

# Die Rolle des Transkriptionsfaktors AP-2 $\gamma$ in primordialen Keimzellen

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn

Vorgelegt von  
**Dawid Eckert**  
aus Siegen  
2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online\\_elektronisch](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online_elektronisch) publiziert.

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Hubert Schorle  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Willecke

Tag der Promotion: 17. Aug. 2009  
Erscheinungsjahr: 2009

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich allen Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei folgenden Personen:

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hubert Schorle möchte ich mich für die Ermöglichung dieser Dissertation, durch für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der nötigen Mittel sowie die stete Diskussionsbereitschaft danken.

Prof. Dr. Klaus Willecke möchte ich für die Übernahme des Koreferats, sowie Prof. Dr. Dieter Fürst und Prof. Dr. Reinhard Büttner für die Teilnahme an der Promotionskommission als Gutachter danken.

Ein großer Dank gilt auch Mitgliedern anderer Arbeitsgruppen, die durch Kooperationen einen wesentlichen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben: Prof. Dr. Hans Schöler und Dipl.-Biol. Karin Hübner, Max-Planck-Institut für Molekulare Biomedizin, Münster; Prof. Dr. Leendert Loijenga und Dr. Ad Gillis, Erasmus MC, Rotterdam, Niederlande.

Ein großes Dankeschön gilt natürlich den derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern in der Pathologie, insbesondere Verena Thewes, Susanne Weber, Sabine Schäfer, Daniel Nettersheim und Peter Kuckenberger – durch das besondere Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft hat das Arbeiten besonders viel Spaß gemacht!

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und meiner Freundin Claudia Schuhmaier, die mich immer wieder während meinen wissenschaftlichen Durststrecken aufgebaut und mir großen Rückhalt geboten haben.

## Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit sollte sowohl die Expression von AP-2 $\gamma$  in frühen Stadien primordialer Keimzellen, als auch die Konsequenzen des Verlustes von AP-2 $\gamma$  auf die molekularen Mechanismen in primordialen Keimzellen mittels geeigneter *in vitro* Systeme untersucht werden.

AP-2 $\gamma$  gehört zu der Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren, die jeweils aus Mitgliedern bei Mensch und Maus besteht. Diese Transkriptionsfaktoren werden während der Embryogenese in verschiedenen Geweben exprimiert und werden mit Differenzierung, Zellzykluskontrolle, Proliferation und Apoptose in Verbindung gebracht. Zudem haben frühere Arbeiten gezeigt, dass der Verlust von AP-2 $\gamma$  im Embryo zu einem Keimzellverlust kurz nach der Spezifizierung führt, sodass die Frage aufkommt, welche Rolle AP-2 $\gamma$  in der Keimzellbiologie spielt.

Primordiale Keimzellen werden früh während der Embryogenese in der Basis der Allantois etabliert (E7.25-7.5) und beginnen anschließend mit der Migration durch den Embryo zu den Genitalanlagen. Bereits während der Spezifizierung spielen komplexe genetische Vorgänge eine sehr wichtige Rolle. Dabei ist das Protein Blimp-1 essentiell, da es sowohl keimzellspezifische Gene aktiviert als auch Gene reprimiert, die für eine somatische Differenzierung verantwortlich sind, und somit die primordialen Keimzellen von den umgebenden Zellen abgrenzt.

In dieser Arbeit konnte die Expression von AP-2 $\gamma$  in primordialen Keimzellen in den Stadien E7.5-8.5 gezeigt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Verlust der Keimzellen in den Nullmutanten nicht durch Apoptose verursacht wird.

Um die molekularen Mechanismen, die diesem Keimzellverlust unterliegen, zu untersuchen, wurden zwei *in vitro* Systeme etabliert. Dazu wurden zum einen murine embryonale Stammzellen (AP-2 $\gamma^{+/+}$  und AP-2 $\gamma^{-/-}$ ) in EB-Kulturen zu primordialen Keimzellen differenziert, des Weiteren wurde die humane Keimzelltumorzelllinie Tcam-2 als Seminom-Zelllinie charakterisiert und somit als geeignetes *in vitro* System für Keimzellen etabliert.

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass der Verlust von AP-2 $\gamma$  zu einer Hochregulation von mesodermalen Markern sowohl im murinen, als auch im humanen System führt. Zudem geht der Verlust von AP-2 $\gamma$  mit einer Deregulation von miRNS-Molekülen einher, die mit mesodermaler Differenzierung in Verbindung gebracht werden.

Den Ergebnissen dieser Arbeit nach scheint AP-2 $\gamma$  in einer Kaskade unterhalb von Blimp1 zu liegen und verhindert die Differenzierung primordialer Keimzellen in mesodermale Zellen.

## Inhaltsangabe

<b>Danksagung</b> .....	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>V</b>
<b>Inhaltsangabe</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1 <i>Keimzellentwicklung</i> .....	6
1.1.1 Entwicklung muriner Keimzellen .....	6
1.1.2 Initiierung der Keimzellkompetenz .....	7
1.1.3 Spezifizierung der primordialen Keimzellen .....	7
1.1.4 Migration primordialer Keimzellen .....	10
1.1.5 Sexuelle Differenzierung der Keimzellen .....	11
1.2 <i>Keimzelltumore</i> .....	12
1.2.1 Typ I Keimzelltumore.....	12
1.2.2 Typ II Keimzelltumore.....	13
1.2.3 Typ III Keimzelltumore.....	14
1.3 <i>Die Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren</i> .....	14
1.3.1 AP-2 $\alpha$ .....	16
1.3.2 AP-2 $\beta$ .....	17
1.3.3 AP-2 $\gamma$ .....	17
1.3.3.1 AP-2 $\gamma$ in humanen Keimzellen und Keimzelltumoren.....	19
1.3.4 AP-2 $\delta$ .....	19
1.3.5 AP-2 $\epsilon$ .....	20
1.4 <i>In vitro Systeme zur Erforschung der molekularbiologischen Mechanismen in Keimzellen</i> .....	20
1.4.1 ES-Zell-basierte <i>in vitro</i> Systeme .....	21
1.4.2 Zelllinien-basierte <i>in vitro</i> Systeme.....	23
1.5 <i>microRNS-Moleküle (miRNS) und die RNS-Interferenz (RNAi)</i> .....	23
1.5.1 miRNS-Moleküle und das Zellschicksal .....	25
1.5.2 Rolle kurzer nicht-kodierender RNS-Moleküle während der Keimzellentwicklung	26
1.6 <i>Gezielte Mutagenese im Modellorganismus Maus (Mus musculus)</i> .....	27
1.6.1 Herstellung von konditionalen Mausmutanten .....	27
1.6.2 Konditionale Mausmutanten von AP-2 $\gamma$ .....	28
1.7 <i>Zielsetzung</i> .....	29
<b>2 Material</b> .....	<b>30</b>
2.1 <i>allgemeine Chemikalien</i> .....	30
2.1.1 Radiochemikalien .....	31
2.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	31
2.3 <i>verwendete Enzyme</i> .....	32
2.4 <i>Laborgeräte</i> .....	32
2.5 <i>Puffer, Lösungen, Medien</i> .....	33
2.5.1 allgemeine Lösungen .....	33
2.5.2 Lösungen für die Zellkultur .....	34
2.5.3 Medien für die Zellkultur .....	35
2.5.4 Lösungen für die Bakterienkultur.....	35
2.5.5 Lösungen für die Präparation und Antikörperfärbung von Mausembryonen.....	35
2.6 <i>Nukleinsäuren</i> .....	36
2.6.1 Oligonukleotide zur Detektion muriner Sequenzen .....	36
2.6.2 Oligonukleotide zur Detektion humaner Sequenzen .....	37

