Tag 6 der Differenzierung und wurde bis Tag 13 langsam wieder runterreguliert. AP-2 γ mRNA konnte in undifferenzierten TS-Zellen detektiert werden, die Expression wurde während der Differenzierung hochreguliert, etwa ab Tag 8 der Differenzierung konnte allerdings eine leichte Herunterregulation detektiert werden. In diesem Experiment ist AP-2 γ in undifferenzierten TS-Zellen nur recht schwach detektiert worden, in späteren Analysen (Abb. 3.13) war die AP-2 γ Expression in diesem Stadium wesentlich höher. Genexpression eines Markers für Zellen der inneren Zellmasse, Oct4, war nicht detektierbar.

Somit konnte anhand der Morphologie und durch Analyse des Expressionsmusters festgestellt werden, dass es sich bei den aus Blastozysten etablierten Zellkulturen tatsächlich um Trophoblast-Stammzellkulturen (TS-Zellen) handelte.

Im Folgenden sollte nun überprüft werden, ob die *in vivo* im Trophektoderm vorgefundene Expression des Proteins von AP-2 γ sich auch *in vitro* in den TS-Kulturen widerspiegelt. Ebenfalls sollte die Expression der anderen Mitglieder der AP-2-Familie, AP-2 α , AP-2 β , AP-2 δ und AP-2 ϵ im Trophoblast näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Proteinanalysen (Western Blot Analysen) durchgeführt, in denen Antikörper gegen die fünf AP-2-Proteine gerichtet waren (Abb. 3.4). Untersucht wurde die Proteinmenge der AP-2-Proteine in undifferenzierten TS-Zellen und differenzierten TS-Zellen, von Tag 2 bis Tag 13 der Differenzierung; ebenfalls wurde die Menge der AP-2-Proteine in Proteinextrakten von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) im undifferenzierten und an Tag 5 der Differenzierung analysiert. In undifferenzierten TS-Zellen findet man wenig Protein an AP-2 α , mit beginnender Differenzierung an Tag 2 konnte ein Anstieg in der Proteinmenge detektiert werden, diese Menge nimmt allerdings im Laufe der Differenzierung bis Tag 13 langsam ab. AP-2 β Protein konnte in undifferenzierten TS-Zellen nicht gefunden werden, aber bei beginnender Differenzierung der TS-Zellen wird AP-2 β nachgewiesen und während der gesamten Differenzierung etwa in gleicher Menge beibehalten. Große Proteinmengen

von AP-2 γ konnten bereits in undifferenzierten TS-Zellen detektiert werden, an Tag 2 und Tag 4 der Differenzierung nimmt die Proteinmenge nochmals stark zu. Ab Tag 6 wird die Proteinmenge ein wenig reduziert, ist aber bis Tag 13 der Differenzierung sehr stark nachweisbar. AP-2 δ und AP-2 ϵ Proteine konnten in den Trophoblast-Stammzellen nicht detektiert werden, was bedeutet, dass AP-2 δ und AP-2 ϵ in der Trophoblastentwicklung keine Rolle spielen. Die Proteinanalysen zeigen, dass AP-2 γ von allen AP-2-Proteinen hauptsächlich im Trophektoderm vorzufinden ist.

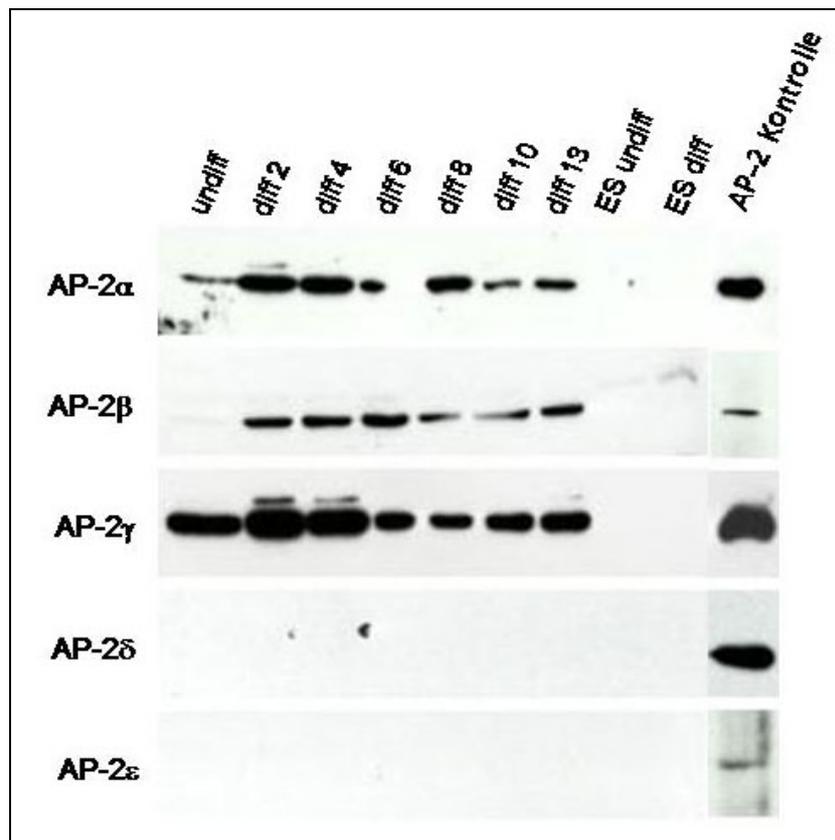


Abb. 3.4: Western-Blot-Analyse von allen fünf AP-2 Proteinen während der Differenzierung von Wildtyp TS- und ES-Zellen

TS-Zellen wurden in CM + FGF4-Medium gehalten, durch die Wegnahme von FGF4 wurde die Differenzierung induziert. ES-Zellen wurden in ES-Medium gehalten, hier wurde die Differenzierung durch das Fehlen von LIF induziert. Als Positivkontrolle wurde bei AP-2 α , AP-2 β , AP-2 δ und AP-2 ϵ in vitro translatierter Proteinextrakt verwendet, bei AP-2 γ Protein von muriner Plazenta E12,5.

Neben der Expressionsanalyse von AP-2 γ in TS-Kulturen wurde zusätzlich überprüft, ob das Protein auch *in vitro* in den Zellkernen der TS-Zellen zu finden ist, so wie dieses in der *in*

in vivo Situation in der Blastozyste festgestellt wurde (Abb. 3.1 B). Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen an TS-Kulturen im undifferenzierten Zustand und nach 4 Tagen Differenzierung durchgeführt (Abb. 3.5). Dabei konnte das AP-2 γ Protein (Abb. 3.5 A und B) ganz deutlich in den Nuklei der TS-Zellen detektiert werden. Dieses wird beim Übereinanderlegen der AP-2 γ Färbung und der Kernfärbung durch DAPI deutlich (Abb. 3.5 E und F), außerdem ist AP-2 γ auch während der Differenzierung weiterhin im Zellkern lokalisiert (Abb. 3.5 B).

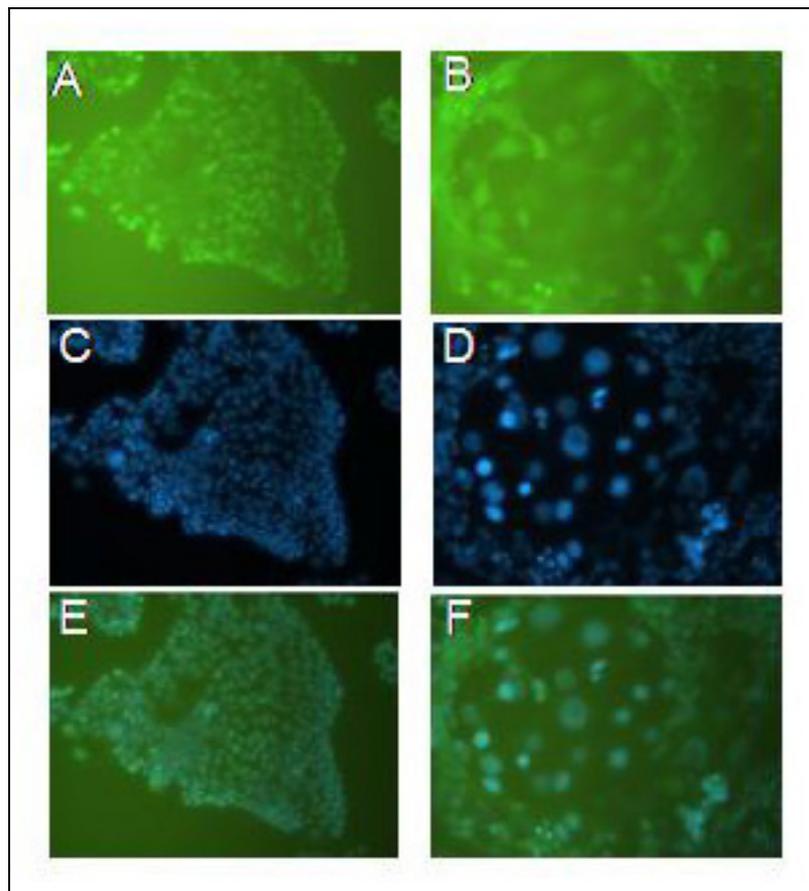


Abb. 3.5: AP-2 γ ist *in vitro* in den Zellkernen von TS-Zellen lokalisiert

Immunfluoreszenzfärbungen von undifferenzierten (A, C und E) und an Tag 4 (B, D und F) differenzierten TS-Zellen. Das Protein von AP-2 γ wurde mit einem Anti-AP-2 γ -Antikörper (A, B, grün) detektiert, die Zellkerne wurden mit Diamidinophenylindole (C, D, DAPI, blau) gefärbt. Zur Veranschaulichung der Lokalisation von AP-2 γ wurden die Aufnahmen mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms übereinander gelegt (E, F).

Im Western Blot konnte zum einen gezeigt werden, dass embryonale Stammzellen sowohl im pluripotenten undifferenzierten Stadium, als auch nach Wegnahme von LIF im

andifferenzierten Stadium, keines der fünf AP-2-Proteine zu detektieren ist. Zum anderen konnte festgestellt werden, dass AP-2 γ von den Proteinen der AP-2-Familie der in der größten Menge vorzufindende Transkriptionsfaktor in TS-Zellen ist. Das AP-2 γ Protein in TS-Kulturen konnte in undifferenzierten wie in differenzierten TS-Zellen im Zellkern lokalisiert werden. Da außerdem nur der Verlust von AP-2 γ zu früher embryonaler Letalität führt (Auman et al., 2002; Werling and Schorle, 2002), wurde im Folgenden die Rolle von AP-2 γ im Trophektoderm genauer untersucht.

3.3 AP-2 γ defiziente Embryonen bilden keine TS-Linien *in vitro*

In Studien mit AP-2 γ Knockout-Mäusen wurde festgestellt, dass der Verlust von AP-2 γ zu einer Reduktion der Zellproliferation im extraembryonalen Ektoderm und ekto-plazentalen Kegel führt und die Anzahl der Riesenzellen reduziert ist; deshalb entwickelt sich die Labyrinthschicht nicht und der Embryo stirbt an Mangelernährung (Werling and Schorle, 2002).

Um festzustellen, welche regulatorischen Funktionen AP-2 γ während der frühen Embryogenese im Trophektoderm übernimmt, sollten AP-2 γ -defiziente TS-Kulturen etabliert werden, um Vergleiche zu Wildtyp-TS-Kulturen ziehen zu können. Dazu wurden Blastozysten E3,5 aus heterozygoten AP-2 γ -Verpaarungen isoliert und in TS-Medium + FGF4 auf teilungsinaktivierten Fibroblasten (Feederzellen) in Kultur genommen. Nach etwa 3-4 Tagen hatten sich die Blastozysten festgesetzt und sowohl innere Zellmasse, als auch trophektodermale Auswüchse, die Riesenzellen mit den typischen großen Zellkernen und großem Cytoplasma enthielten gebildet; dabei zeigten diese Auswüchse von AP-2 γ defizienten Blastozyten eine geringere Größenausprägung, als Wildtyp-Blastozysten, was bereits schon beobachtet wurde (Werling and Schorle, 2002). Die Blastozysten mit den Auswüchsen wurden gesplittet, die Zellen dabei vereinzelt und weiterhin auf Feederzellen in Kultur gehalten, ab Passage 3 (P₃) bis Passage 5 (P₅) etwa waren pro Ansatz genügend Zellen zur Genotypisierung vorhanden. Da die TS-Zellen möglichst früh genotypisiert werden sollten und erst ab etwa P₁₀ feederfrei gehalten werden konnten, wurden Feederzellen mit konditionalen AP-2 γ -Allelen, in denen also das fünfte Exon ist von LoxP-Sites flankiert ist, verwendet. Diese Feederzellen zeigen in einer AP-2 γ -Genotypisierungs-PCR eine eindeutig andere Bandengröße (334 bp), als AP-2 γ -Wildtyp-Zellen (300 bp) oder ein AP-2 γ defizientes Allel (700 bp), AP-2 γ Wildtyp- oder defiziente Allele können nur von

den TS-Zellen stammen. Mit dieser Methode war es möglich, den Genotyp der etablierten TS-Zellen eindeutig in einer PCR zu bestimmen (Abb. 3.6).

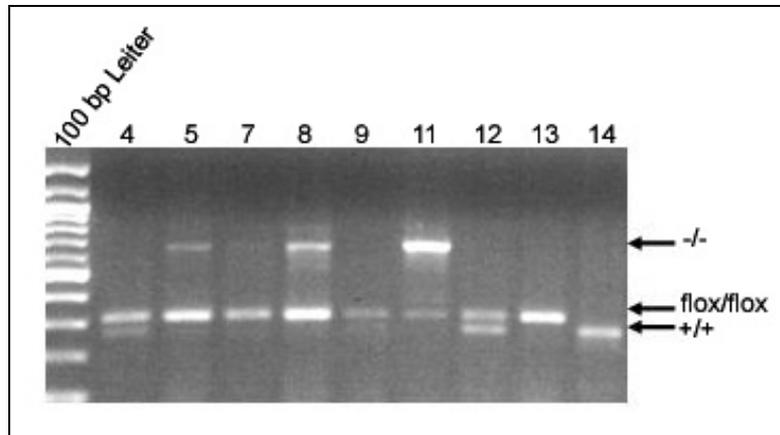


Abb. 3.6: PCR-Genotypisierung von TS-Zellen P₃-P₅

Die verschiedenen Zelllinien sind durch unterschiedliche Nummern gekennzeichnet. Pfeile weisen auf Banden vom AP-2 γ Wildtyp-Allel (+/+), vom konditionalen Allel (flox/flox) und vom AP-2 γ defiziente Allel (-/-) hin.