2.6.3 siRNS .....	37
2.6.4 Oligonukleotide für die Synthese von cDNS .....	37
2.6.5 Oligonucleotide zur radioaktiven Detektion von miRNS .....	37
<b>2.7 Antikörper und magnetische Beads .....</b>	<b>38</b>
2.7.1 primäre Antikörper .....	38
2.7.2 sekundäre Antikörper .....	39
2.7.3 magnetische Beads .....	39
<b>2.8 Zellsysteme .....</b>	<b>39</b>
2.8.1 Prokarioten .....	39
2.8.2 Eukaryoten .....	39
<b>2.9 Mauslinien .....</b>	<b>40</b>
<b>2.10 Kits .....</b>	<b>40</b>
<b>3 Methoden .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Tierhaltung .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2 Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>41</b>
3.2.1 Präparation kompetenter <i>E.coli</i> -Kulturen .....	41
3.2.2 Herstellung von LB-Amp-Agarplatten .....	41
3.2.3 TOPO-Klonierung .....	42
3.2.4 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA ("Mini-Präp") .....	42
3.2.5 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA ("Maxi-Präp") .....	42
<b>3.3 Nukleinsäureanalytik .....</b>	<b>43</b>
3.3.1 DNS-Isolation aus Geweben und Zellen .....	43
3.3.2 RNS-Isolation aus Geweben und Zellen .....	43
3.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung Nukleinsäure-haltiger Lösungen .....	44
3.3.4 Restriktionsverdau .....	44
3.3.5 DNaseI-Verdau von RNS-Lösungen .....	44
3.3.6 Denaturierung von RNS-haltigen Lösungen zur qualitativen Analyse .....	44
3.3.7 Agarose-Gelelektrophorese .....	45
3.3.8 Elution von DNS aus Agarose-Gelen .....	45
3.3.9 Synthese von copy-DNS (cDNS) .....	46
3.3.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	46
3.3.11 Synthese von radioaktiv markierten Sonden zur Detektion von miRNS .....	49
3.3.12 Hybridisierung von radioaktiv markierten Sonden mit total-RNS-haltigen Lösungen .....	50
3.3.13 Acrylamid-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	50
3.3.14 Elution von radioaktiv markierten Sonden aus Acrylamid-Gelen .....	51
3.3.15 Detektion von miRNS .....	51
3.3.16 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) .....	51
<b>3.4 Proteinanalytik .....</b>	<b>52</b>
3.4.1 Proteinisolation aus Gewebe und Zellen .....	52
3.4.2 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen .....	52
3.4.3 Immunpräzipitation .....	53
3.4.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	53
3.4.5 Immuno-Blot-Analyse (Western-Blot) .....	54
3.4.6 Chemolumineszenz-Detektion .....	55
3.4.7 Entfernen von Antikörpern von der PVDF-Membran ("strippen") .....	55
<b>3.5 Zellkultur .....</b>	<b>56</b>
3.5.1 Präparation, Kultivierung und Mitose-Inaktivierung von embryonalen Fibroblasten .....	56
3.5.2 Trypsinisieren und Vereinzeln von Zellen .....	56
3.5.3 Bestimmung der Zellzahl .....	56
3.5.4 Einfrieren von Zellen .....	57
3.5.5 Auftauen von Zellen .....	57
3.5.6 Gelatinisieren von Zellkulturschalen .....	57
3.5.7 Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES-Kultur) .....	57
3.5.8 Trennung embryonaler Stammzellen von Feederzellen .....	58

3.5.9 Aggregation von ES-Zellen in Tropfenkulturen ('hangig drop culture')	58
3.5.10 EB-Kultur zur Differenzierung von ES-Zellen in primordiale Keimzellen	58
3.5.11 Zellseparation mit magnetischen Partikeln	58
3.5.12 Ablegen von Einzelzellsuspensionen auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger	59
<b>3.6 Histologische Analytik</b>	<b>59</b>
3.6.1 Fixierung	59
3.6.2 Einbetten	60
3.6.3 Herstellung von Paraffin-Schnitten	60
3.6.4 Indirekte Immunfluoreszenz von AP-2 $\gamma$ auf Paraffin-Schnitten	60
3.6.5 Permeabilisierung von Zellen	60
3.6.6 Indirekte Immunfluoreszenz	61
3.6.7 Nachweis apoptotischer Zellen in ganzen Embryonen mittels TUNEL-Assay	61
3.6.8 Nachweis von Apoptosen in ganzen Embryonen mittels LysoTracker	62
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>63</b>
4.1 Expressionsmuster von AP-2 $\gamma$ während der Keimzellentwicklung	63
4.2 Untersuchungen zu apoptotischen Vorgängen in AP-2 $\gamma$ -defizienten PGCs	65
4.3 <i>In vitro</i> Analysen zur Rolle von AP-2 $\gamma$ in der Keimzellbiologie	68
4.3.1 <i>In vitro</i> Differenzierung von embryonalen Stammzellen in PGCs	68
4.3.1.1 SSEA-1 als Oberflächenmarker für PGCs in EB-Kulturen	71
4.3.1.2 Unterschiede in den Expressionsprofilen zwischen AP-2 $\gamma^{+/+}$ und AP-2 $\gamma^{-/-}$ Zellen	74
4.3.2 Die Keimzelltumorzelllinien TCam-2 und JKT-1	78
4.3.2.1 RNAi induzierte <i>knock down</i> von AP-2 $\gamma$ in der TCam-2 Zelllinie	82
4.3.2.2 Auswirkungen des AP-2 $\gamma$ -knock downs auf die TCam-2 Zelllinie	83
4.3.3 Auswirkungen des AP-2 $\gamma$ -Verlustes <i>in vitro</i> auf microRNS	85
4.3.4 ChIP-Experimente am MyoD1-Promotor in TCam-2 Zellen	87
<b>5 Diskussion</b>	<b>89</b>
5.1 AP-2 $\gamma$ wird in spezifizierten PGCs exprimiert	89
5.2 Der Verlust von AP-2 $\gamma$ im Embryo führt nicht zur Apoptose von PGCs	91
5.3 Die Keimzelltumorzelllinie TCam-2 stellt ein humanes PGC-Modell dar	92
5.4 Der Verlust von AP-2 $\gamma$ führt zur <i>Deregulation mesodermaler Marker in vitro</i>	93
5.4.1 Unterschiede in der Expression zwischen AP-2 $\gamma^{+/+}$ und AP-2 $\gamma^{-/-}$ EBs weisen auf eine mesodermale Differenzierung primordiale Keimzellen hin	93
5.4.2 Der knock down von AP-2 $\gamma$ in TCam2 führt ebenfalls zu einer Hochregulation mesodermaler Marker	96
5.4.3 Auswirkungen des AP-2 $\gamma$ -Verlustes auf mesodermassoziierte microRNS	97
5.5 Modell der Rolle von AP-2 $\gamma$ in der Keimzellbiologie	98
5.6 Ausblick	100
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>116</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	bicinchoninic acid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	ungefähr
DAB	Diaminobenzidin-Lösung
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heisst
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
dpc	dies post coitum
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
et al.	et altera = und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ES-Zellen	embryonale Stammzellen

FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
M	Molar
Mg	Milligramm
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNS	Boten-RNS (eng.: messenger RNA)
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pmol	picomol
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Enzymeinheit (engl.: unit)

u.a.	unter anderem
UTP	Uraciltriphosphat
UV	Ultraviolett
z. B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 : SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EINZELNEN STADIEN DER KEIMZELLENTWICKLUNG WÄHREND DER MURINEN EMBRYOGENESE UND EINIGEN ASSOZIIERTEN GENEN. ....	7
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER LOKALISATION DER PRIMORDIALEN KEIMZELLEN WÄHREND DER EMBRYOGENESE ZWISCHEN E6.25-E8.25. ....	8
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SPEZIFIKATION DER MURINEN PRIMORDIALEN KEIMZELLEN. ....	9
ABBILDUNG 4: PHYLOGENETISCHE ANALYSE DER AMINOSÄURE-SEQUENZEN DER AP-2-PROTEINE. ....	16
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DIMEREN PROTEINSTRUKTUR VON AP-2 AM BEISPIEL VON AP-2 $\alpha$ . ....	17
ABBILDUNG 6: ALKALISCHE PHOSPHATASE-FÄRBUNG VON GANZEN EMBRYONEN. ....	19
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PROZESSIERUNG VON KURZEN, NICHT-KODIERENDEN MIRNS-MOLEKÜLEN. ....	25
ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER CRE-VERMITTELTEN EXZISION (‘LOOP-OUT’-REAKTION). ....	28
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SYNTHESE VON RADIOAKTIV MARKIERTEN SONDEN ZUR DETEKTION VON MIRNS MITHILFE DES MIRVANA® PROBE CONSTRUCTION KITS. ....	50
ABBILDUNG 10: IMMUNFLUORESCENZ-NACHWEIS DER EXPRESSION VON AP-2 $\gamma$ AN E7.5. ...	64
ABBILDUNG 11: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON EINZELZELLSUSPENSIONEN AUS ISOLIERTEN ALLANTOIDES. ....	65
ABBILDUNG 12: KONFOKALE AUFNAHMEN EINES WHOLE MOUNT GEFÄRBTEN AP-2 $\gamma$ -WILDTYP EMBRYOS MIT MIGRIERENDEN PGCS. ....	66
ABBILDUNG 13: TUNEL-FÄRBUNG VON GANZEN EMBRYONEN. ....	67
ABBILDUNG 14: APOTOM-BILDER DER LYSOTRACKER FÄRBUNG VON AP-2 $\gamma$ WILDTYP UND NULLMUTANTEN EMBRYONEN. ....	68
ABBILDUNG 16: PHASENKONTRASTAUFNAHMEN DER EMBRYONIC BODIES (EBS) ZU ANGEGEBENEN ZEITPUNKTEN. ....	70
ABBILDUNG 17: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER ANTEILE AN KONTRAKTILEN EBS IN PROZENT ZU DEN ANGEGEBENEN ZEITPUNKTEN DER DIFFERENZIERUNG. ....	71
ABBILDUNG 18: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG DER AGGREGATE. ....	71
ABBILDUNG 19: FACS-ANALYSE DER MENGE DER C-KIT POSITIVEN ZELLEN AUS EBS ZUM ZEITPUNKT D9. ....	72
ABBILDUNG 20: IMMUNFLUORESCENZANALYSE VON SSEA-1 IN DEN ES-ZELLINIEN L25 UND L20. ....	73
ABBILDUNG 21: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER ANTEILE SSEA-1-POSITIVER ZELLEN. ...	74

ABBILDUNG 22: REPRÄSENTATIVE SEMIQUANTITATIVE RT-PCR ANALYSE DER AUFGEREINIGTEN SSEA-1-POSITIVEN ZELLFRAKTIONEN WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG EMBRYONALER STAMMZELLEN IN PRIMORDIALE KEIMZELLEN. ....	75
ABBILDUNG 23: IMMUNFLUORESCENZ-ANALYSE VON EBS I. ....	77
ABBILDUNG 24: IMMUNFLUORESCENZ-ANALYSE VON EBS II. ....	78
ABBILDUNG 25: MORPHOLOGIE DER KEIMZELLTUMORLINIEN TCAM-2 UND JKT-1.....	79
ABBILDUNG 26: VERGLEICHENDE ANALYSEN DER TRANSKRIPTOME VON TCAM-2 UND JKT-1. .....	80
ABBILDUNG 27: BLIMP1 IN TCAM-2 .....	82
ABBILDUNG 28: TRANSIENTE TRANSFEKTION VON AP-2 $\gamma$ SIRNS IN TCAM-2 .....	83
ABBILDUNG 29: EXPRESSIONSANALYSEN NACH KNOCK DOWN VON AP-2 $\gamma$ IN TCAM-2 .....	85
ABBILDUNG 30: MICRORNS ANALYSEN .....	87
ABBILDUNG 31: ANALYSE DER BINDUNG VON AP-2 $\gamma$ AM MYOD1-PROMOTOR .....	88
ABBILDUNG 32: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ERARBEITETEN MODELLS DER ROLLE VON AP-2 $\gamma$ IN DER KEIMZELLBIOLOGIE.. .....	100

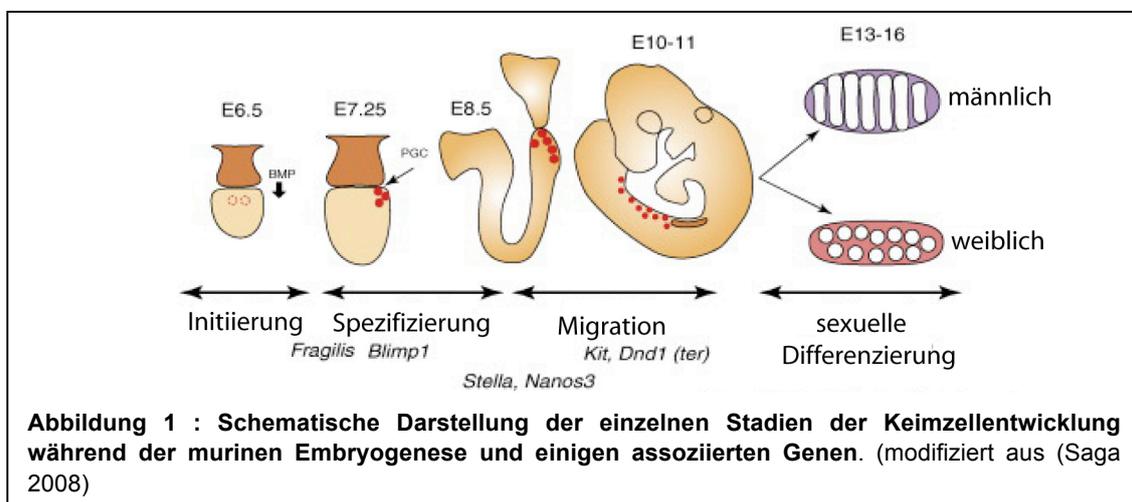
# 1 Einleitung

## 1.1 Keimzellentwicklung

Die Abspaltung der Keimzellen von den somatischen Zellen ist einer der frühesten Prozesse in der embryonalen Entwicklung vieler Organismen. Dabei spielen die somatischen Zelltypen generell eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der physiologischen Integrität, während die Keimzellen dafür verantwortlich sind genetische Informationen an die Tochtergenerationen eines Organismus weiterzugeben. Die Vorläufer der Gameten (Spermatozyten und Oozyten) werden dabei als primordiale Keimzellen (primordial germ cells, PGCs) bezeichnet.

### 1.1.1 Entwicklung muriner Keimzellen

Im Postimplantations-Embryo der Säugetiere sind die PGCs die ersten embryonalen Zellen, die eine Restriktion in ihrem Zellschicksal erfahren, d.h. ihr Schicksal wird sehr früh in der Embryogenese festgelegt. Die Entwicklung der Keimzellen verläuft in Säugetieren in 4 Schritten. Der erste Schritt ist dabei die **Initiierung** der Keimzell-Kompetenz, dabei erhalten Zellen des proximalen Teiles des Epiblasten extrazelluläre Signale, die die **Spezifizierung** der PGCs aus deren Vorläufern ermöglichen. Während der Spezifizierung werden die PGCs auf transkriptioneller Ebene von den umgebenden Zellen abgegrenzt und starten ein PGC-spezifisches genetisches Programm, das sowohl die Aktivierung von keimzellspezifischen Genen als auch eine Repression von somatischen Genen beinhaltet. Durch diese komplexe genetische Regulation werden die Zellen in ihrem pluripotenten Status gehalten. Der Spezifizierung folgt die **Migration** (und die einhergehende Proliferation) der PGCs in die Genitalanlagen. Mit Erreichen der Genitalanlagen werden die Keimzellen als Gonozyten bezeichnet, diese unterlaufen in der weiteren

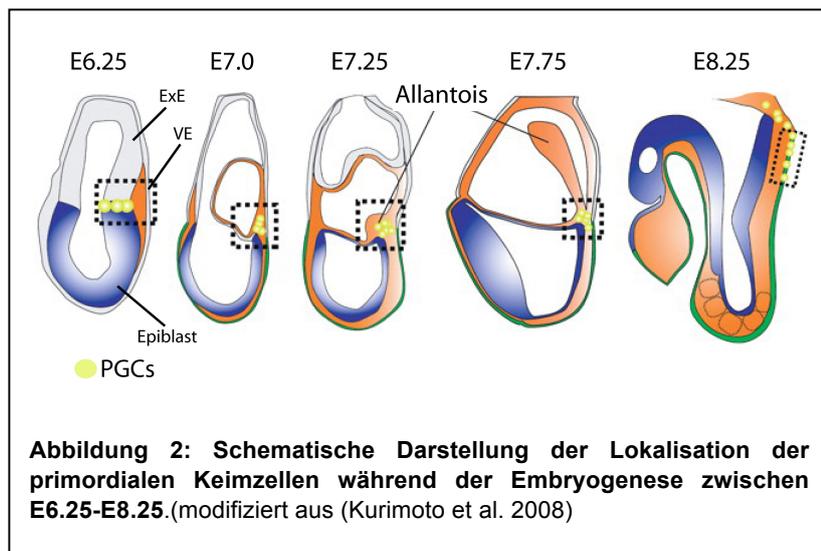


Embryonalentwicklung die **sexuelle Differenzierung** in Oogonien und Spermatogonien (siehe Abb. 1).