Bei der Genotypisierung in frühen Passagen (P₃ bis P₅) konnten noch alle drei zu erwartenden Genotypen nachgewiesen werden, nach einigen weiteren Passagen (P₁₀) waren ausschließlich nur noch AP-2 γ -Wildtyp-Kulturen vorhanden (Tab. 3.1). Insgesamt konnten aus 22 Blastozysten 13 TS-Linien gewonnen werden, diese Linien waren vom Genotyp ausnahmslos AP-2 γ Wildtyp, keine Linie war vom Genotyp her AP-2 γ heterozygot oder AP-2 γ defizient (Tab. 3.1). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass AP-2 γ eine essentielle Rolle bei der Etablierung von TS-Kulturen spielt, wie dieses bereits für die Gene Eomes, Cdx2, Elf5 und Ets2 gefunden wurde (Donnison et al., 2005; Niwa et al., 2005; Russ et al., 2000; Wen et al., 2007).

Verpaarung	Anzahl der Auswüchse an P ₁	Genotyp an P ₃ -P ₅	Genotyp an P ₁₀
AP-2 γ ^{+/-} X AP-2 γ ^{+/-}	22	AP-2 γ ^{+/+} : 13 AP-2 γ ^{+/-} : 5 AP-2 γ ^{-/-} : 4	AP-2 γ ^{+/+} : 13 AP-2 γ ^{+/-} : 0 AP-2 γ ^{-/-} : 0

Tab. 3.1: AP-2 γ ^{-/-} Blastozysten bilden keine TS-Kulturen in vitro

3.4 ES-Linien können aus AP-2 γ ^{-/-} Blastozysten generiert werden

AP-2 γ defiziente Embryonen implantieren sich nicht vollständig (Auman et al., 2002; Werling and Schorle, 2002) *in vivo* und es war nicht möglich, TS-Kulturen *in vitro* von AP-2 γ defizienten Blastozysten zu etablieren. Es wurde der Versuch gestartet, AP-2 γ defiziente ES-Zellen zu generieren, um zu unterstreichen, dass der Implantationsdefekt mit einer gestörten Trophoblastentwicklung einher geht, die Entwicklung des Epiblasten aus der inneren Zellmasse aber nicht vom Verlust von AP-2 γ beeinflusst ist. Dazu wurden Blastozysten aus AP-2 γ heterozygoten Verpaarungen isoliert und in ES-Medium auf Feederzellen kultiviert. Nach 3-4 Tagen hatte sich ein Auswuchs gebildet, der bei den AP-2 γ defizienten Linien schlechter ausgebildet war (Abb. 3.7 B), als bei Wildtyp-Blastozysten (Abb. 3.7 A).

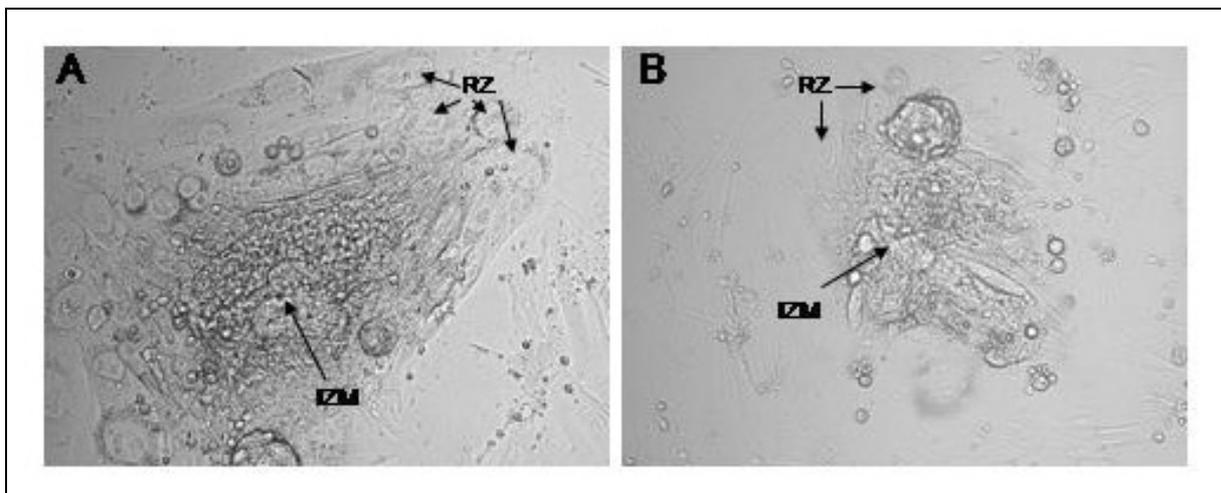


Abb. 3.7: Phasenkontrastaufnahmen von AP-2 γ ^{+/+} (A) und AP-2 γ ^{-/-} (B) Blastozysten an Tag 4 in Kultur. AP-2 γ ^{-/-} Blastozysten zeigen einen wesentlich kleineren Auswuchs und nur sehr wenige Riesenzellen. Abkürzungen: IZM: innere Zellmasse; RZ: Riesenzellen.

Die Blastozysten wurden gesplittet und weiterhin auf Feederzellen in Kultur gehalten, ab Passage 3 (P₃) bis Passage 5 (P₅) wurden die Zellen genotypisiert (Abb. 3.8). Dabei konnten alle drei zu erwartenden Genotypen nachgewiesen werden, insgesamt konnten aus 29 Blastozysten 12 ES-Linien gewonnen werden, von diesen Linien waren 5 AP-2 γ Wildtyp, 2 AP-2 γ heterozygot und 5 AP-2 γ defizient (Tab. 3.2). Dieses Ergebnis zeigt nochmals, dass der Implantationsdefekt bei AP-2 γ defizienten Mäusen mit einer gestörten Trophoblastentwicklung einher geht, die Bildung des Epiblasten nicht betroffen ist.

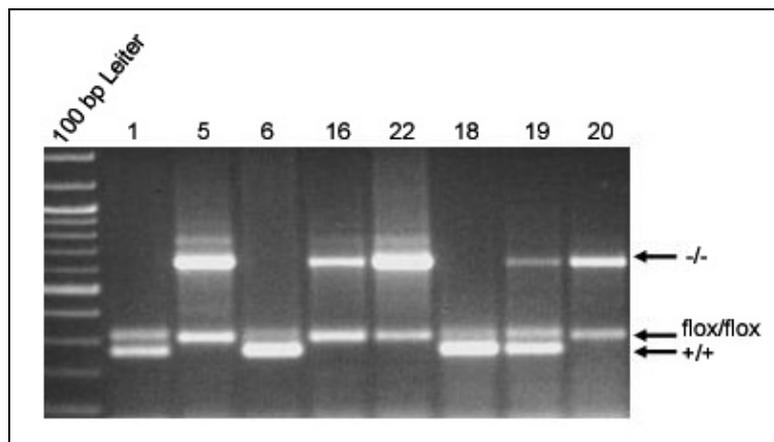


Abb. 3.8: PCR-Genotypisierung von ES-Zellen P₃-P₅

Die verschiedenen Zelllinien sind durch unterschiedliche Nummern gekennzeichnet. Pfeile weisen auf Banden vom AP-2 γ Wildtyp-Allel (+/+), vom konditionalen Allel (flox/flox) und vom AP-2 γ defiziente Allel (-/-) hin.

Verpaarung	Anzahl der Auswüchse an P ₁	Genotyp an P ₃ -P ₅
AP-2 γ ^{+/-} X AP-2 γ ^{+/-}	29	AP-2 γ ^{+/+} : 5 AP-2 γ ^{+/-} : 2 AP-2 γ ^{-/-} : 5

Tab. 3.2: AP-2 γ ^{-/-} Blastozysten bilden ES-Kulturen *in vitro*

3.5 AP-2 γ wird bei der Erhaltung und Selbsterneuerung in TS-Kulturen gebraucht

Es war bereits festgestellt worden, dass AP-2 γ essentiell für die Etablierung von Trophoblast-Stammzellen ist, folglich stellte sich als nächstes die Frage, ob AP-2 γ auch eine Funktion bei der Erhaltung der trophektodermalen Stammzellkultur spielt. Zu diesem Zweck sollten TS-Linien mit konditionalen AP-2 γ Allelen (AP-2 γ ^{flox/flox}), in denen das fünfte Exon des AP-2 γ -Gens von LoxP-Sites flankiert ist, etabliert werden; durch die Verwendung der Cre-Rekombinase sollte der Verlust des fünften Exons induziert werden, um auf diese Weise AP-2 γ defiziente TS-Linien zu generieren.

Insgesamt konnten 10 AP-2 γ ^{flox/flox}-TS-Linien etabliert werden. Die AP-2 γ ^{flox/flox}-TS-Zellen wurden mit einem transduzierenden Cre-Protein (His-TAT-NLS-Cre, HTNCre) behandelt,

dieses Cre-Protein ist membranpermeabel und induziert in Zellen die Rekombination mit hoher Effizienz (Peitz et al., 2007). Bereits einen Tag nach der Cre-Transduktion der AP-2 $\gamma^{flox/flox}$ –TS-Zellen konnten Veränderungen in der Zellmorphologie festgestellt werden, es waren rundliche, kleine Zellen erkennbar (Abb. 3.9 B, Pfeil), während in der unbehandelten Kultur die typische flache, epitheliale Morphologie von TS-Kolonien zu erkennen war (Abb.3.9 A). Vier Tage nach der Cre-Transduktion wurden die Unterschiede noch deutlicher, während in unbehandelten Kulturen große TS-Kolonien als Monolayer mit scharf abgegrenzten Kolonierändern zu sehen waren (Abb. 3.9 C), wurden in den behandelten TS-Kulturen Kolonien beobachtet, die eine rundliche, kompakte Kolonimorphologie aufwiesen, die der Morphologie von ES-Kolonien ähnelt (Abb. 3.9 D, Pfeile).

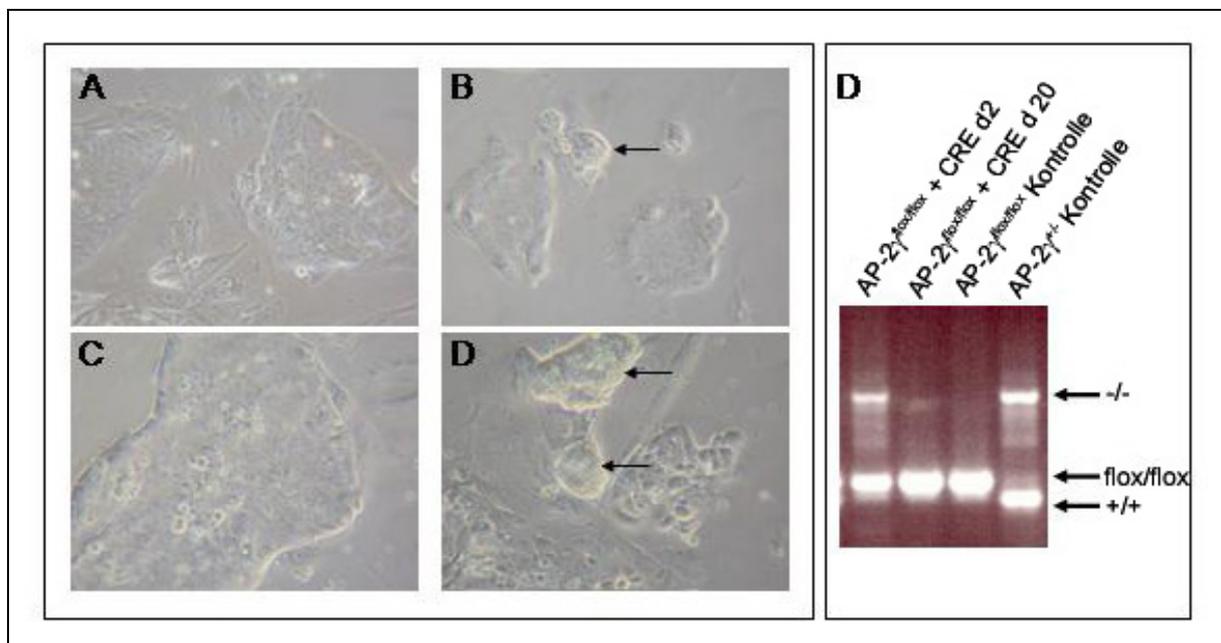


Abb. 3.9: Transduktion von AP-2 $\gamma^{flox/flox}$ TS-Zellen mit dem Cre-Protein

Behandlung der Zellen mit dem Cre-Protein wurde in konditioniertem Medium + FGF4 durchgeführt. Phasenkontrastaufnahmen zeigen unbehandelte TS-Zellen (A Tag 1 und C Tag 4) und HTNCre-behandelte TS-Zellen an Tag 1 (B) und Tag 4 (D) nach der Transduktion. Änderungen in der Kolonimorphologie sind durch Pfeile (B und D) gekennzeichnet. Der Cre-vermittelte Verlust von AP-2 γ wurde mit einer AP-2 γ -Genotypisierungs-PCR gezeigt (E).

Um festzustellen ob die Cre-vermittelte Rekombination erfolgreich war, wurden alle TS-Zellen eines Ansatzes zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transduktion in einer AP-2 γ -Genotypisierungs-PCR analysiert, dabei konnte 2 Tage nach der Cre-Transduktion eine

Bande, die zeigt, dass die Deletion des fünften Exons von AP-2 γ erfolgreich war, detektiert werden (Abb. 3.9 E). Als dann zu einem späteren Zeitpunkt an Tag 20 nach der Transduktion die TS-Kultur analysiert wurde, konnte in der PCR keine Bande für das deletierte fünfte Exon mehr nachgewiesen werden; dieses Ergebnis zeigte, sich keine TS-Zellen mit einem rekombinierten AP-2 γ -Allel nach längerer Zeit in der Kultur mehr befanden. Um einen Hinweis zu erhalten, was mit TS-Zellen, die durch die Cre-vermittelte Rekombination AP-2 γ defizient geworden waren, in der Zellkultur geschieht, sollten einzelne Zellklone beobachtet werden. Dazu wurden an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transduktion einzelne Zellkolonien mit verschiedensten Zellmorphologien gepickt; zunächst an Tag 7 nach der Transduktion. Die Zellklone wurden in einer AP-2 γ -Genotypisierungs-PCR genotypisiert, dabei wurde festgestellt, dass kein Klon mit einer Deletion im AP-2 γ -Allel gefunden werden konnte (Abb. 3.10 A).