### 1.1.2 Initiierung der Keimzellkompetenz

An Tag E5.0 bis E6.0 der murinen Embryogenese erlangen einige Zellen des proximal-posterioren Epiblasten durch extrazelluläre Signale des visceralen Endoderms (VE) und des extraembryonalen Ectoderms (ExE) die Kompetenz PGC-Vorläufer zu werden

(siehe Abb. 2). Es hat sich herausgestellt, dass die Signalmoleküle BMP-4 und BMP-8b für das Erlangen der Keimzell-Kompetenz und die PGC-Spezifizierung essentiell sind (de Sousa Lopes et al. 2007). Durch murine Nullmutanten konnte gezeigt werden, dass

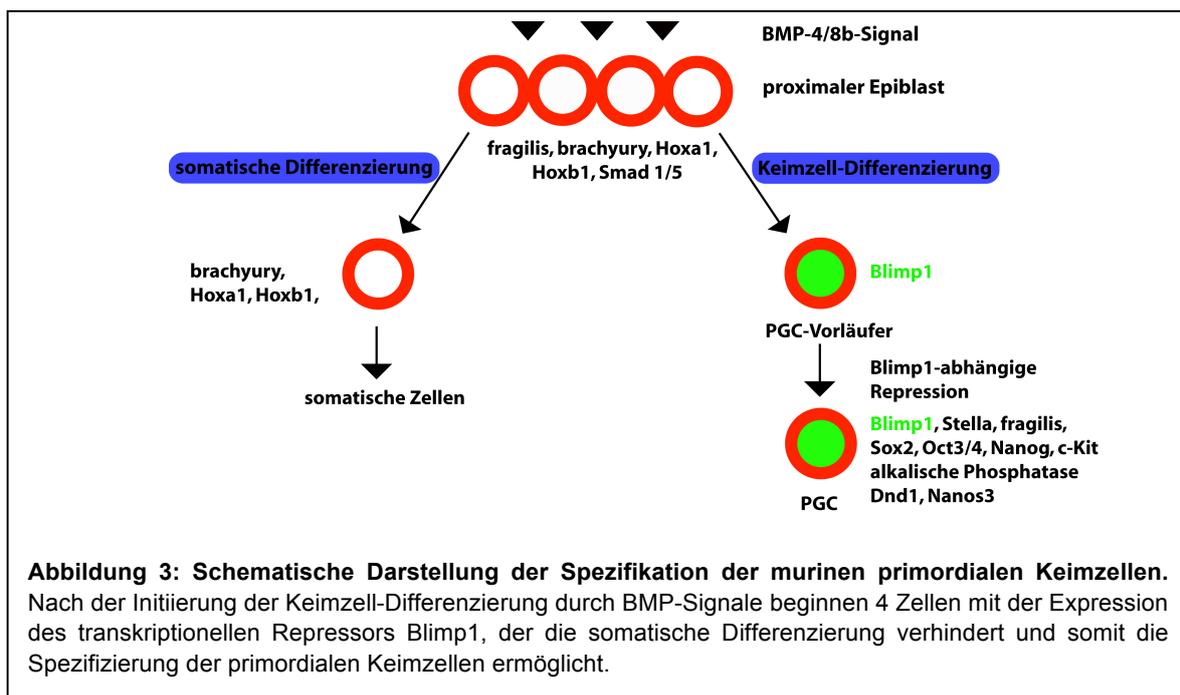


sowohl der Verlust von BMP-4 als auch der Verlust von BMP-8b zum vollständigen oder partiellen Verlust von PGCs führt (Lawson et al. 1999; Ying et al. 2000). Dies konnte zudem durch die genetische Ablation von Smad1/4/5, der Mediator-Moleküle des BMP-Signalweges, bestätigt werden (Chang and Matzuk 2001; Tremblay et al. 2001). Als Folge der BMP-Signale beginnen die Zellen im proximalen Teil des Epiblasten an Tag E6.25 mit der Expression von *fragilis* (interferon-induced transmembrane protein (Ifitm) (Saitou et al. 2002).

### 1.1.3 Spezifizierung der primordialen Keimzellen

Nicht alle *fragilis*-exprimierenden Zellen werden PGCs (Yoshimizu et al. 2001; Saitou et al. 2002). Mittels eines tetrachimären Mausmodells konnte gezeigt werden, dass letztendlich nur 4 Zellen die Keimzellpopulation gründen, diese stellen die Vorläufer der primordialen Keimzellen dar (Ueno et al. 2009). Diese 4 Zellen beginnen an Tag E6.25-6.5 mit der Expression von *Blimp1* (B-lymphocyte-induced maturation protein 1) die in primordialen Keimzellen bis zur Einwanderung in die Genitalanlagen andauert (Ohinata et al. 2005).

Blimp1 hat neben 5 Zink-Finger-Motiven, die für die DNS-Bindung verantwortlich sind auch eine PR-Domäne, die für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich ist und zudem eine Methyl-Transferase-Aktivität aufweist, die Lysin-Reste an den Histonen H3 und H4 methylieren kann (Fumasoni et al. 2007). Das Blimp1-Protein ist als transkriptioneller Repressor bekannt und ist für die Spezifizierung der primordialen Keimzellen ein essentieller Faktor und steuert den Großteil des genetischen Programms für die Spezifizierung und Aufrechterhaltung des PGC-spezifischen genetischen Programms (Kurimoto et al. 2008). Blimp1 kann einerseits selbst direkt Histon-Modifikationen mittels seiner PR-Domäne vornehmen, im Kontext der Keimzellentwicklung ist jedoch gezeigt worden, dass Blimp1 mit der Methyl-Arginin-Transferase Prmt5 interagieren kann und es somit in Keimzellen zu einer Dimethylierung der Histone H2A und H4 an Arginin 3 (H2A/H4R3me2) kommt. Diese Histon-Methylierung dient als Erkennungssignal für eine DNS-Methyltransferase (DNMT3A) und resultiert in der Methylierung von DNS und letztendlich zu einer Repression von genetischen Loci (Zhao et al. 2009). Vor allem die Repression der *Homeobox (Hox)* Gene *Hoxa1* und *Hoxb1*, die mit der mesodermalen Differenzierung assoziiert sind (Ancelin et al. 2006), ist hier von großer Bedeutung.



Zusätzlich zur aktiven Repression des somatischen Gen-Programms kommt es während der Spezifikation primordialer Keimzellen zur Expression PGC-spezifischer Gene. Diese beinhaltet die Expression des DNS bindenden Proteins Stella (Saitou et al. 2002), der RNS bindenden Proteine Dnd1 (Noguchi and Noguchi 1985; Youngren et al. 2005) und Nanos3 (Tsuda et al. 2003; Suzuki et al. 2008), der Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-Kit (Besmer et al. 1993; Yoshimizu et al. 2001; De Miguel et al. 2002), dem Blimp1-verwandten Proteins Prdm14 (Yamaji et al. 2008), des Lipopolysaccharids *Stage specific antigen 1* (SSEA-1)

(Yoshinaga et al. 1991), sowie der pluripotenzassoziierten Proteine Oct3/4 (Tomilin et al. 1996; Okamura et al. 2008), Nanog (Yamaguchi et al. 2005) und Sox2 (Botquin et al. 1998) (siehe Abb.3).

Diese essentielle Rolle von Blimp1 in Keimzellen wurde in der Maus anhand von *Blimp1*-Nullmutanten gezeigt. Dabei zeigen Individuen, deren *Blimp1*-Allele deletiert sind, eine starke Beeinträchtigung des genetischen Programms der PGC-Vorläufer. Die PGC-Vorläufer werden nicht richtig spezifiziert und beginnen nicht mit der keimzelltypischen Migration. Dabei weisen entsprechende Zellen eine aberrante Genexpression auf, bei der somatische Gene exprimiert und PGC-spezifische Gene nicht oder nur in geringen Levels exprimiert werden und zeigen damit eher das Expressionsprofil von somatischen Zellen, als von spezifizierten Keimzellen (Ohinata et al. 2005; Saitou et al. 2005; Kurimoto et al. 2008).

Jedoch scheint Blimp1 nicht nur eine rein repressive Rolle in der Spezifizierung der Keimzellen zu besitzen. Auch einige der Gene, die in den frühen Stadien der Keimzellspezifizierung hochreguliert werden, scheinen durch Blimp1 positiv beeinflusst zu werden. Dabei zeigen Gene wie Stella, Prdm14 und c-Kit eine Korrelation zwischen ihren Transkriptmengen und dem Proteinlevel von Blimp1 (Kurimoto et al. 2008).

Generell ist anzumerken, dass die transkriptionelle Repression für die Spezifizierung der Keimzellen von großer Bedeutung ist und auch bei den Modellorganismen *Caenorhabditis elegans* und auch bei *Drosophila melanogaster* vorkommt. Jedoch benutzen diese Spezies andere Mechanismen zur transkriptionellen Repression (Nakamura and Seydoux 2008).

Neben der Blimp1-abhängigen transkriptionellen Repression scheinen die exprimierten RNA-bindenden Proteine ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der primordialen Keimzellen zu spielen. Sowohl die genetische Ablation von Dnd1 als auch die von Nanos3 hat drastische Folgen für primordiale Keimzellen.

Die heterozygote *Ter*-Mutation (Teratom) des *Dnd1*-Gens geht mit einem frühen Verlust der meisten Keimzellen durch Apoptose einher, während homozygote *ter*-Männchen mit 94%iger Wahrscheinlichkeit Teratome ausbilden (Noguchi and Noguchi 1985). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Dnd1 eine antagonistische Rolle gegenüber einiger microRNS-Moleküle (im Besonderen miR-430) hat und deren Bindung an Ziel-mRNS verhindert, indem es mRNS bindet und so die Bindestellen der microRNS an der Ziel-mRNS blockiert (Kedde et al. 2007).

Auch die genetische Disruption der *Nanos3*-Allele resultiert in einem frühen Keimzellverlust durch Apoptose durch Bax-abhängige und Bax-unabhängige Mechanismen (Suzuki et al. 2008). Als weiteres Modell für die Apoptose von primordialen Keimzellen nach Ablation genetischer Loci können auch die Oct3/4-Nullmutanten herangezogen werden (Kehler et al.

2004)

Die Spezifizierung der primordialen Keimzellen ist in der Maus am Tag 7.25 der Embryonalentwicklung abgeschlossen. Zu diesem Zeitpunkt besteht die PGC-Population aus ca. 40 Zellen, die eine hohe Aktivität an alkalischer Phosphatase aufweisen und aufgrund dieser leicht visualisiert werden können (Chiquoine and Rothenberg 1957; Ozdzanski 1969).

Kurz nach der Spezifizierung und mit dem Beginn der Migration (E7.75) unterziehen sich die PGCs zudem einer Reprogrammierung des Genoms. Dabei werden Histonmodifikationen, wie die repressive Dimethylierung von Histon H3 an Lysin 9 (H3K9me<sub>2</sub>), als auch die DNS-Methylierung stark verringert (Seki et al. 2007). Dieser epigenetische Zustand hat Ähnlichkeiten mit dem der murinen Embryonalen Stammzellen und es wird vermutet, dass dieser Zustand es der Zelle ermöglicht schnell auf Differenzierungssignale zu reagieren.

#### **1.1.4 Migration primordialer Keimzellen**

Nach der Spezifizierung beginnen die primordialen Keimzellen mit der Migration durch den Embryo in Richtung der Genitalanlagen, die sie am Tag 10.5-11.0 der murinen Embryonalentwicklung erreichen (siehe Abb.1). Während der Migrationsphase proliferieren die Zellen und stellen bei Ankunft in den Genitalanlagen eine Population von ca. 1000 Zellen dar. Dabei wandern die PGCs von der Allantois aus entlang des Enddarms in die Genitalanlagen und folgen dabei einem chemokinen Signal. Als mögliches chemokines Signal könnte hier die Interaktion der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit und deren Liganden *Stemcell factor/Steel* in Frage kommen (Godin et al. 1991; Matsui et al. 1991; Besmer et al. 1993; Bernex et al. 1996; De Miguel et al. 2002; Runyan et al. 2006). Dabei erfolgt durch die Bindung von *Steel* die Dimerisierung und Autophosphorylierung von c-Kit. Die Autophosphorylierung setzt wiederum eine Signalkaskade über G-Proteine, PI3K, und AKT in Gang und führt zu einem Rearrangement von Filament-Aktin (F-Aktin) (Farini et al. 2007). Weitere *in vitro* Experimente zeigten, dass die c-Kit/*Steel* Interaktion zudem für die Proliferation der Keimzellen verantwortlich ist und die PGCs zudem vor Apoptose schützt (Godin et al. 1991).

Als weiterer Kandidat für die Chemokin-abhängige Migration der primordialen Keimzellen kommt der C-X-C-Rezeptor 4 (CXCR4) und dessen Ligand *stromal-derived factor 1* (SDF1) (Ara et al. 2003; Molyneaux et al. 2003) in Frage. Jedoch scheint diese Rezeptor/Ligand-Kombination nur eine untergeordnete Rolle bei der Migration von murinen primordialen Keimzellen zu spielen (Farini et al. 2007).

Eine experimentelle Studie zur Migration der Keimzellen hat zudem gezeigt, dass aberrant migrierende/ektopische Keimzellen über einen Bax-abhängigen Mechanismus zur Apoptose gebracht werden. Diese Vermutung beruht auf der Beobachtung, dass bei Bax-defizienten Tieren ektopische Keimzellen im Darmmesenterium oder dem Rückenmark verbleiben (Stallock et al. 2003). Diese Zellen stellen jedoch ein Risiko da und können extragonadale Keimzelltumore ausbilden, die 18% der Keimzelltumore stellen und oft entlang der Körpermittellinie zu finden sind (Gobel et al. 2000; Schneider et al. 2001).

Mit Beenden der Migration beginnen die Keimzellen mit der Expression der Gene *Mvh* (murines *Vasa*-Homolog, ab E10.5) (Toyooka et al. 2000), das für eine RNS-Helikase codiert, und *DAZL* (*deleted in azospermia-like*, ab E11.5) (Seligman and Page 1998), das für ein RNS-bindendes Protein codiert. Beide Genprodukte gelten als Marker für post-migratorische Keimzellen. Nach Ankunft in den Genitalanlagen proliferieren die primordialen Keimzellen, bis sie an ca. E12.5-13.0 eine Population von ca. 25000 Zellen stellen (Tam and Snow 1981; Godin et al. 1990). Anschließend gehen an E13.5 in den mitotischen Arrest über (McLaren 1984) und werden als Gonozyt bezeichnet.

Zudem durchlaufen die PGCs nach der Ankunft in den Genitalanlagen ein weiteres Reprogrammierungsereignis in dem alle parentalen Methylierungsmuster aufgehoben werden.

### 1.1.5 Sexuelle Differenzierung der Keimzellen

Primordiale Keimzellen sind während der Migration und bei Erreichen der Genitalanlagen in Bezug auf ihr Geschlecht bipotent und die sexuelle Differenzierung beginnt erst nach der Kolonisierung der Gonaden/Genitalanlagen. Dabei beginnen weibliche Keimzellen ab E13.5 mit der Meiose, wogegen männliche Keimzellen in einen Zellzyklus-Arrest in der G0/G1-Phase eintreten und erst nach der Geburt mit der meiotischen Teilung beginnen (McLaren 1984). Verantwortlich für den Eintritt in die Meiose der Keimzellen ist die Retinsäure und *Stra8* (*stimulated by retinoic acid gene 8*) als eines der Zielgene der Retinsäurerezeptoren.

In den somatischen Zellen männlicher Gonaden wird der Retinsäure-Antagonist Cytochrom p450/Cyp26b1 (codiert durch das Gen *CYP26*) produziert, der der promeiotischen Funktion der Retinsäure durch ihren Abbau entgegenwirkt (Baltus et al. 2006; Koubova et al. 2006; Anderson et al. 2008). Weitere experimentelle Beweise für diese Art der Regulation haben Studien an Keimzellen weiblicher *Stra8*-Nullmutanten gezeigt, bei denen kein Eintritt in die Meiose beobachtet werden konnte (Baltus et al. 2006). Zudem weisen männliche

Nullmutanten von *Cyp26b1* eine Hochregulation von *Stra8* auf und die Keimzellen dieser Tiere treten verfrüht in die Meiose ein (MacLean et al. 2007).

Nach der sexuellen Differenzierung werden zudem die parentalen Methylierungsmuster wieder etabliert.

## 1.2 Keimzelltumore

Keimzelltumore sind eine heterogene Gruppe von Neoplasien, die sowohl in den Gonaden, als auch extragonadal entlang der Körpermittelachse in Hirnregionen beider Geschlechter vorkommen können, wobei testikuläre Keimzelltumore die häufigsten Tumore bei Männern im Alter von 17-45 Jahren sind (Ulbright 1993). Die Lage dieser Neoplasien entspricht oft dem Migrationspfad der primordialen Keimzellen. Die Herkunft dieser Tumore konnte entweder durch die Expression von Keimzell-spezifischen Markern, wie *Vasa* (Zeeman et al. 2002), *Oct 3/4* (Looijenga et al. 2003) oder anhand des genetischen Imprinting (Methylierungsmuster der DNS (Schneider et al. 2001; Sievers et al. 2005)) festgestellt werden. Nach der WHO (World Health Organisation) besteht die Gruppe der Keimzelltumore aus den Teratomen und Dottersacktumoren (Typ I), den Seminomen und Nicht-Seminomen (Typ II) und den spermatozytären Seminomen (Typ III) (zusammengefasst in (Oosterhuis and Looijenga 2005)).