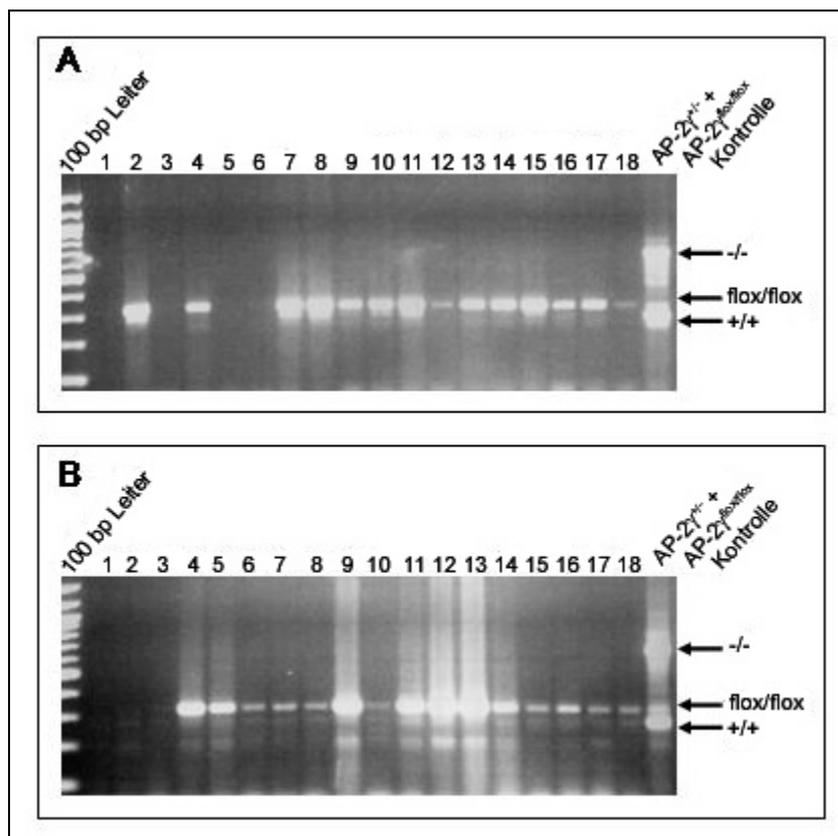


Abb. 3.10: Genotypisierung von TS-Klonen von AP-2 γ ^{flox/flox} nach Cre-Transduktion

Zellkolonien verschiedener Morphologie wurden an Tag 7 (A) und Tag 3 (B) nach der Transduktion gepickt und der Genotyp in einer PCR analysiert.

Auch der folgende Versuch, in dem die Zellklone an Tag 3 nach der Transduktion gepickt wurden, zeigte in der Genotypisierungs-PCR keinen AP-2 γ defizienten Zellklon (Abb. 3.10 B). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Selektion gegen das rekombinierte AP-2 γ -Allel in der TS-Kultur stattfindet, schon sehr kurz nach dem Verlust von AP-2 γ sind keine TS-Zellen mehr detektierbar, was darauf hinweist, dass AP-2 γ eine wichtige Rolle bei der Erhaltung und Selbsterneuerung der TS-Kultur *in vitro* spielt.

3.6 Überexpression von AP-2 γ in ES-Zellen induziert Differenzierung zu Tropektoderm

Die Expression von AP-2 γ ist auf die tropektodermale Zelllinie beschränkt, in ES-Zellen konnte AP-2 γ Expression nicht gefunden werden. Weil AP-2 γ *in vivo* bereits ab dem Morulastadium exprimiert wird, könnte eine Überexpression dieses Transkriptionsfaktors die Linienentscheidung der frühen Zelllinien beeinflussen.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde ein episomales Vektorsystem verwendet (Niwa et al., 2005). In diesem System werden ES-Zellen (MG1.19 ES) benutzt, die ein Polyomavirus-basierendes Plasmid als Episom enthalten und Polyoma-LargeT exprimieren, diese Zellen können sehr effizient stark und gleichmäßig ein zweites eingeführtes Transgen, welches einen Polyoma-Origin zur Replikation trägt, replizieren und erhalten (Gassmann et al., 1995).

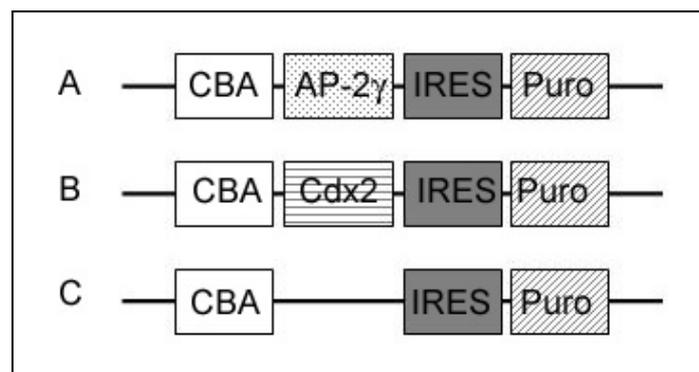


Abb. 3.11: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionsplasmide

Aufbau des Polyomavirus-basierenden AP-2 γ -Expressionsplasmids (A), des Cdx2-Expressionsplasmids als Positivkontrolle (B) und des Leervektors (C) als Negativkontrolle. Plasmidkarten siehe Anhang.

Abkürzungen: CBA: chicken β -Aktin-Promotor; IRES: internal ribosomal entry site; Puro: Puromycin-Resistenzkassette.

In die MG1.19 ES-Zellen wurde ein Polyomavirus-basierendes AP-2 γ -Expressionsplasmid transfiziert (Abb. 3.11 A), AP-2 γ wurde in den ES-Zellen stark überexprimiert und erhalten, so dass Analysen im Zeitraum von einer Woche nach der Transfektion gemacht werden konnten. Weiter wurde als Positivkontrolle ein Caudal-related homeobox 2 (Cdx2)-Expressionsplasmid transfiziert (Abb. 3.11 B), als Negativkontrolle ein Expressionsplasmid, welches keine cDNA beinhaltetete (Abb. 3.11 C). Bei diesem Experiment wurde herausgefunden, dass eine Überexpression von AP-2 γ in MG1.19 ES-Zellen zu einer veränderten Morphologie führt.

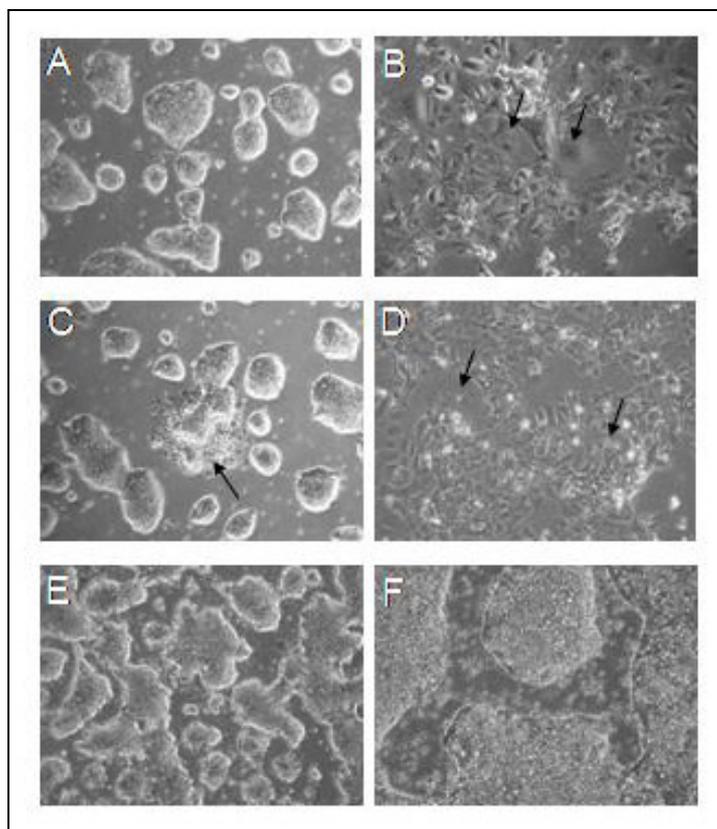


Abb. 3.12 : Überexpression von AP-2 γ in ES -Zellen

Phasenkontrastaufnahmen von Kolonien einen Tag (A, C, E) und 7 Tage (B, D, F) nach der Transfektion von MG1.19 ES-Zellen mit dem Expressionsvektoren von AP-2 γ (A und B), Cdx2 (C und D) und dem entsprechenden Kontroll-Leervektor (E und F). Die Kulturen wurden ab Tag 1 nach der Transfektion in CM-Medium mit FGF4 + Hep gehalten, um die Bedingungen für das Wachstum von TS-Zellen zu schaffen, selektioniert wurde mit Puromycin.

Die mit AP-2 γ transfizierten Zellen wurden in konditioniertem Trophoblastmedium, dem der Wachstumsfaktor zugesetzt war, gehalten, dabei änderte sich ihre typische ES-Zell-

Morphologie zu Trophoblast-Stammzell-ähnlichen epithelialen Zellen sieben Tage nach der Überexpression (Abb. 3.12 B). Es waren hier auch Zellen mit vergrößerten oder mehreren Zellkernen zu erkennen, wie es bei Riesenzellen der Fall ist (Abb. 3.12 B, Pfeile). Dieser morphologische Wechsel war ähnlich dem, der durch die Überexpression von Cdx2 hervorgerufen wird (Niwa et al., 2005). Auch hier waren sieben Tage nach der Transfektion Zellen, die TS-Zellen ähnelten und auch große Zellen mit plurinukleären Zellkernen (Abb. 3.12 D, Pfeile) erkennbar. Bei der Kontrolltransfektion mit einem Leervektor waren nach 7 Tagen nur überwachsene Kulturen mit differenzierten ES-Zellen erkennbar (Abb. 3.12 F). Die Effizienz der Koloniebildung durch die Überexpression von AP-2 γ war vergleichbar mit der Effizienz nach Überexpression von Cdx2, wobei allerdings generell AP-2 γ überexprimierende Zellen etwas langsamer den morphologischen Wechsel vollführten; bei Cdx2 überexprimierenden Zellen waren bereits einen Tag nach der Transfektion erste differenzierte Zellen zu beobachten, wobei allerdings auch spontane Differenzierungen ablaufen können (Abb. 3.12 C, Pfeil), während bei AP-2 γ überexprimierenden Zellen nach einem Tag noch keine Morphologieveränderung erkennbar war (Abb. 3.12 A).

Diese morphologischen Beobachtungen weisen darauf hin, dass eine Überexpression von AP-2 γ in ES-Zellen eine Differenzierung zu Trophoblast induziert. Um diesem Hinweis nachzugehen, wurden im Folgenden zunächst Antikörperfärbungen mit einem Marker für Trophektoderm, Cadherin3, an Tag 7 transfizierten Zellen durchgeführt.

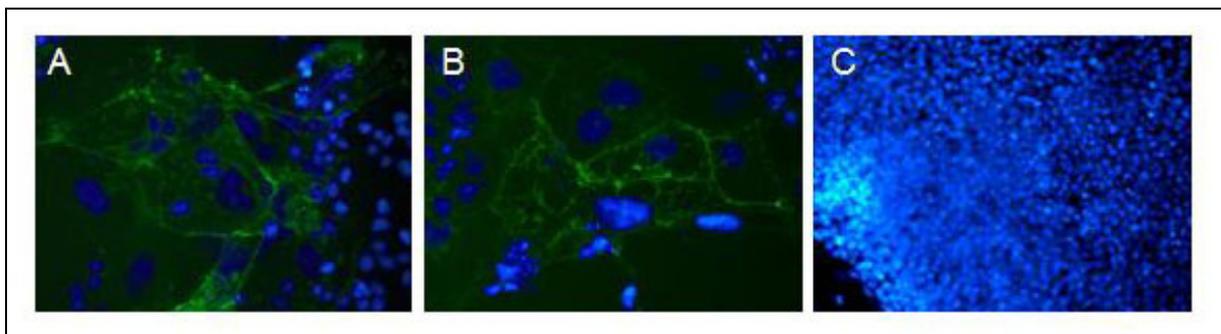


Abb. 3.13: Immunfluoreszenzfärbungen von trophektodermalen Zellen, die durch die Überexpression von AP-2 γ (A) und Cdx2 (B) generiert wurden

Zur Kontrolle wurden Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, gefärbt (C). Die Expression von Cadherin3 (Cdh3, placental cadherin) wurde mit einem anti-Cdh3-Antikörper detektiert (grün), die Zellkerne wurden mit Diamidinophenylindole gefärbt (DAPI, blau).

Die AP-2 γ überexprimierenden Zellen waren positiv für die Expression von Cadherin3 (Abb. 3.13 A), genauso wie die Zellen, die Cdx2 überexprimieren (Abb. 3.13 B). Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, sind negativ für die Expression von Cadherin3 (Abb. 3.13 C).

Um diese Beobachtungen auch auf der molekularen Ebene zu untersuchen, wurden Expressionsanalysen an Tag 7 nach der Transfektion durchgeführt. Analysierte Marker für undifferenzierte ES-Zellen waren Oct4 und Nanog. Als Markergene für undifferenzierte TS-Zellen wurden Eomes, Hand1, AP-2 γ und Cdx2 analysiert,; PI-1 diene als Riesenzellmarker und zeigt ein frühes Differenzierungsstadium der TS-Zellen an, ein späterer TS-Differenzierungsmarker ist tpbpa. Marker für extraembryonales Endoderm (XEN) sind Gata-6 und AFP, als endogene Kontrolle dient β -Actin (Abb. 3.14). Bei der Analyse konnte gezeigt werden, dass die Marker für ES-Zellen Oct4 und Nanog bei Überexpression von AP-2 γ leicht herunterreguliert wurden im Gegensatz zu undifferenzierten ES-Zellen. Dagegen wurden Marker für undifferenzierte TS-Zellen wie Eomes, Hand1 und Cdx2 detektiert; diese konnten sonst nur in undifferenzierten TS-Zellen, nicht aber in undifferenzierten ES-Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass die endogene Cdx2-Expression durch AP-2 γ -Überexpression induziert wurde, wie auch endogene AP-2 γ -Expression nach Cdx2-Überexpression zu detektieren war, was auf eine positive Rückkopplung zwischen diesen beiden Faktoren hinweist. Ebenfalls konnte der Marker PI-1 für die Differenzierung von TS-Zellen zu Riesenzellen in AP-2 γ überexprimierten Zellen schwach detektiert werden; der Marker Tpbpa für späte TS-Differenzierung wurde weder in AP-2 γ , noch Cdx2 überexprimierenden Zellen gefunden. Die Markergene Gata-6 und AFP als Marker für extraembryonales Endoderm wurden nach der Überexpression von AP-2 γ nicht detektiert, dies ist ein Hinweis, dass keine Differenzierung in extraembryonales Endoderm stattgefunden hat.

Diese funktionelle Expressionsanalyse weist darauf hin, dass durch Überexpression von AP-2 γ Trophektoderm induziert wurde, somit repräsentiert sich AP-2 γ neben Cdx2 und Eomes als ein weiterer Kandidat bei der Suche nach Schlüssel-Regulatoren in der trophektodermalen Differenzierung.

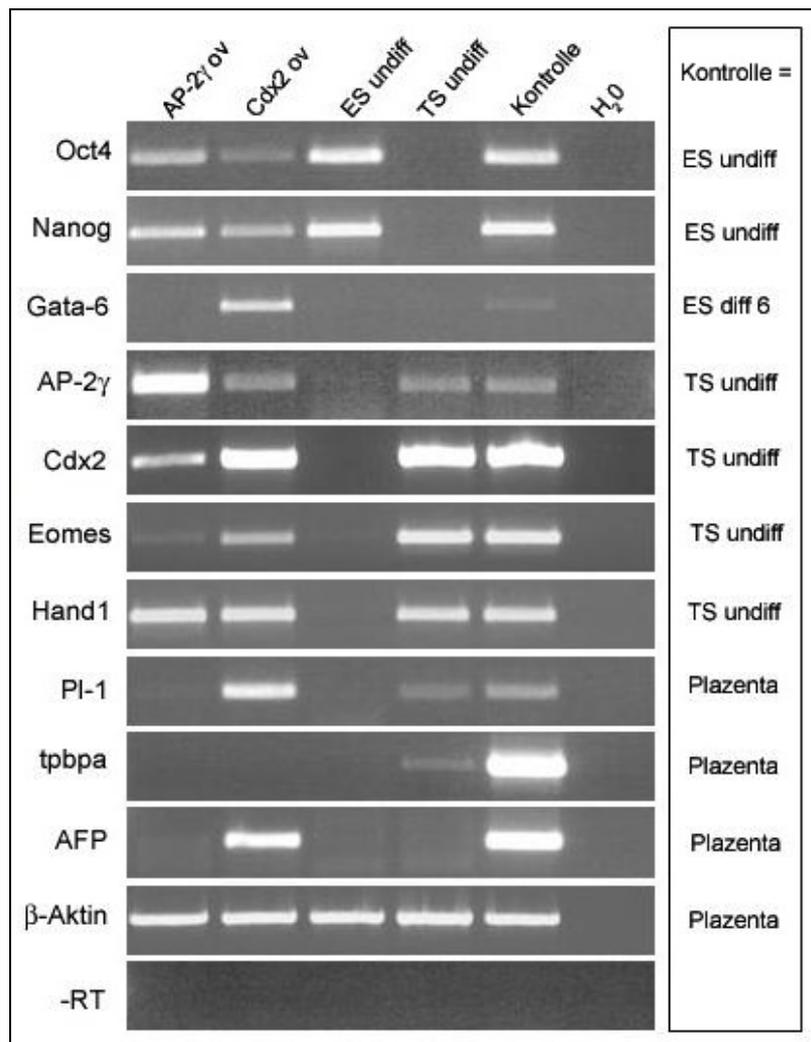


Abb. 3.14: RT-PCR Analysen der Genexpression

7 Tage nach der Transfektion von MG1.19 ES-Zellen mit den Expressionsplasmiden mit AP-2 γ und Cdx2 wurde von dem jeweiligen Ansatz die gesamte RNA isoliert und die Expression verschiedener ES-Marker (Oct4, Nanog), TS-Marker (AP-2 γ , Cdx2, Eomes, Hand1, Pl-1, tpbpa) und XEN-Marker (Gata-6, AFP) durch eine semi-quantitative RT-PCR nachgewiesen. Zum Vergleich wurde die jeweilige mRNA-Expression von undifferenzierten ES-Zellen und undifferenzierten TS-Zellen analysiert, die jeweilige verwendete Positivkontrolle ist angegeben, als endogene Ladekontrolle diente β -Aktin. Um genomische Kontaminationen auszuschließen wurde eine β -Aktin -RT -PCR durchgeführt.

3.7 AP-2 γ defiziente ES-Zellen zeigen eine verzögerte Herunterregulation von Nanog nach Induktion von Cdx2

Niwa hatte berichtet, dass die Überexpression von Cdx2 zu einer Repression der Pluripotenzgene Oct4 und Nanog führt (Niwa et al., 2005), was ebenfalls nach der Überexpression von AP-2 γ beobachtet wurde. Als nächstes wurde die Frage untersucht, ob AP-2 γ und Cdx2 zusammenarbeiten, um diese Gene zu unterdrücken.

Dazu wurden AP-2 γ defiziente und Wildtyp ES-Zellen mit einem Tamoxifen-induzierbaren Cdx2-Expressionsvektor stabil transfiziert (Abb. 3.15).

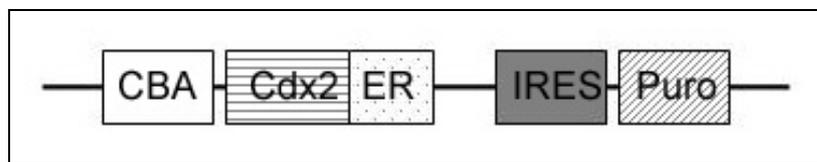


Abb. 3.15: Schema des Tamoxifen-induzierbaren Cdx2-Expressionsplasmids

Abkürzungen: CBA: chicken β -Aktin-Promotor; ER: estrogen receptor; IRES: internal ribosomal entry site; Puro: Puromycin-Resistenzkassette.

Dieser Expressionsvektor enthält die murine Ligandenbindedomäne des Östrogenrezeptors (ER), durch eine Mutation von Glycin zu Arginin an der Stelle 525 der Aminosäuresequenz wird die Affinität dieses mutierten Östrogenrezeptors zu seinem natürlichen Liganden E2 (17- β -Oestradiol) um das tausendfache reduziert. Dagegen ist die Bindung des synthetischen Östrogenantagonisten 4-Hydroxy-Tamoxifen nicht beeinträchtigt. So kann durch die Zugabe von 4-Hydroxy-Tamoxifen das an den mutierten Östrogenrezeptor fusionierte Gen, hier Cdx2, aktiviert werden (Feil et al., 1997).

In den AP-2 γ defizienten und Wildtyp ES-Zellen mit dem Tamoxifen-induzierbaren Cdx2-Expressionsvektor wurde mit der Zugabe von Tamoxifen in konditioniertem Medium (CM) mit FGF4 und Heparin Cdx2-Überexpression aktiviert und die Differenzierung zu Trophoblast induziert, nach morphologischen Beobachtungen wurden RT-PCRs durchgeführt.

Sechs Tage nach der Induktion von Cdx2 konnte sowohl bei Wildtyp-ES-Zellen, als auch bei AP-2 γ defizienten ES-Zellen ein Morphologiewechsel zu trophektodermalen Zellen festgestellt werden, mikroskopisch waren zwischen den beiden Zelllinien keine Unterschiede bei der Zellmorphologie an Tag 6 erkennbar (Abb. 3.16 A).

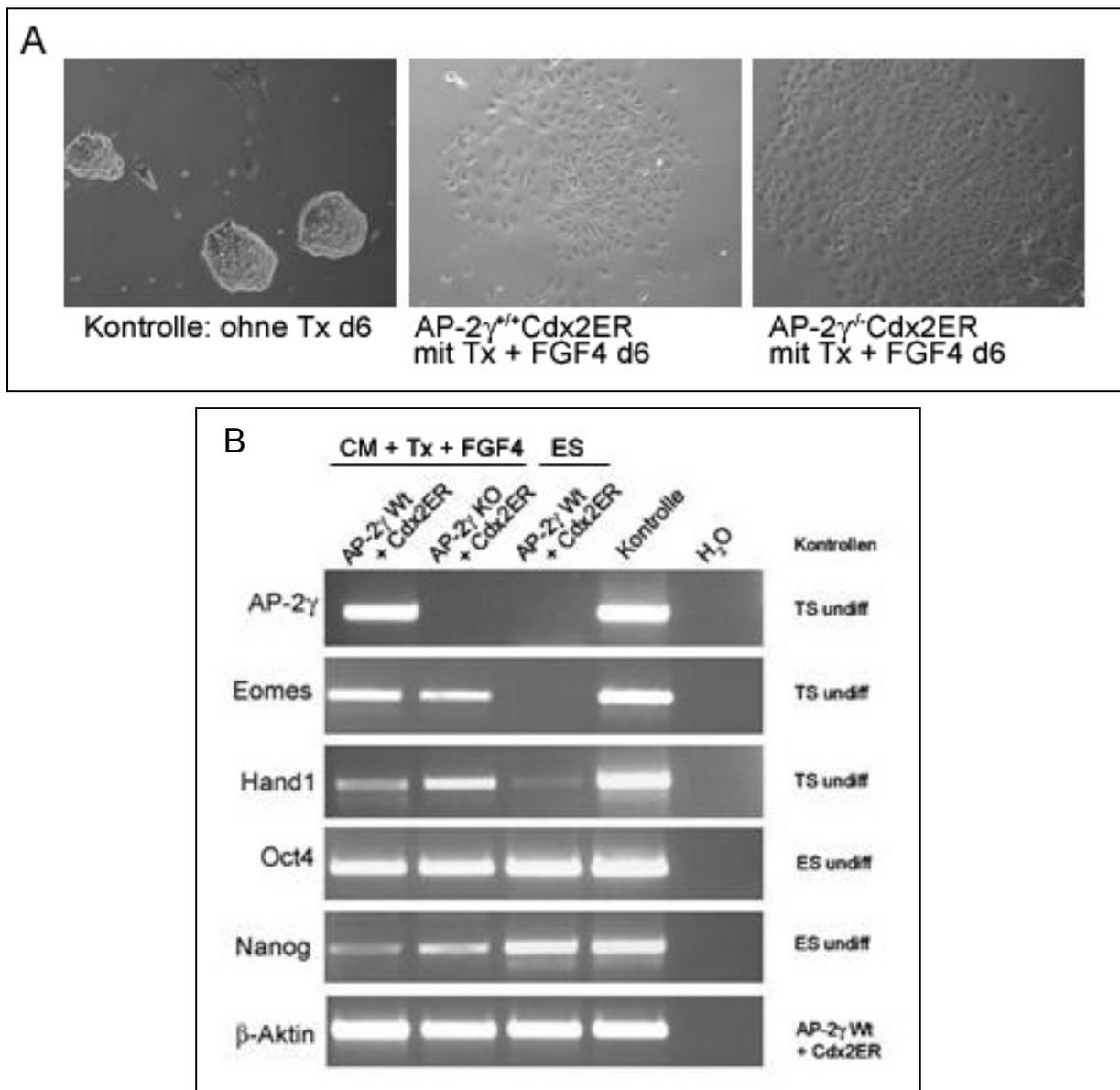


Abb. 3.16: AP-2 γ defiziente ES-Zellen differenzierten zu TS nach Induktion von Cdx2

A: Phasenkontrastaufnahmen von AP-2 γ Wildtyp-ES-Zellen und AP-2 γ defizienten ES-Zellen 6 Tage nach Zugabe von 4-Hydroxy-Tamoxifen, durch Induktion von Cdx2 und Kultivierung in CM + FGF4 + Hep wird die Differenzierung zu Trophoblast angetrieben.

B: Semi-quantitative RT-PCR Analyse der Genexpression während der Differenzierung von AP-2 γ -Wildtyp-ES-Zellen und AP-2 γ defizienten ES-Zellen induziert durch Tamoxifen-Zugabe.

Semi-quantitative RT-PCR Analysen zeigten jedoch, dass zwar in beiden Linien das Pluripotenzgen Oct4 nicht mehr aktiv ist, aber interessanterweise wurde Nanog als weiterer

Faktor für Pluripotenz in der AP-2 γ defizienten Zelllinie weiterhin detektiert, während es in AP-2 γ -Wildtyp nicht mehr zu finden war (Abb. 3.16 B).

Um nun einen genaueren Einblick in die Genregulation zu Beginn der Differenzierung zu erhalten, wurden die Zellen 24h, 48h und 72h nach der Induktion von Cdx2 beobachtet und in quantitativen Real-time PCRs analysiert.

Bei mikroskopischen Beobachtungen wurde in AP-2 γ defizienten ES-Zellen eine verzögerte Differenzierung zu TS festgestellt; während bei AP-2 γ Wildtyp ES-Zellen bereits 48h nach der Induktion alle Zellen differenziert sind (Abb. 3.17 C), sind bei den AP-2 γ defizienten noch immer Kolonien mit ES-Morphologie erkennbar (Abb. 3.17 F, Pfeil), erst 72h nach der Cdx2-Induktion waren hier alle Zellen zu Trophoblast differenziert (Abb. 3.17 G).

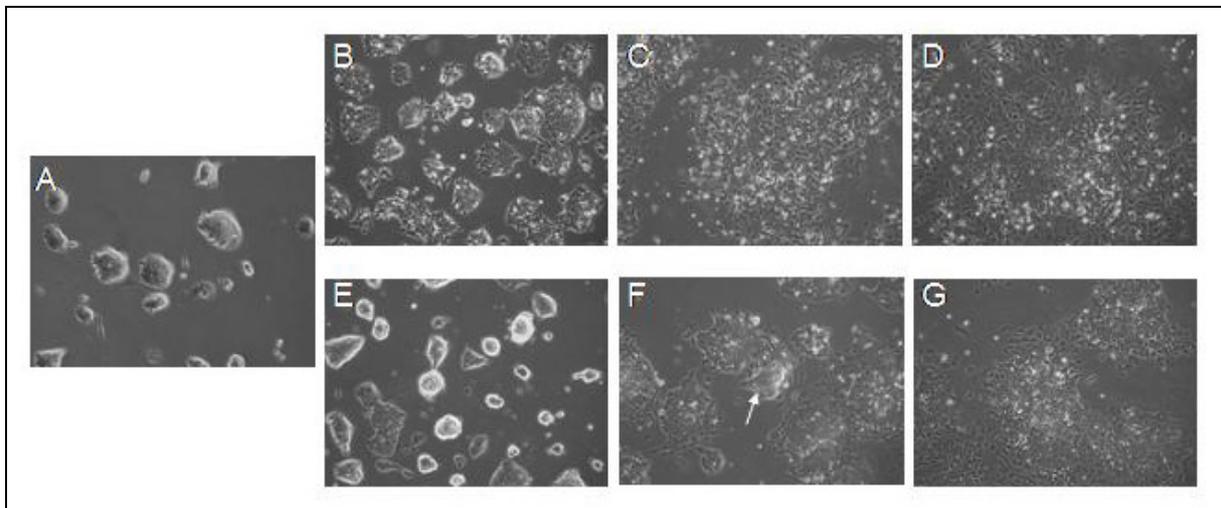


Abb. 3.17: AP-2 γ defiziente ES-Zellen differenzierten verzögert zu TS nach Induktion von Cdx2

Phasenkontrastaufnahmen von AP-2 γ Wildtyp-ES-Zellen (A-D) und AP-2 γ defizienten ES-Zellen (E-G). Bei undifferenzierten ES-Zellen in ES-Medium (A) wird durch Induktion von Cdx2 durch Tamoxifenzugabe und Kultivierung in CM + FGF4 + Hep die Differenzierung zu Trophoblast angetrieben (B-G). Die Änderungen in der Koloniemorphologie wurden 24h (B und E), 48h (C und F) und 72h (D und G) nach dem Start der Differenzierung dokumentiert. AP-2 γ defiziente Zellen zeigen 48h nach Induktion der Differenzierung noch ES-Morphologie (F, Pfeil).