### 1.2.1 Typ I Keimzelltumore

Keimzelltumore des Typs I sind sowohl gonadal als auch extragonadal zu finden und kommen mit einer Inzidenz von 0.12 auf 100000 vor (Rescorla 1999). Dabei bestehen Dottersacktumore aus frühen embryonalen und extraembryonalen Geweben und zählen zu den häufigsten Hodentumoren bei Kindern unter 3 Jahren. Teratome sind Mischtumore und können aus Zellen aller drei Keimblätter bestehen (Mesoderm, Entoderm und Ectoderm) und werden in reife (stark differenzierte Zellen) und unreife Teratome (nicht vollständig ausdifferenzierte Zellen) unterschieden.

Aufgrund des biparentalen und nur teilweise aufgehobenen Methylierungsmusters der DNS werden frühe migratorische primordiale Keimzellen als Ursprungszellen für Keimzelltumore des Typ I angesehen (Bussey et al. 2001; Schneider et al. 2001; Sievers et al. 2005).

Es gibt nur wenige Mausmodelle für die Entstehung von Teratomen. In dem Inzuchtstamm 129/SV entwickeln sich Teratome mit einer Wahrscheinlichkeit von 1-10% im Alter von 3

Wochen (Stevens and Hummel 1957). Als weiteres Mausmodell für die Entstehung von Teratomen ist die *Ter*-Mutation zu nennen, die im dem Mausstamm 129/SV zur Teratombildung führt, in anderen Mauslinien jedoch zum Verlust der Keimzellen während der Migrationsphase führt (Noguchi and Noguchi 1985; Asada et al. 1994; Sakurai et al. 1994). Diese Mutation betrifft das *Dnd1*-Gen (siehe auch Kapitel 1.1.1.2). Auch die genetische Ablation des Tumorsuppressors PTEN führt zur Bildung von Teratomen (bilaterale Teratome) (Kimura et al. 2003), da durch diese Mutation den Zellen sowohl anti-apoptotische Mechanismen als auch Mechanismen zur Zellzykluskontrolle (Zellzyklusarrest) gestört sind (Kimura et al. 2008).

### 1.2.2 Typ II Keimzelltumore

Zu den Keimzelltumoren des Typ II gehören sowohl die Nicht-Seminome (Embryonale Karzinome) als auch die Seminome (Seminome im Hoden, Dysgerminome im Ovar und Germinome im Gehirn). Dabei stellen die Seminome mit 50% aller Keimzelltumore die größte Entität dar. Als Vorläuferläsion der testikuläre Keimzelltumoren des Typ II wird die intratubuläre unklassifizierte Keimzelle Neoplasie (IGCNU, intratubular germ cell neoplasia unclassified) angesehen (Mostofi et al. 1987). Der IGCNU liegt wiederum eine, in ihrem genetischen Programm aberrante, primordiale Keimzelle zugrunde, die nicht weiter differenziert ist, persistiert und damit eine embryonale Zelle in einer adulten Nische darstellt. Diese These wird unterstützt durch das genetische Expressionsmuster das IGCNUs und Seminome aufweisen. Dabei zeigen die IGCNUs und Seminome, wie primordiale Keimzellen, die Expression der pluripotenzassoziierten Gene wie *OCT3/4* und *NANOG* (Almstrup et al. 2004), die Expression der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit (Rajpert-De Meyts and Skakkebaek 1994) und des Transkriptionsfaktors AP-2 $\gamma$  (Hoei-Hansen et al. 2004; Hong et al. 2005; Pauls et al. 2005). Zudem entspricht das DNS-Methylierungsmuster dem von postmigratorischen primordialen Keimzellen vor der sexuellen Differenzierung (Bussey et al. 2001; Schneider et al. 2001; Sievers et al. 2005).

Die intratubulären Keimzelle Neoplasien können zu seminomatösen und nicht-seminomatösen Keimzelltumoren differenzieren, jedoch sind die molekularen Grundlagen für diese Differenzierung noch unbekannt. Hier scheint das Gen *SOX2*, ein weiteres pluripotenzassoziiertes Gen, den Unterschied auszumachen. Seminome, bei denen die Expression von *SOX2* nicht vorhanden ist, stellen eine Art Endpunkt der malignen Entwicklung dar und differenzieren in der Regel nicht zu weiteren Tumorzelltypen. Embryonale Karzinome, die im Gegensatz zu Seminomen *SOX2* exprimieren, zeigen eine

Pluripotenz, die der embryonalen Stammzellen ähnlich ist, und stellen somit das maligne Pendant zu embryonalen Stammzellen dar (Looijenga et al. 2007; de Jong et al. 2008). Embryonale Karzinome sind, genauso wie embryonale Stammzellen, in der Lage in alle drei Keimblätter zu differenzieren und somit Teratome auszubilden.

Bis zum heutigen Tage fehlt ein Tiermodell zur Erforschung der Entstehung von Keimzelltumoren Typs II. Allerdings gibt es einige Zelllinien aus Typ II Keimzelltumoren auf die später eingegangen werden soll (siehe Kapitel 1.4.2)

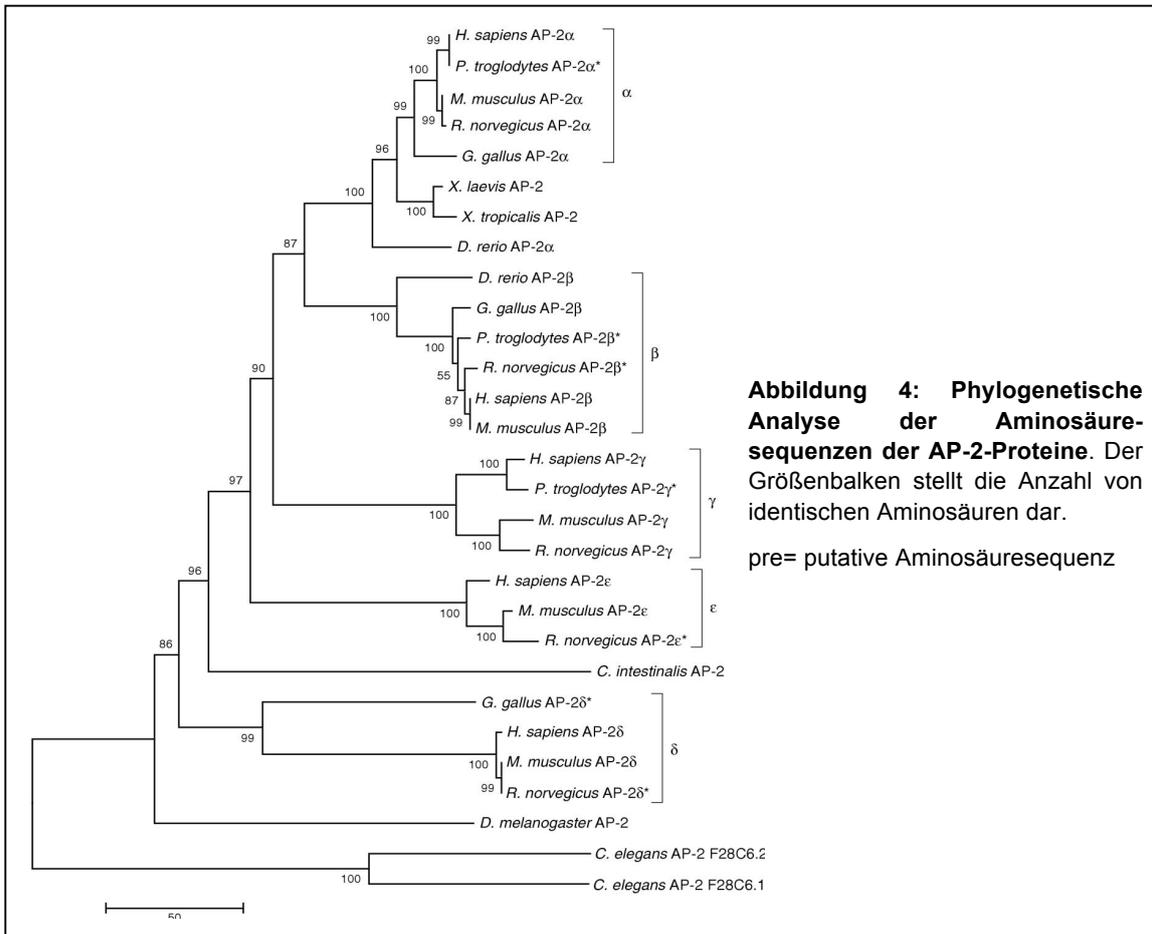
### 1.2.3 Typ III Keimzelltumore

Zu den Typ III Keimzelltumoren gehören die spermatozytären Seminome, die bei Männern im Alter ab 50 Jahren mit einer Inzidenz von 0.2 auf 100000 auftreten können und immer benigne Tumore sind. Wie der Name bereits andeutet, haben diese Tumore ihren Ursprung in einer haploiden Spermatozyte. Spermatozytäre Seminome bestehen aus drei Zelltypen: kleine, lymphozytenartige Zellen, die morphologische Ähnlichkeiten mit Spermatozyten aufweisen, mittelgroße Zellen mit runden Zellkern und eosinophilen Zytoplasma und große mehrkernige Riesenzellen. Als Tiermodell für spermatozytäre Seminome können hier die spontanen Keimzelltumore von Hunden herangezogen werden (Looijenga et al. 1994).