Expressionsanalysen in quantitativen Real-time PCRs zeigen, dass Marker, die mit Differenzierung zu Trophektoderm assoziiert sind, wie Eomes, Hand und AP-2 γ in beiden Zelllinien hochreguliert wurden. Eomes-Expression wurde zunächst in AP-2 γ defizienten ES-Zellen schneller hochreguliert, nach 72h allerdings wird Eomes in AP-2 γ Wildtyp-ES Zellen etwa doppelt so stark exprimiert, als in AP-2 γ defizienten ES-Zellen (Abb. 3.18 A). Der TS-

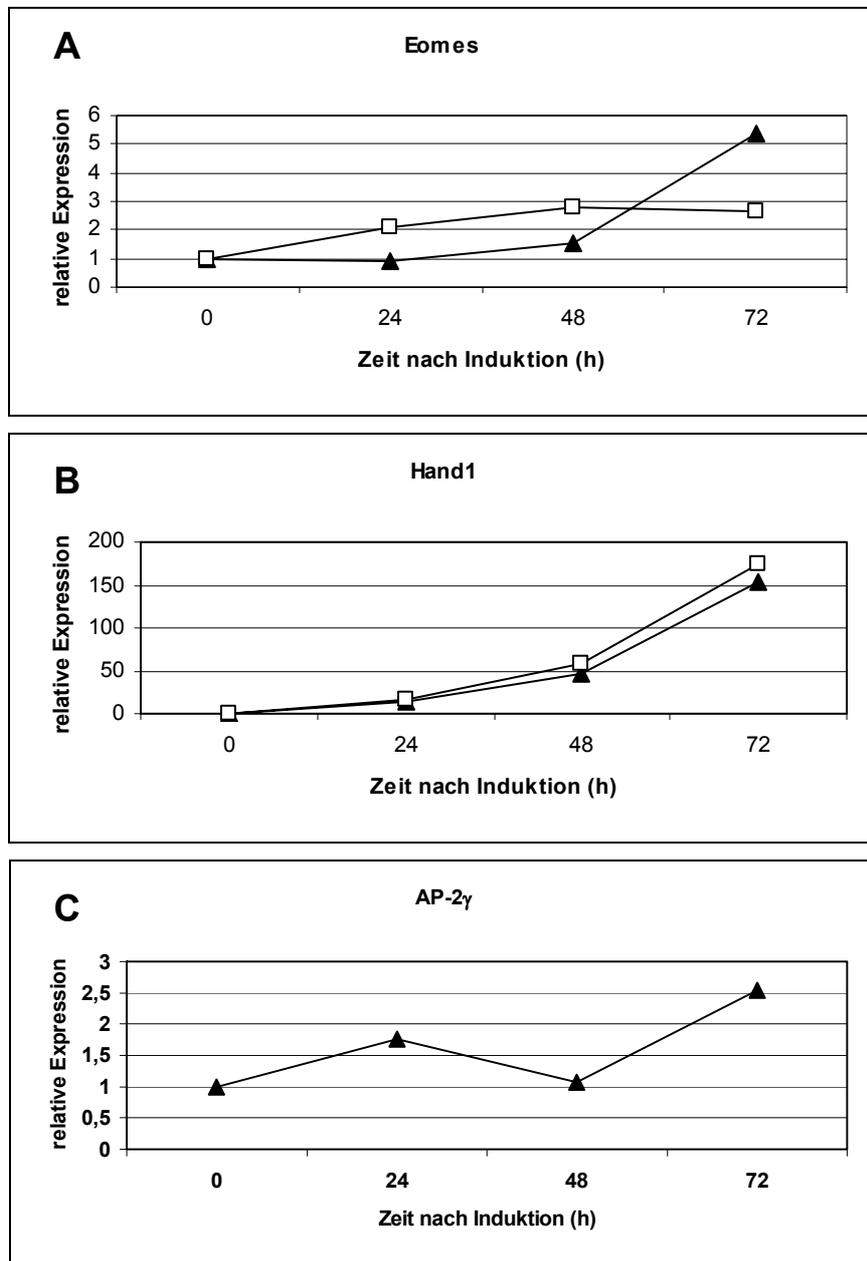
Marker Hand1 wird nach Induktion von Cdx2 sowohl in AP-2 γ -Wildtyp, als auch in AP-2 γ defizienten ES-Zellen extrem stark hochreguliert, bereits nach 24h Differenzierung findet man dieses Markergen um den Faktor 20 stärker exprimiert, als in undifferenzierten ES-Zellen, in denen Hand1 nicht detektierbar war. Nach 72h ist die Expression in AP-2 γ -Wildtyp Zellen etwa 160 mal stärker, in AP-2 γ defizienten ES-Zellen sogar 180 mal stärker, als in undifferenzierten ES-Zellen (Abb. 3.18 B). Damit ist Hand1 das am stärksten hochregulierte Markergen nach der Überexpression von Cdx2.

Expression von AP-2 γ war wie erwartet in AP-2 γ defizienten ES-Zellen nach Induktion der Differenzierung durch Überexpression von Cdx2 nicht detektierbar, in AP-2 γ Wildtyp-ES-Zellen wird AP-2 γ um den Faktor 1,5 hochreguliert (Abb. 3.18 C).

Die Pluripotenzgene Oct4 und Sox2 wurden nach Induktion der Differenzierung durch Cdx2-Überexpression in AP-2 γ Wildtyp und AP-2 γ defizienten ES-Zellen gleichermaßen reprimiert, nach 72h fand man in beiden Zelllinien Oct4 etwa um den Faktor 1 herunterreguliert (Abb. 3.18 D); Sox2 nicht ganz so stark, nur etwa 0,5 Mal so stark im Gegensatz zu undifferenzierten ES-Zellen (Abb. 3.18 E).

Auffällig ist die Expression des Pluripotenzgens Nanog nach Induktion der Differenzierung, dessen Expression wurde in AP-2 γ Wildtyp ES-Zellen etwa doppelt so stark reprimiert als in AP-2 γ defizienten ES-Zellen, hier blieb die Repression nach Induktion der Differenzierung relativ unbeeindruckt (Abb, 3.18 F), besonders im Vergleich zu den Pluripotenzgenen Oct4 und Sox2.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur in AP-2 γ Wildtyp-ES-Zellen, sondern auch in AP-2 γ defizienten ES-Zellen durch Überexpression von Cdx2 eine Differenzierung zu Trophoblast stattfindet, wie durch die Hochregulation der TS-Marker Eomes und Hand1 gezeigt wurde. Gleichzeitig wurden in beiden Zelllinien die Marker Oct4 und Sox2 für ES-Zellen herunterreguliert. Ein auffälliges Ergebnis bei der Differenzierung zu TS ist, dass das Pluripotenzgen Nanog in AP-2 γ defizienten ES-Zellen nach 3 Tagen Differenzierung nur sehr schwach herunterreguliert gefunden wurde, wie die quantitative PCR zeigt, selbst nach 6 Tagen Differenzierung war in der semi-quantitativen PCR in den AP-2 γ defizienten ES-Zellen noch immer Nanog-Expression detektierbar im Gegensatz zu AP-2 γ Wildtyp ES-Zellen. Dieses weist darauf hin, dass Nanog durch AP-2 γ reguliert werden könnte, AP-2 γ könnte die Expression von Nanog reprimieren und auf diese Weise die Linienentscheidung der frühen Zelllinien mit beeinflussen.



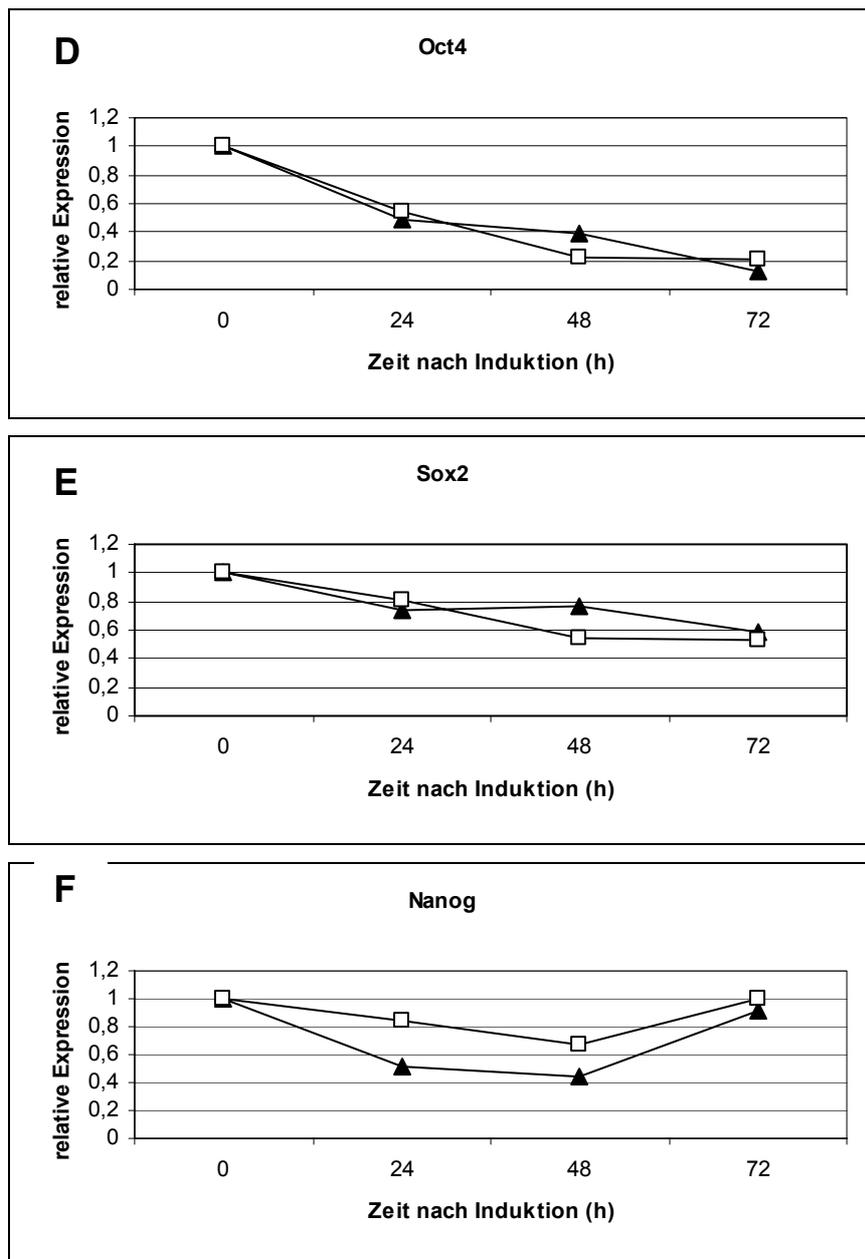


Abb. 3.18: Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR Analyse der Genexpression während der Differenzierung von AP-2 γ -Wildtyp-ES-Zellen (geschlossenes Dreieck) und AP-2 γ -defizienten ES-Zellen (offenes Quadrat) induziert durch Tamoxifen-Zugabe. Die relativen Expressionsstärken von jedem Gen wurden an 0, 24, 48 und 72h nach der Tamoxifen-Zugabe bestimmt. Diese Daten wurden auf den Wert von β -Actin normalisiert und gegen den Expressionslevel von 0h (undifferenziert), der gleich 1 gesetzt wurde, aufgetragen.

3.8 Teilnahme der AP-2 γ induzierten TS-Zellen an der Plazenta

Zur weiteren Charakterisierung der durch die Überexpression von AP-2 γ induzierten TS-Zellen sollte überprüft werden, ob diese Zellen nicht nur die Morphologie und molekulare Markerexpression von TS-Zellen aufweisen, sondern auch funktionell an der Bildung der Plazenta teilhaben. Werden kultivierte TS-Zellen in eine Blastozyste injiziert, nehmen diese Zellen an allen Zelltypen der Trophoblast-Linie teil, nie jedoch am Embryo in den resultierenden Chimären (Tanaka et al., 1998). Deshalb wurden für das Experiment zunächst ES-Zellen verwendet, die ubiquitär ein Reportergen exprimieren, hier ein LacZ-Gen im ubiquitären ROSA26-Lokus (ES ROSA β geo). Diese ES-Zellen zeigen *in vitro* nach einer X-Gal-Färbung eine intensive Blaufärbung (Abb. 3.20 A). Nach einer Injektion dieser undifferenzierten ES-Zellen in Blastozysten wurden Embryonen Tag 9,5 dpc präpariert und die X-Gal-Färbung durchgeführt, LacZ-positive Zellen wurden ausschließlich in den chimären Embryonen detektiert (Abb. 3.20 B). Um eine Differenzierung durch Überexpression von AP-2 γ in den ROSA β geo ES-Zellen zu erreichen, wurde ein Tamoxifen-induzierbares AP-2 γ -Expressionsplasmid stabil integriert. Zur Generierung dieses Expressionsplasmids wurde die AP-2 γ cDNA mittels PCR generiert und mit einer mutierten murinen Ligandenbindedomäne des Östrogenrezeptors (ER) fusioniert, der Expressionsvektor ist vom Aufbau wie das bereits vorher verwendete Tamoxifen-induzierbare Cdx2-Expressionsplasmid (Abb. 3.19).

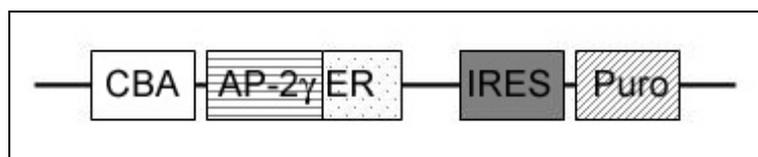


Abb. 3.19: Schema des Tamoxifen-induzierbaren AP-2 γ -Expressionsplasmids

Abkürzungen: CBA: chicken β -Aktin-Promotor; ER: estrogen receptor; IRES: internal ribosomal entry site; Puro: Puromycin-Resistenzkassette.

So kann durch die Zugabe von 4-Hydroxy-Tamoxifen AP- γ aktiviert werden. 7 Tage nach der Induktion von AP-2 γ durch Zugabe von 4-Hydroxy-Tamoxifen und der Kultivierung in Trophoblast-Stammzellmedium mit FGF4 zeigten die Zellen einen Morphologiewechsel zu Trophektoderm, sie waren weiterhin LacZ-positiv (Abb. 3.20 C). Nachdem Zellen von diesen differenzierten Kulturen in Blastozysten injiziert wurden, wurden einige LacZ-positive Zellen ausschließlich in das Plazentagewebe inkorporiert detektiert (Abb. 3.20 D, E).

Dieses Ergebnis zeigt, dass TS Zellen, die durch Induktion von AP-2 γ in ES-Zellen generiert wurden, die Fähigkeit besitzen, sich an der Bildung der Plazenta zu beteiligen und somit funktionelle Trophoblast-Stammzellen sind.