## 1.3 Die Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren

Die Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren (Ensembl Family ENSF00000001105) beinhaltet bei Mensch und Maus fünf Familienmitglieder, nämlich AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$ , AP-2 $\gamma$ , AP-2 $\delta$  und AP-2 $\epsilon$  (alternative Bezeichnungen für die humanen Homologe: TFAP-2a bis TFAP-2e und bei der Maus Tcfap2a-Tcfap2e). Aber auch in anderen Spezies finden sich Paraloge und Orthologe. Bezogen auf die Aminosäuresequenz weisen Orthologe eine Homologie von 60-99%, Paraloge hingegen eine Homologie zwischen 56 und 78% auf. Dabei zeigen die AP-2 Proteine der Modelorganismen *Drosophila melanogaster* und *Ceanorhabditis elegans* den geringsten Verwandtschaftsgrad zu denen der Wirbeltiere (siehe Abb. 4)

Die AP-2 Proteine haben ein Molekulargewicht von 46-52kDa und weisen eine charakteristische Proteinstruktur mit 3 Domänen auf. N-terminal befindet sich die unter den

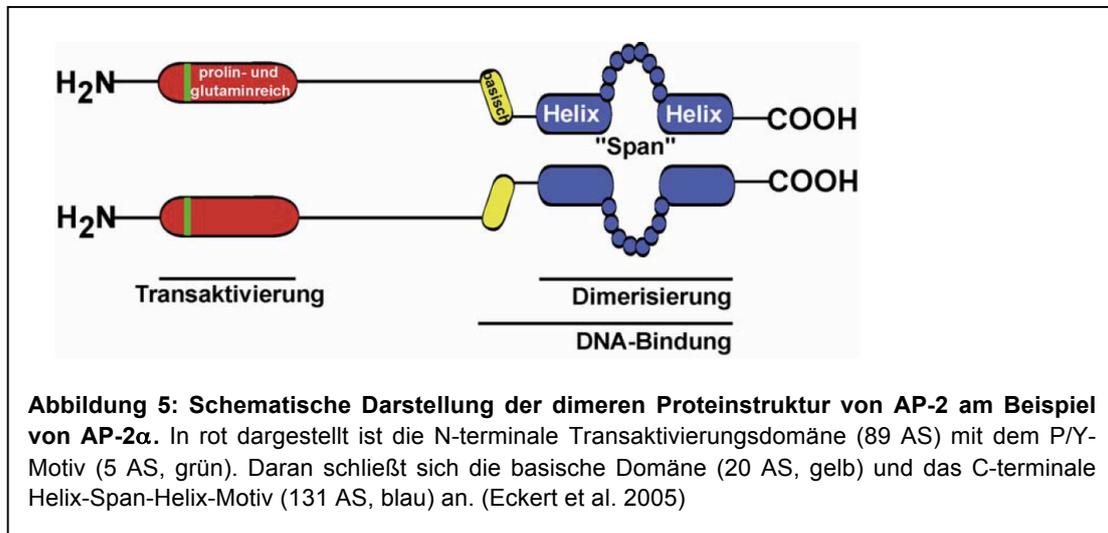


**Abbildung 4: Phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenzen der AP-2-Proteine.** Der Größenbalken stellt die Anzahl von identischen Aminosäuren dar.  
pre= putative Aminosäuresequenz

Familienmitgliedern am wenigsten konservierte Transaktivierungsdomäne, die ein PY-Motiv besitzt und zudem einen hohen Anteil an den Aminosäuren Prolin und Glutamin hat. An die Transaktivierungsdomäne schließt sich eine basische Region und die C-terminale - und zudem hoch konservierte – Dimerisierungsdomäne und DNS-Bindedomäne mit einem Helix-Span-Helix-Motiv an (Williams and Tjian 1991b; Williams and Tjian 1991a) (Abb. 5).

Die AP-2 Proteine binden in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren als Dimere an DNS-Stränge (Williams and Tjian 1991a), dabei kann es sowohl zur Bildung eines Homodimers (z.B. AP-2α + AP-2α) als auch zur Bildung eines Heterodimers (z.B. AP-2α + AP-2β) kommen (Feng and Williams 2003). Die palindromische Konsensussequenz 5'-GCCN<sub>3</sub>GGC-3' der AP-2-Proteine zur Bindung an DNS kann dabei in vielen zellulären und viralen Promotoren gefunden werden (Hilger-Eversheim et al. 2000).

Als weitere Bindemotive für AP-2 Familienmitglieder konnten mittels *in vitro* Experimenten die Sequenzen 5`-GCCN<sub>4</sub>GGC-3 und 5`-GCCN<sub>3/4</sub>GGG-3` identifiziert werden (Mohibullah et al. 1999). Auch die Bindung durch AP-2 Proteine im SV40 Enhancer-Element an der



Sequenz 5`-CCCCAGGGC-3` lässt vermuten, dass AP-2 Proteine generell an G/C-reichen Sequenzen in Promotoren binden und die einzelnen Dimere dabei verschiedene Affinitäten zur Zielsequenz aufweisen (Mitchell et al. 1987).

### 1.3.1 AP-2 $\alpha$

Als erstes Mitglied der Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren wurde AP-2 $\alpha$  beschrieben. Dabei wurde AP-2 $\alpha$  mittels Affinitätschromatographie und spezifischen Bindestellen am SV40 Promotor und dem humanen Metallothionin IIa Promotor aus HeLa Zellen isoliert (Mitchell et al. 1987).

AP-2 $\alpha$  wird während der murinen Embryonalentwicklung ab Tag 8.5 in den Zellen der Neuralleiste und deren Derivaten exprimiert. Dabei erfolgt die Expression in den kranialen und spinalen sensorischen Ganglien und dem Kopfmesenchym. Zudem ist im weiteren Verlauf der Embryogenese eine Expression im Oberflächenektoderm, dem Rückenmark und dem Cerebellum detektierbar. Im adulten Tier kann eine starke Expression im Auge und der Haut, hingegen eine schwache Expression in der Niere, dem Thymus und der Prostata beobachtet werden (Mitchell et al. 1991).

Die Arbeiten an AP-2 $\alpha$ -Nullmutanten haben eine essentielle Rolle beim Schluss des Neuralrohrs im kraniofacialen Bereich aufgezeigt. Diese Tiere weisen nämlich ab E8.5 der Embryonalentwicklung einen Defekt bei der Einfaltung des Neuralrohrs auf. Die AP-2 $\alpha$ -defizienten Tieren zeigen eine schwere Cranioabdominoschisis auf und sterben perinatal (Schorle et al. 1996; Zhang et al. 1996).

### 1.3.2 AP-2 $\beta$

Als zweites Mitglied der Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren ist AP-2 $\beta$  beschrieben worden (Moser et al. 1995). Die Expression von AP-2 $\beta$  beginnt ebenfalls mit dem Tag 8.5 der murinen Embryonalentwicklung. Im Zeitraum E8.5-11.0 der Embryogenese überlappen die Expressionsmuster von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$ . Erst ab E11.0 zeigen sich Unterschiede im Mengenverhältnis der Transkripte. AP-2 $\beta$  wird vor allem in der Haut, der Niere und im ersten Kiemenbogen während der Embryogenese exprimiert. Im adulten Tier zeigt sich eine starke Expression in der Niere hingegen eine schwache in der Haut und im Auge (Moser et al. 1997b).