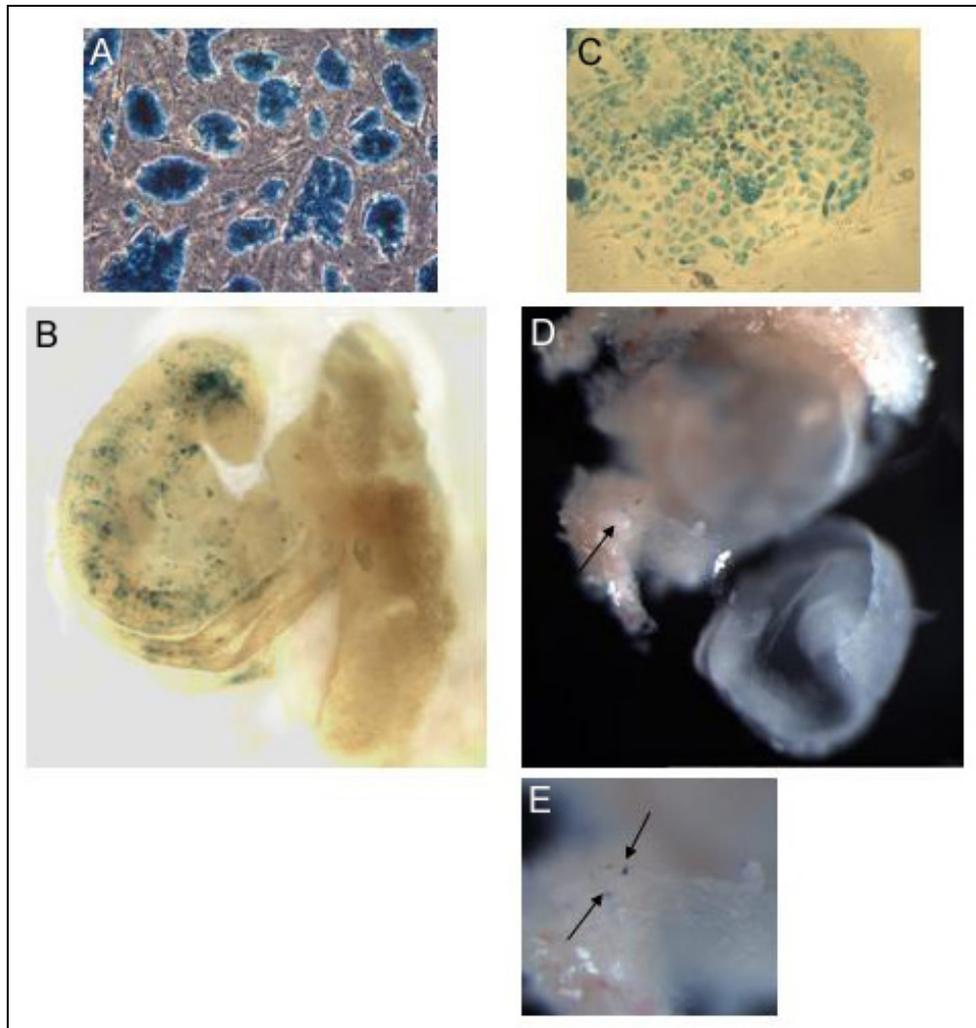


Abb. 3.20: Chimäre Embryonen, die aus ROSA β geo-ES-Zellen generiert wurden

Werden ROSA β geo ES-Zellen im undifferenzierten Zustand gehalten (A) und in Blastozysten injiziert, findet man LacZ-positive Zellen ausschließlich im Embryo (B). ES ROSA β geo mit integriertem AP-2 γ ER wurden in Anwesenheit von 4-Hydroxy-Tamoxifen und FGF4 für 7 Tage in Trophoblast-Medium gehalten (C). Nachdem diese Zellen in Blastozysten injiziert wurden, entwickelten sich Chimäre, in denen LacZ-positive Zellen an der Plazenta teilhaben (D, Pfeil), ein größerer Ausschnitt zeigt diese blaugefärbten Zellen deutlicher (E, Pfeile).

4. Diskussion

Die Determinierung der Zellschicksale ist ein äußerst wichtiger Prozess während der frühen Embryonalentwicklung. Beim frühen murinen Embryo sind an der Linienspezifizierung neben Prozessen der Zellpolarisation auch Mechanismen der transkriptionellen Regulation durch linienspezifische Transkriptionsfaktoren beteiligt. Bisher ist wenig über diese molekularen Mechanismen, die der Separation der initial totipotenten Zellen des Embryos in entweder Trophektoderm oder innere Zellmasse unterliegen und durch Kontrolle der Expression die dazugehörige Differenzierung an den entsprechenden Stellen und Zeitpunkten auslösen, bekannt. Es ist eine logische Konsequenz der Zelldeterminierung, dass um Zellen in einen neuen Phänotyp differenzieren zu lassen, ein Wechsel der Genexpression in diesen Zellen stattgefunden haben muss. Im frühen Blastozystenstadium gibt es nur zwei Zelltypen, die pluripotenten Zellen der inneren Zellmasse und das differenzierte Trophektoderm, beide wurden in der späten Morula generiert. Damit ist das Trophektoderm die erste differenzierte Zelllinie in der Säugerentwicklung, es ist für die Implantation des Embryos in den mütterlichen Uterus und die Entwicklung der Plazenta verantwortlich. Es gibt eine immer weiter ansteigende Anzahl von Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren mit ihren Rezeptoren und Signalmolekülen, von denen gezeigt wurde, dass sie verschiedene Stadien der Trophoblastentwicklung regulieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AP-2 γ in der Maus bereits in Embryonalstadien vor der Implantation exprimiert wird, AP-2 γ RNA wurde im Morula- und Blastozystenstadium nachgewiesen. Somit ist AP-2 γ zum Zeitpunkt der Liniendeterminierung im frühen Embryo bereits exprimiert, dies ist ein Hinweis darauf, dass AP-2 γ während der Linienspezifizierung an dem regulatorischen Netzwerk der Transkriptionsfaktoren beteiligt sein könnte. Weiter wurde hier nachgewiesen, dass die Expression von AP-2 γ sich ab dem Blastozystenstadium auf die Zellen des Trophektoderms beschränkt, dieses Expressionsmuster wurde auch bei der fortschreitenden Embryonalentwicklung beibehalten, so war bereits die Expression von AP-2 γ an Tag 5,5 ausschließlich in der extraembryonalen Linien detektiert worden (Auman et al., 2002).

Um der Frage nachzugehen, ob neben AP-2 γ auch andere Mitglieder der AP-2 Familie im Trophektoderm und dessen Derivaten eine Rolle spielen, wurden *in vitro* Kulturen von

Trophoblast-Stammzellen aus Blastozysten generiert und analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass von den Mitgliedern der AP-2-Familie AP-2 γ der vorherrschende Transkriptionsfaktor im Trophektoderm ist. In proliferierenden, undifferenzierten Trophoblast-Stammzell-Kulturen wurde AP-2 γ nachgewiesen, daneben wurde in dieser Arbeit von den anderen AP-2-Familienmitgliedern nur AP-2 α in diesem Stadium detektiert. In differenzierten Stadien der Trophoblast-Stammzellen wurde neben sehr großen Proteinmengen von AP-2 γ ebenfalls noch AP-2 α und zusätzlich AP-2 β detektiert. Somit könnte vermutlich nur AP-2 α in vivo im präimplantiven Stadium, in dem das Trophektoderm im proliferativen Zustand vorliegt, redundante Funktionen zu AP-2 γ zeigen. Das zwischen AP-2 γ und AP-2 α Redundanz vorliegen kann, wurde beispielsweise während der Induktion der Neuralleiste in Zebrafischembryonen nachgewiesen (Li and Cornell, 2007).

In embryonalen Stammzellen wurden weder in undifferenzierten, noch in andifferenzierten Stadien, in denen die ES-Zellen fünf Tage in Abwesenheit von LIF gehalten wurden, AP-2-Proteine detektiert. Dagegen hat Winger et al. AP-2 γ Protein in allen Zellen der Blastozyste detektiert, sowohl im Trophektoderm, als auch in den Zellen der inneren Zellmasse, an dieser Stelle handelt es sich nach seiner Vermutung um maternales AP-2 γ Protein, welches ab diesem Zeitpunkt degradiert wird. Ebenfalls fand man in dieser Publikation AP-2 γ in undifferenzierten ES-Zellen (Winger et al., 2006). Diese Beobachtung wurde bei Analysen unserer ES-Zellkulturen, die eine gut erhaltene undifferenzierte Morphologie zeigten, nicht gemacht. Vermutet werden kann hier nur, dass die ES-Zellen von Winger et al. eventuell andifferenziert waren und somit wenig AP-2 γ Transkript in einer RT-PCR detektiert wurde (Winger et al., 2006), was wir in unseren Proteinanalysen nicht detektieren konnten. Im sich entwickelnden Embryo wird AP-2 γ im Neuroektoderm, welches aus den Zellen der inneren Zellmasse entsteht, exprimiert (Chazaud et al., 1996), somit war ein Nachweis von AP-2 γ in differenzierten ES-Zellen vermutet worden. Allerdings entsteht bei der spontanen Differenzierung, wie sie durch die Wegnahme von LIF induziert wird, eine heterogene Mischung aus ES-Zellderivaten, ES-Zellen fehlen *in vitro* einige räumliche und zeitliche Signale im Gegensatz zur normalen *in vivo* Differenzierung. Sie differenzieren nur unter entsprechenden Wachstumsbedingungen beispielsweise in neuroektodermale Linien (Yamanaka et al., 2008), was in meiner Arbeit nicht durchgeführt wurde, deshalb vermutlich sind in den hier verwendeten Proteinlysaten von fünf Tage differenzierten ES-Zellen keine AP-2-Proteine nachweisbar. Das in undifferenzierten ES-Zellen kein AP-2-Protein detektiert werden konnte weist darauf hin, dass AP-2-Proteine direkt nicht in der frühen Entwicklung

der Zellen der inneren Zellmasse aktiv sind, ganz im Gegenteil lässt sich die Hypothese aufstellen, dass gerade die Repression von AP-2-Proteinexpression in der embryonalen Zelllinie in diesem Entwicklungsstadium notwendig ist. Wahrscheinlich wird die Expression von AP-2 Proteinen, beispielsweise AP-2 γ , welches nur im Trophektoderm exprimiert ist, in murinen Stammzellen unterdrückt. Bei Chromatin-Immunpräzipitations-Analysen (ChIP) in humanen embryonalen Stammzellen wurde herausgefunden, dass die Pluripotenzgene Oct4, Sox2 und Nanog am Promotor von AP-2 γ gebunden sind (Boyer et al., 2005). Boyer et al. spekuliert, dass Gene, deren Promotoren von Oct4, Sox2 und Nanog gebunden sind, von diesem Komplex der drei Pluripotenzgene aktiviert oder reprimiert werden könnten; somit könnte durch diesen Komplex eventuell die Transkription von AP-2 γ in ES-Zellen reprimiert sein.

Die durchgeführten Expressionsanalysen weisen stark darauf hin, dass AP-2 γ an der Entwicklung des Trophektoerms beteiligt ist. Zudem wurde bereits gezeigt, dass die Inaktivierung von AP-2 γ einen Defekt in der Plazenta durch Reduktion der proliferativen Fähigkeiten der extraembryonalen Gewebe verursacht (Auman et al., 2002; Werling and Schorle, 2002). Dadurch, dass der Embryo noch implantiert, wurde bereits in diesen Veröffentlichungen über redundante Funktionen innerhalb der AP-2-Familie spekuliert. In späteren Studien mit Doppelmutanten wurde beobachtet, dass der Verlust von AP-2 α und AP-2 γ gleichzeitig die embryonale Letalität beschleunigt im Vergleich zum Verlust von einem der beiden Gene, was die existierende genetische Redundanz dieser beiden Gene im präimplantiven Stadium zeigt (Winger et al., 2006). Welche Rolle AP-2 γ bei der Trophoblastausbildung spielt, war bisher nicht genau geklärt worden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass für die Etablierung und Erhaltung des Trophektoerms die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-2 γ gebraucht wird. Hier wurde festgestellt, dass es nicht möglich war, aus AP-2 γ defizienten Blastozysten *in vitro* Trophoblast-Stammzellen zu generieren, was zeigt, dass AP-2 γ für die Etablierung von Trophektoerm essentiell ist. In undifferenzierten Trophoblast-Stammzellen war zwar auch noch die Expression von AP-2 α nachgewiesen worden, aber der Defekt bei der Etablierung von Trophoblast-Stammzellen durch AP-2 γ konnte durch das andere AP-2-Familienmitglied nicht kompensiert werden. Dagegen zeigten AP-2 γ defiziente embryonale Stammzellen keinen Defekt in der Etablierung und Proliferation, was erneut zeigt, dass AP-2 γ bei der Entwicklung der inneren Zellmasse funktionell nicht aktiv ist. Bei Untersuchungen an etablierten AP-2 γ konditionalen

Trophoblast-Stammzellen wurde festgestellt, dass Trophoblast-Stammzellen nach dem Verlust eines oder beider funktioneller AP-2 γ -Allele bereits nach kurzer Zeit in den Kulturen nicht mehr vorzufinden sind. Diese Beobachtung verdeutlicht einen Nachteil der Zellen durch den Verlust von AP-2 γ und weist eine essentielle Rolle von AP-2 γ während der Erhaltung und Proliferation der Trophoblast-Stammzellen auf. Was genau mit einer Trophoblast-Stammzelle nach dem Verlust von AP-2 γ geschieht ist eine interessante Frage, die bisher nicht geklärt werden konnte. So könnte der Verlust von AP-2 γ Apoptose induzieren. Einen Hinweis auf den Zusammenhang von AP-2 γ und vermehrter Apoptoserate geben die murinen Nullmutanten von AP-2 α und AP-2 β , in beiden Fällen wurden in den betroffenen Geweben vermehrt Apoptosen gefunden (Moser et al., 1997; Schorle et al., 1996; Zhang et al., 1996); somit kann spekuliert werden, dass der Verlust von AP-2 γ ebenfalls mit vermehrter Apoptose assoziiert ist. Auch verminderte Proliferation könnte eventuell durch den AP-2 γ Verlust verursacht werden, durch diesen Wachstumsnachteil könnten AP-2 γ defiziente Zellen durch umliegende Zellen mit intakten AP-2 γ -Allelen überwachsen werden. In einem transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass AP-2 γ an der Erhaltung des undifferenzierten, proliferativen Stadiums in den epithelialen Zellen der Brustdrüse beteiligt ist (Jager et al., 2003), so dass spekuliert werden kann, dass ein Verlust von AP-2 γ im Trophektoderm verminderte Proliferation auslösen könnte. Eine weitere Alternative ist, dass durch die Inaktivierung von AP-2 γ eine Veränderung in der Genexpression stattfindet, diese könnte mit einer Differenzierung der Zellen assoziiert sein, so dass keine proliferierenden Stammzellen in der Kultur verbleiben. An Tag 7,5 wurde in AP-2 γ defizienten Mäusen keine Expression der Trophoblast-Stammzell-Marker Cdx2 und Eomes im extraembryonalem Ektoderm mehr detektiert, deshalb wurde spekuliert, dass die Mutanten keine Trophoblast-Stammzell-Population mehr besitzen, was verminderte Zellzahlen im ektoplazentalen Kegel und in der Anzahl der Riesenzellen nach sich zieht (Auman et al., 2002).

Da hier nachgewiesen wurde, dass AP-2 γ für die Etablierung und Erhaltung von Trophektoderm notwendig ist und das Trophektoderm die erste differenzierte Zelllinie darstellt, wurde folglich die Fragestellung analysiert, ob AP-2 γ an der ersten Liniendeterminierung beteiligt ist. Ich konnte zeigen, dass die Überexpression von AP-2 γ in ES-Zellen die Differenzierung zu Trophektoderm auslöst, was durch einen Morphologiewechsel und der Expression von TS-Markern verdeutlicht wurde.

Markerexpression für extraembryonales Endoderm, wie Gata-6 und AFP, wurden nicht detektiert was verdeutlicht, dass durch Überexpression von AP-2 γ in ES-Zellen die Differenzierung in die trophektodermale Linie exklusiv induziert wird, nicht aber die Differenzierung des extraembryonalen Endoderms. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass AP-2 γ bereits früh in der Hierarchie der Zelldeterminierung agiert. Eine Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Trophektoderm durch Überexpression wurde bereits für den Transkriptionsfaktor Cdx2 gezeigt (Niwa et al., 2005). Ebenfalls wurde Differenzierung von ES-Zellen zu Trophektoderm durch die Repression von Oct4 gezeigt (Hay et al., 2004). Die Repression des Pluripotenzgens Nanog führt nicht zur Induktion von Trophektoderm, sondern zu extraembryonalem Endoderm (Mitsui et al., 2003).

Der Prozess oder die Faktoren, die AP-2 γ Expression regulieren oder von AP-2 γ reguliert werden, sind noch nicht aufgeklärt. Bis zum Morulastadium wird AP-2 γ ubiquitär exprimiert, anschließend wird die Expression auf das Trophektoderm beschränkt, dieses Expressionsmuster von AP-2 γ kann durch Kontrollmechanismen der Zellpolarisation, aber auch durch Regulation durch andere Transkriptionsfaktoren festgelegt werden. Die exklusive Expression von AP-2 γ im Trophektoderm kann auf der Ebene der Transkription durch eine Aktivierung von AP-2 γ in den äußeren Zellen der Morula vermittelt werden. Ist einmal in einer Zelle AP-2 γ Expression vorhanden, kann diese weiter amplifiziert oder sogar verstärkt werden, da AP-2 γ sich selbst transaktivieren kann. Die Autoregulation wurde in unserer Arbeitsgruppe in einem Luziferase-Assay in ES-Zellen nachgewiesen (Diplomarbeit P. Kuckenberger). Zu dem Zeitpunkt, an dem das trophektodermale Zellschicksal etabliert wird, findet man Cdx2 Expression zuerst in den inneren und äußeren Zellen der Morula exprimiert, dann bleibt die Expression exklusiv in einigen äußeren Zellen erhalten. Aufgrund des parallelen Expressionsmusters könnte Cdx2 ein Interaktionspartner von AP-2 γ sein und eventuell AP-2 γ aktivieren, oder aber die Gene arbeiten unabhängig voneinander, reagieren jedoch auf denselben Stimulus. Ein Transkriptionsfaktor, von welchem spekuliert wird, dass er Cdx2 aktivieren könnte, ist TEAD4 (Yagi et al., 2007). Da TEAD4 bereits im 2-Zellstadium exprimiert wird, Cdx2 aber erst im 8-Zellstadium (Niwa et al., 2005), wird die Hypothese aufgestellt, dass TEAD4-Aktivität Cdx2 induziert. Ein Experiment, welches diese Hypothese bestätigt, ist bisher allerdings noch nicht gezeigt worden, bisher sind im Cdx2-Promotor mehrere potentielle TEAD4-Bindestellen gefunden worden (Yagi et al., 2007). Es ist ebenfalls möglich, dass TEAD4 AP-2 γ Expression reguliert, bisher sind allerdings noch keine Analysen durchgeführt worden, ob sich im AP-2 γ -Promotor TEAD4-Bindestellen

befinden. Zum Zeitpunkt der Liniendeterminierung könnte die exklusive Expression von AP-2 γ auch durch dessen Repression in den Zellen der inneren Zellmasse erlangt werden, hier sind, wie bereits erwähnt, die Proteine von Oct4, Sox2 und Nanog detektierbar (Boyer et al., 2005) und somit potentielle Interaktionspartner für gegenläufige Regulationen zwischen ihnen und AP-2 γ .

In Expressionsanalysen wurde durch Überexpression von AP-2 γ in embryonalen Stammzellen die interessante Beobachtung gemacht, dass endogene Cdx2-Expression durch AP-2 γ Überexpression induziert wurde, umgekehrt jedoch auch endogene AP-2 γ Expression nach Cdx2 Überexpression zu detektieren war. Dieses Ergebnis weist auf eine positive Rückkopplung zwischen diesen beiden Transkriptionsfaktoren hin. Um funktionelle Regulationen zwischen AP-2 γ und potentiellen Interaktionspartnern wie Cdx2, Oct4, Nanog und zu untersuchen, wurde Cdx2 in embryonalen Stammzellen, die Wildtyp oder AP-2 γ defizient waren, überexprimiert. Die Tatsache, dass die embryonalen Stammzellen unabhängig vom Vorhandensein oder Verlust von AP-2 γ zu Trophektoderm differenzieren konnten lässt darauf schließen, dass Cdx2 vermutlich parallel zu AP-2 γ aktiv ist und eventuell AP-2 γ aktivieren könnte. Potentielle Bindestellen für Cdx2 im Promotorbereich von AP-2 γ machen eine Transaktivierung wahrscheinlich, in unserer Arbeitsgruppe konnte diese in Luziferase-Assays in ES-Zellen bereits festgestellt werden (Diplomarbeit P. Kuckenbergl). Umgekehrt wurden im Cdx2 Promotor keine potentiellen Bindestellen für AP-2 γ ausgemacht und es konnte keine Transaktivierung von AP-2 γ auf Cdx2 im Luziferase-Assay gezeigt werden. Des Weiteren verdeutlicht dieses Ergebnis der Differenzierung zu Trophektoderm, dass Cdx2 unabhängig von der AP-2 γ die Expression weiterer trophektodermspezifischer Gene aktivieren kann, um eine Differenzierung in Trophektoderm auszulösen. So wurde die Expression der Gene Eomes und Hand1 nach Cdx2 Überexpression unabhängig von AP-2 γ hochreguliert, was darauf hinweist, dass zur Induktion von Eomes und Hand1 AP-2 γ nicht essentiell ist. Allerdings lässt die verzögerte Differenzierung in AP-2 γ defizienten ES-Zellen darauf schließen, dass AP-2 γ an der Induktion der trophektodermalen Marker Eomes und Hand1 beteiligt ist.

Äußerst bemerkenswert ist die Feststellung, dass die Expression von Nanog bei AP-2 γ defizienten Zellen nach Cdx2 Induktion nicht so stark abnimmt, wie in AP-2 γ Wildtyp Stammzellen. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Regulation von Nanog AP-2 γ abhängig ist und AP-2 γ Nanog reprimiert. In unserer Arbeitsgruppe wurde in Chromatin-Immunpräzipitations-Analysen (ChIP) gezeigt, dass AP-2 γ am Nanog-Promotor bindet und

auf diese Weise Nanog reprimiert (Diplomarbeit P. Kuckenberger). Die verzögerte Differenzierung zu Trophektoderm in den AP-2 γ defizienten embryonalen Stammzellen nach Cdx2 Induktion ist vermutlich eine Folge der fehlenden AP-2 γ -vermittelten Repression von Nanog. Im sich entwickelnden murinen Embryo wird Nanog zum Zeitpunkt der Implantation durch bisher unbekannte Faktoren oder Mechanismen reprimiert (Chambers et al., 2003), nach dem Ergebnis dieser Arbeit kann hier die Hypothese aufgestellt werden, dass der Transkriptionsfaktor AP-2 γ für diese Repression verantwortlich ist. Die Pluripotenzgene Oct4 und Sox2 werden gleichermaßen reprimiert und deshalb vom Verlust von AP-2 γ nicht beeinträchtigt und scheinen so unabhängig von AP-2 γ reguliert zu werden.

Nach den in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnissen lässt sich der Transkriptionsfaktor AP-2 γ im Modell des Netzwerks der Transkriptionsfaktoren zur Kontrolle der Erhaltung und Differenzierung von Stammzellen eingliedern (Abb.4.1).

AP-2 γ spielt eine Rolle bei der Etablierung und Erhaltung des Trophektoderms, möglicherweise wird AP-2 γ von Cdx2 transaktiviert. Da AP-2 γ sich autoreguliert, verstärkt sich die exklusive Expression im Trophektoderm.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass AP-2 γ für die Etablierung und Erhaltung des Trophektoderms essentiell ist, AP-2 γ ist in die frühe Liniendeterminierung involviert und reprimiert das Pluripotenzgen Nanog. Zudem ist AP-2 γ auch an der Induktion von Genen des Trophektoderms beteiligt, wie Eomes und Hand1. Durch AP-2 γ Induktion entstandene TS-Zellen sind funktionelle Trophoblast-Stammzellen. Zudem trägt AP-2 γ mit der Repression von Nanog zur Determinierung der frühen Zelllinien in der Blastozyste bei.

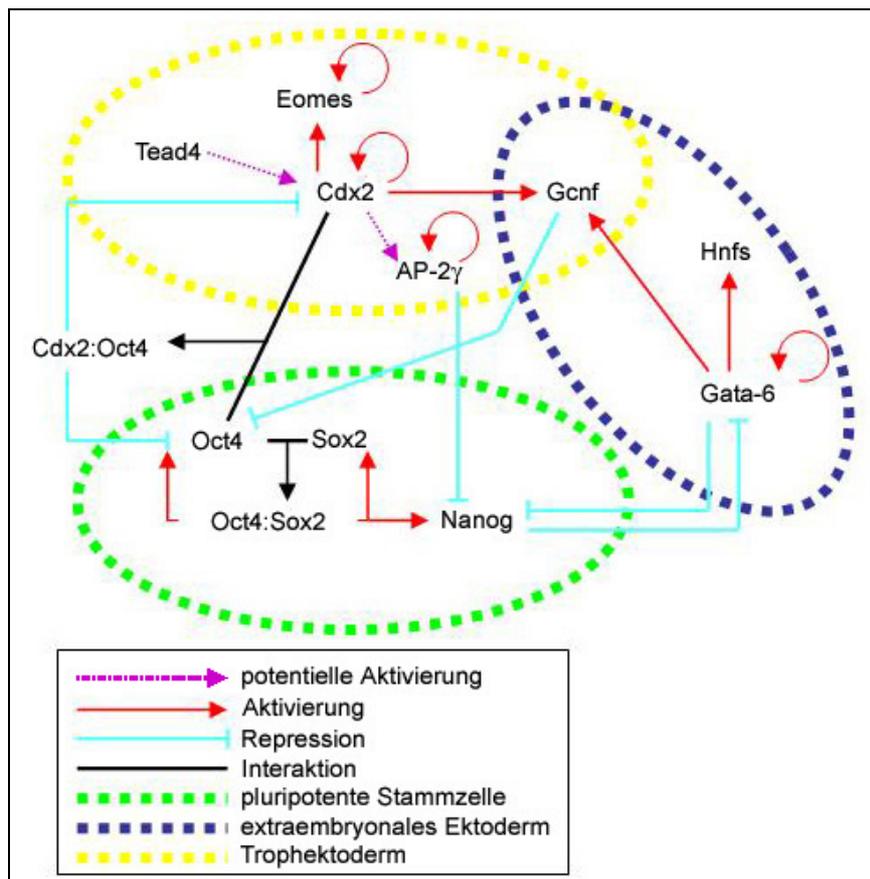


Abb. 4.1: Transkriptionsfaktor AP-2 γ im Netzwerk der Transkriptionsfaktoren zur Kontrolle der Erhaltung und Differenzierung von Stammzellen (modifiziert (Niwa, 2007))

Netzwerk der Transkriptionsfaktoren für pluripotente Stammzellen (grün), Trophektoderm (gelb) und primitiven Endoderm (blau). Positive Rückkopplungszyklen (rot) zwischen Oct4, Sox2 und Nanog erhalten ihre Expression, um die Selbsterneuerung in ES-Zellen zu unterstützen. Cdx2 ist autoreguliert und bildet mit Oct4/Sox2 eine reziproke Inhibitionsschleife (blau), die ein gegenseitiges Ausschließen ihrer Expression begründet. Ein ähnlicher reziproker Inhibitionszyklus existiert wahrscheinlich zwischen Nanog und Gata-6. Cdx2 könnte durch Tead4 aktiviert werden (violett), Cdx2 aktiviert Eomes. AP-2 γ wird nach unseren Ergebnissen ebenfalls durch Cdx2 aktiviert (violett) und ist autoreguliert, es unterstützt durch Repression von Nanog die Determinierung. Die Kombination aus positiven Rückkopplungsschleifen und reziproken Inhibitionszyklen wandelt konstante Anfangsparameter in kombinierte Wahrscheinlichkeitsverteilungen, die in einer klaren Abgrenzung dieser Zelllinien resultieren. Gcnf agiert als negatives Rückkopplungssystem, um Oct4 komplett zu reprimieren. Gata-6 aktiviert Hnf-Transkriptionsfaktoren.

5. Ausblick

Die Eingliederung von AP-2 γ in das Netzwerk der Transkriptionsfaktoren zum Zeitpunkt der frühen Liniendeterminierung wirft einige Fragen für zukünftige Analysen auf.

Unklar ist noch immer, wie AP-2 γ reguliert wird. Ein potentieller Kandidat, AP-2 γ zu transaktivieren, wäre Cdx2. Reporterassays können eine Transaktivierung aufzeigen, zusätzliche Bestätigung kann man mit einer Mutation der potentiellen Cdx2-Bindestelle im AP-2 γ -Promotor und der anschließend ausbleibenden Transaktivierung durch Cdx2 im Reporterassay erhalten. Im Zellkultursystem müsste überprüft werden, ob AP-2 γ in Abwesenheit von Cdx2 die Differenzierung zu Trophektoderm induzieren kann.

In Versuchen mit Kulturen von embryonalen Stammzellen wurde die Repression von Nanog durch AP-2 γ gezeigt. Mit dieser Feststellung der Repression von Nanog durch AP-2 γ in embryonalen Stammzellen wirft sich die Frage auf, was passiert, wenn Nanog in Trophektoderm-Stammzellen exprimiert wird, findet eine Reprogrammierung zu embryonalen Stammzellen, statt? Dazu könnte man ein induzierbares Nanog-Gen stabil in Trophektoderm-Stammzellen einbringen und nach der Induktion von Nanog neben morphologischen Beobachtungen die Veränderungen in der Genexpression durch RT-PCRs analysieren. Interessant ist zusätzlich die Frage, wie sich die Situation in vivo im Embryo verhält. Zur Untersuchung von Nanog Expression in AP-2 γ defizienten Mäusen könnte man AP-2 γ defiziente Blastozysten und Embryonen zum Zeitpunkt der Implantation mit Immunfluoreszenzfärbungen oder mit in situ Hybridisierungen auf ektopische Nanog Expression analysieren.

Noch immer ist die genaue Position von AP-2 γ im regulativen Netzwerk im Trophektoderm ungeklärt. Es ist nicht direkt möglich, aus AP-2 γ defizienten Blastozysten Trophektoderm-Stammzellen zu generieren, deshalb müsste man den Verlust von AP-2 γ in Trophektoderm-Stammzellen mit konditionalen AP-2 γ Allelen durch die Verwendung der Cre-Rekombinase erreichen. Die direkte Anwendung der Cre-Rekombinase mit Hilfe eines membranpermeablen Cre-Proteins zeigt generell, dass so der Verlust von AP-2 γ induziert werden kann, leider hatten aber nicht alle Zellen AP-2 γ verloren und eine Analyse einzelner Klone war nicht möglich gewesen. Um dieses Problem zu umgehen, müsste ein induzierbares Cre-Gen stabil in die Trophektoderm-Stammzellen mit den konditionalen AP-2 γ Allelen eingebracht werden. Bisherige Versuche mit verschiedensten Transfektionstechniken und Infektionen mit Retroviren erbrachten keine befriedigenden

Effizienzen und keine Möglichkeit, einzelne Zellklone mit einem integrierten Cre-Konstrukt zu isolieren. Nun könnte man durch Verpaarungen von entsprechenden Mäusen die Gene in der gewünschten Kombination in Embryonen einzubringen und aus diesen neue Trophoblast-Stammzellen generieren. Dazu müsste man AP-2 $\gamma^{\text{flox/flox}}$ -Mäuse mit Mäusen verpaaren, die ubiquitär ein induzierbares Cre exprimieren, beispielsweise ein tamoxifeninduzierbares Cre im ROSA26-Lokus. Aus Verpaarungen mit Mäusen, die AP-2 $\gamma^{\text{flox/flox}}$ Allele, als auch das induzierbare Cre-Gen tragen, müsste man die Blastozysten isolieren und Trophoblast-Stammzellen etablieren. In diesen könnte man durch Zugabe von Tamoxifen den Verlust von AP-2 γ induzieren. Anschließend kann mit einem TUNEL-Assay überprüft werden, ob AP-2 γ defiziente Trophoblaststammzellen apoptotisch sind; mögliche Proliferationsdefekte könnte die verminderte Kooperation von BrDU aufzeigen. Um die Differenzierung zu anderen Zelltypen zu untersuchen müssten Expressionsanalysen, wie RT-PCRs durchgeführt werden. Hiermit könnte auch analysiert werden, ob diese Zellen durch den Verlust von AP-2 γ wieder zu embryonalen Stammzellen „reprogrammiert“ werden. Bisher ist der Vorgang der Reprogrammierung an somatischen Zellen gezeigt worden (Takahashi and Yamanaka, 2006), über eine mögliche Reprogrammierung von Trophoblast-Stammzellen ist bisher nichts bekannt.

6. Literatur

- Anson-Cartwright, L., Dawson, K., Holmyard, D., Fisher, S.J., Lazzarini, R.A., and Cross, J.C. (2000). The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nature genetics* 25, 311-314.
- Auman, H.J., Nottoli, T., Lakiza, O., Winger, Q., Donaldson, S., and Williams, T. (2002). Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development. *Development* 129, 2733-2747.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development* 17, 126-140.
- Bissonauth, V., Roy, S., Gravel, M., Guillemette, S., and Charron, J. (2006). Requirement for Map2k1 (Mek1) in extra-embryonic ectoderm during placentogenesis. *Development (Cambridge, England)* 133, 3429-3440.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., *et al.* (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., and Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development (Cambridge, England)* 132, 885-896.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-655.
- Chawengsaksophak, K., James, R., Hammond, V.E., Kontgen, F., and Beck, F. (1997). Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 386, 84-87.
- Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Decimo, D., Chambon, P., and Dolle, P. (1996). AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis. *Mechanisms of development* 54, 83-94.
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., and Rossant, J. (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Developmental cell* 10, 615-624.
- Deb, K., Sivaguru, M., Yong, H.Y., and Roberts, R.M. (2006). Cdx2 gene expression and trophoctoderm lineage specification in mouse embryos. *Science (New York, NY)* 311, 992-996.
- Donnison, M., Beaton, A., Davey, H.W., Broadhurst, R., L'Huillier, P., and Pfeffer, P.L. (2005). Loss of the extraembryonic ectoderm in Elf5 mutants leads to defects in embryonic patterning. *Development* 132, 2299-2308.
- Eckert, D., Buhl, S., Weber, S., Jager, R., and Schorle, H. (2005). The AP-2 family of transcription factors. *Genome biology* 6, 246.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., and Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and biophysical research communications* 237, 752-757.
- Feng, W., and Williams, T. (2003). Cloning and characterization of the mouse AP-2 epsilon gene: a novel family member expressed in the developing olfactory bulb. *Molecular and cellular neurosciences* 24, 460-475.

- Fleming, T.P., Sheth, B., and Fesenko, I. (2001). Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophoblast differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front Biosci* 6, D1000-1007.
- Gassmann, M., Donoho, G., and Berg, P. (1995). Maintenance of an extrachromosomal plasmid vector in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1292-1296.
- Giroux, S., Tremblay, M., Bernard, D., Cardin-Girard, J.F., Aubry, S., Larouche, L., Rousseau, S., Huot, J., Landry, J., Jeannotte, L., *et al.* (1999). Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol* 9, 369-372.
- Hart, A.H., Hartley, L., Ibrahim, M., and Robb, L. (2004). Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev Dyn* 230, 187-198.
- Hattori, N., Nishino, K., Ko, Y.G., Hattori, N., Ohgane, J., Tanaka, S., and Shiota, K. (2004). Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 17063-17069.
- Hay, D.C., Sutherland, L., Clark, J., and Burdon, T. (2004). Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 22, 225-235.
- Hemberger, M. (2007). Epigenetic landscape required for placental development. *Cell Mol Life Sci* 64, 2422-2436.
- Hemberger, M., Hughes, M., and Cross, J.C. (2004). Trophoblast stem cells differentiate in vitro into invasive trophoblast giant cells. *Dev Biol* 271, 362-371.
- Ishii, T., Yasuchika, K., Machimoto, T., Kamo, N., Komori, J., Konishi, S., Suemori, H., Nakatsuji, N., Saito, M., Kohno, K., *et al.* (2007). Transplantation of Embryonic Stem Cell-derived Endodermal Cells Into Mice with Induced Lethal Liver Damage. *Stem Cells*.
- Ivanova, N., Dobrin, R., Lu, R., Kotenko, I., Levorse, J., DeCoste, C., Schafer, X., Lun, Y., and Lemischka, I.R. (2006). Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442, 533-538.
- Jager, R., Werling, U., Rimpf, S., Jacob, A., and Schorle, H. (2003). Transcription factor AP-2gamma stimulates proliferation and apoptosis and impairs differentiation in a transgenic model. *Mol Cancer Res* 1, 921-929.
- Koutsourakis, M., Langeveld, A., Patient, R., Beddington, R., and Grosveld, F. (1999). The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development (Cambridge, England)* 126, 723-732.
- Kunath, T., Arnaud, D., Uy, G.D., Okamoto, I., Chureau, C., Yamanaka, Y., Heard, E., Gardner, R.L., Avner, P., and Rossant, J. (2005). Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Development (Cambridge, England)* 132, 1649-1661.
- Li, W., and Cornell, R.A. (2007). Redundant activities of Tfap2a and Tfap2c are required for neural crest induction and development of other non-neural ectoderm derivatives in zebrafish embryos. *Dev Biol* 304, 338-354.
- Luo, J., Sladek, R., Bader, J.A., Matthyssen, A., Rossant, J., and Giguere, V. (1997). Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta. *Nature* 388, 778-782.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., *et al.* (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature cell biology* 9, 625-635.
- McConnell, J., Petrie, L., Stennard, F., Ryan, K., and Nichols, J. (2005). Eomesodermin is expressed in mouse oocytes and pre-implantation embryos. *Molecular reproduction and development* 71, 399-404.

- Meissner, A., and Jaenisch, R. (2006). Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts. *Nature* 439, 212-215.
- Mitchell, P.J., Wang, C., and Tjian, R. (1987). Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* 50, 847-861.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-642.
- Mohibullah, N., Donner, A., Ippolito, J.A., and Williams, T. (1999). SELEX and missing phosphate contact analyses reveal flexibility within the AP-2[alpha] protein: DNA binding complex. *Nucleic acids research* 27, 2760-2769.
- Moser, M., Imhof, A., Pscherer, A., Bauer, R., Amselgruber, W., Sinowatz, F., Hofstadter, F., Schule, R., and Buettner, R. (1995). Cloning and characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 beta. *Development (Cambridge, England)* 121, 2779-2788.
- Moser, M., Pscherer, A., Roth, C., Becker, J., Mucher, G., Zerres, K., Dixkens, C., Weis, J., Guay-Woodford, L., Buettner, R., *et al.* (1997). Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta. *Genes & development* 11, 1938-1948.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-391.
- Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development (Cambridge, England)* 134, 635-646.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics* 24, 372-376.
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., and Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123, 917-929.
- Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Chazaud, C., Dolle, P., and Chambon, P. (1996). AP-2.2: a novel AP-2-related transcription factor induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Experimental cell research* 225, 338-347.
- Palmieri, S.L., Peter, W., Hess, H., and Scholer, H.R. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Developmental biology* 166, 259-267.
- Peitz, M., Jager, R., Patsch, C., Jager, A., Egert, A., Schorle, H., and Edenhofer, F. (2007). Enhanced purification of cell-permeant Cre and germline transmission after transduction into mouse embryonic stem cells. *Genesis* 45, 508-517.
- Pesce, M., and Scholer, H.R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 19, 271-278.
- Ralston, A., and Rossant, J. (2005). Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo. *Clinical genetics* 68, 106-112.
- Ralston, A., and Rossant, J. (2007). Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev Biol*.
- Rodda, D.J., Chew, J.L., Lim, L.H., Loh, Y.H., Wang, B., Ng, H.H., and Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *The Journal of biological chemistry* 280, 24731-24737.
- Rossant, J. (2007). Stem cells and lineage development in the mammalian blastocyst. *Reproduction, fertility, and development* 19, 111-118.
- Rossant, J., and Cross, J.C. (2001). Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2, 538-548.

- Russ, A.P., Wattler, S., Colledge, W.H., Aparicio, S.A., Carlton, M.B., Pearce, J.J., Barton, S.C., Surani, M.A., Ryan, K., Nehls, M.C., *et al.* (2000). Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* **404**, 95-99.
- Sapin, V., Bouillet, P., Oulad-Abdelghani, M., Dastugue, B., Chambon, P., and Dolle, P. (2000). Differential expression of retinoic acid-inducible (Stra) genes during mouse placentation. *Mechanisms of development* **92**, 295-299.
- Schorle, H., Meier, P., Buchert, M., Jaenisch, R., and Mitchell, P.J. (1996). Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* **381**, 235-238.
- Schultz, R.M. (2002). The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Human reproduction update* **8**, 323-331.
- Shi, D., and Kellems, R.E. (1998). Transcription factor AP-2gamma regulates murine adenosine deaminase gene expression during placental development. *The Journal of biological chemistry* **273**, 27331-27338.
- Strumpf, D., Mao, C.A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., and Rossant, J. (2005). *Cdx2* is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst. *Development (Cambridge, England)* **132**, 2093-2102.
- Sutherland, A. (2003). Mechanisms of implantation in the mouse: differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behavior. *Developmental biology* **258**, 241-251.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.
- Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A.K., Nagy, A., and Rossant, J. (1998). Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science (New York, NY)* **282**, 2072-2075.
- Tolkunova, E., Cavaleri, F., Eckardt, S., Reinbold, R., Christenson, L.K., Scholer, H.R., and Tomilin, A. (2006). The caudal-related protein *cdx2* promotes trophoblast differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **24**, 139-144.
- Wen, F., Tynan, J.A., Cecena, G., Williams, R., Munera, J., Mavrothalassitis, G., and Oshima, R.G. (2007). *Ets2* is required for trophoblast stem cell self-renewal. *Dev Biol.*
- Werling, U., and Schorle, H. (2002). Transcription factor gene AP-2 gamma essential for early murine development. *Molecular and cellular biology* **22**, 3149-3156.
- Williams, T., Admon, A., Luscher, B., and Tjian, R. (1988). Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes & development* **2**, 1557-1569.
- Williams, T., and Tjian, R. (1991). Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes & development* **5**, 670-682.
- Winger, Q., Huang, J., Auman, H.J., Lewandoski, M., and Williams, T. (2006). Analysis of transcription factor AP-2 expression and function during mouse preimplantation development. *Biol Reprod* **75**, 324-333.
- Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R.I., Ornitz, D.M., Leder, P., and Deng, C. (1998). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development (Cambridge, England)* **125**, 753-765.
- Yagi, R., Kohn, M.J., Karavanova, I., Kaneko, K.J., Vullhorst, D., Depamphilis, M.L., and Buonanno, A. (2007). Transcription factor TEAD4 specifies the trophoblast lineage at the beginning of mammalian development. *Development (Cambridge, England)* **134**, 3827-3836.
- Yamamoto, H., Flannery, M.L., Kupriyanov, S., Pearce, J., McKercher, S.R., Henkel, G.W., Maki, R.A., Werb, Z., and Oshima, R.G. (1998). Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of *Ets2*. *Genes & development* **12**, 1315-1326.

- Yamanaka, Y., Ralston, A., Stephenson, R.O., and Rossant, J. (2006). Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn* 235, 2301-2314.
- Zhang, J., Hagopian-Donaldson, S., Serbedzija, G., Elsemore, J., Plehn-Dujowich, D., McMahon, A.P., Flavell, R.A., and Williams, T. (1996). Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 381, 238-241.
- Zhao, F., Satoda, M., Licht, J.D., Hayashizaki, Y., and Gelb, B.D. (2001). Cloning and characterization of a novel mouse AP-2 transcription factor, AP-2delta, with unique DNA binding and transactivation properties. *The Journal of biological chemistry* 276, 40755-40760.

7. Anhang