Obwohl die Expressionsmuster von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  sich in der frühen Embryogenese stark überlappen, zeigen die Nullmutanten von AP-2 $\beta$  keine Überschneidung in ihren Phänotypen. AP-2 $\beta$ -defiziente Tiere zeigen ab E16.5 Zysten in den Tubuli und den Sammelrohren der normal entwickelten Nieren. Die Zystenbildung geht in diesen Tieren mit einer stark erhöhten Apoptose-Rate im Nierenepithel einher, so dass die AP-2 $\beta$ -Nullmutanten kurz nach der Geburt sterben, da sie nicht in der Lage sind ihren Elektrolythaushalt aufrecht erhalten zu können (Moser et al. 1997a).

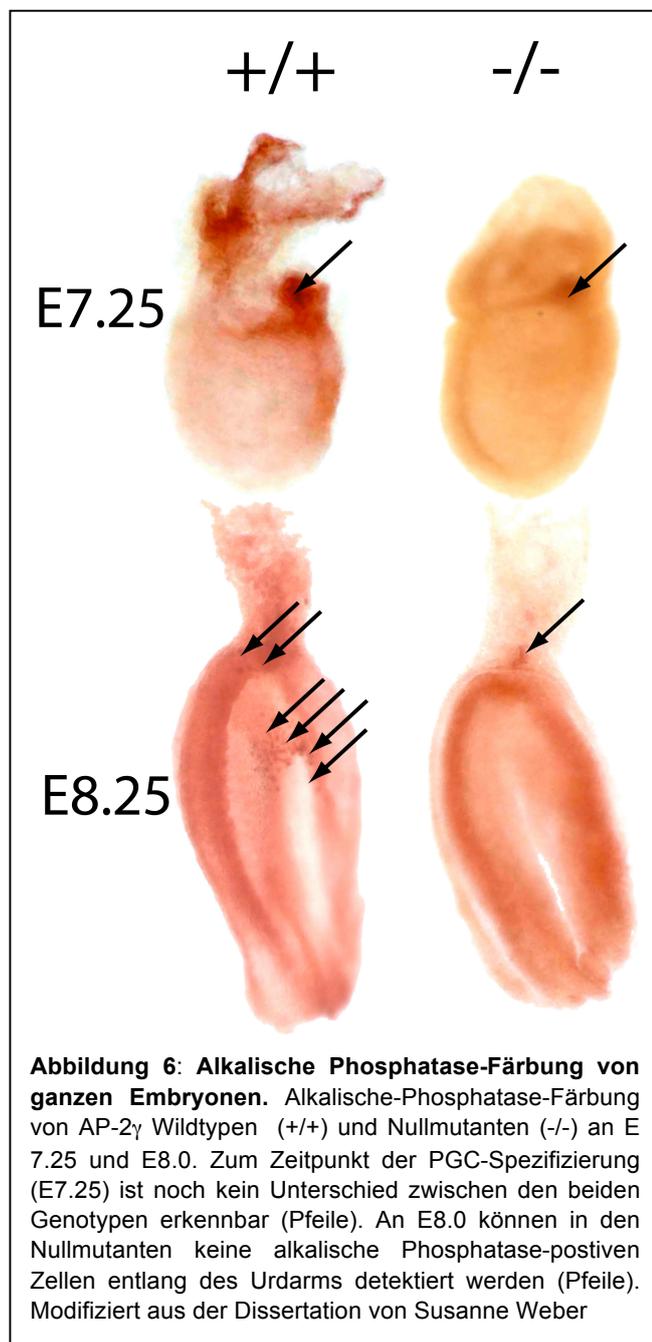
### 1.3.3 AP-2 $\gamma$

Das Familienmitglied AP-2 $\gamma$  wurde bei Retinsäure-induzierter Differenzierung der embryonalen Karzinomzelllinie P19 hochreguliert gefunden und zuerst als AP-2.2 bezeichnet (Oulad-Abdelghani et al. 1996). Die Expression von AP-2 $\gamma$  beginnt in der Blastozyste (E3.5) der murinen Embryonalentwicklung. In diesem Stadium findet man die Expression im Trophoblasten, der äußeren Zellmasse der Blastozyste. Der Trophoblast bildet während der Embryogenese den embryonalen Teil der Plazenta, dabei ist AP-2 $\gamma$  in allen Derivaten der Trophoblasten (Trophoblaststammzellen der Labyrinthschicht, Spongiotrophoblast und den sekundären Riesenzellen) exprimiert. Mittels *in situ* Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass das Transkript am Tag E7.5 in der Grenzregion zwischen Ektoderm um der Neuralplatte detektierbar ist und im weiteren Verlauf der Embryogenese die Expression in der dorsalen Neuralfurche und dem angrenzenden Mesenchym zu finden ist (E8.0). Ab E8.5 der murinen Embryogenese konnte eine Expression von AP-2 $\gamma$  im Neuralrohr und dem frontonasalen Mesenchym detektiert werden. Zudem konnte in den späteren Stadien der embryonalen Entwicklung das Transkript im sich entwickelnden Gesicht, den Gliedmaßenknospen (E9.5 bis E11.5) und im Gehirn (E9.5 bis E11.5) nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde in dieser Studie die AP-2 $\gamma$  mRNS in postmigratorischen Keimzellen (E11.5) detektiert

(Chazaud et al. 1996), die jedoch bereits im embryonalen Ovar an E14.5 nicht mehr visualisiert werden konnte.

Für die Funktionsanalyse wurden von AP-2 $\gamma$  Nullmutanten generiert, die jedoch embryonal letal sind. Dabei weisen die AP-2 $\gamma$ -defizienten Tiere zum Zeitpunkt E7.5 der murinen Entwicklung bereits retardiertes Größenwachstum auf und werden schließlich E9.5 resorbiert. Dieser Phänotyp beruht auf einer offensichtlich essentiellen Rolle von AP-2 $\gamma$  im Trophektoderm. Der Verlust führt zu einer verminderten Proliferation der Zellen im ekto-plazentalen Konus und im extraembryonalen Ektoderm und endet folglich in einer verminderten Anzahl an Riesenzellen in der Labyrinth-schicht. Infolge der verminderten Zellzahl stirbt der Embryo an einer Unterversorgung mit Nährstoffen (Auman et al. 2002; Werling and Schorle 2002b).

Um den embryonal letalen Phänotyp des AP-2 $\gamma$ -Verlustes zu umgehen, ist in unserem Labor ein konditionales Allel etabliert worden (Werling and Schorle 2002a). Somit ist die Deletion beider AP-2 $\gamma$ -Allele durch die Verpaarung mit einer entsprechenden Cre-Linie (Cre/LoxP-System) sowohl zeitlich als auch räumlich (zelltypspezifisch)



**Abbildung 6: Alkalische Phosphatase-Färbung von ganzen Embryonen.** Alkalische-Phosphatase-Färbung von AP-2 $\gamma$  Wildtypen (+/+) und Nullmutanten (-/-) an E 7.25 und E8.0. Zum Zeitpunkt der PGC-Spezifizierung (E7.25) ist noch kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen erkennbar (Pfeile). An E8.0 können in den Nullmutanten keine alkalische Phosphatase-positiven Zellen entlang des Urdarms detektiert werden (Pfeile). Modifiziert aus der Dissertation von Susanne Weber

möglich, ohne dabei den `Plazenta-Phänotyp` hervorzurufen. Die Analyse der resultierenden Nullmutanten zeigte, dass AP-2 $\gamma$  offenbar eine Rolle in der Keimzellbiologie spielt, denn Nullmutanten sind steril und weisen einen frühen Verlust der Keimzellen auf (siehe Abb. 6, Dissertation Susanne Weber).

Zudem ist in einer Blimp1-Studie, in der auf Einzellebelleben das Transkriptom der PGC analysiert worden ist, ein Zusammenhang zwischen Blimp1 und AP-2 $\gamma$  hergestellt worden, da die Menge des AP-2 $\gamma$ -Transkriptes in Blimp1-positiven Zellen um ein Vielfaches höher ist

als in Blimp1-negativen Zellen (Kurimoto et al. 2008). Dies deutet auf eine frühe Rolle von AP-2 $\gamma$  in der Keimzellbiologie hin.

### **1.3.3.1 AP-2 $\gamma$ in humanen Keimzellen und Keimzelltumoren**

In humanen Keimzellen kann eine Expression von AP-2 $\gamma$  zwischen der 12. und 20. Schwangerschaftswoche (SSW) beobachtet werden. Die Anzahl an AP-2 $\gamma$ -positiven Zellen erreicht dabei ihren Höchstwert in der 19. Schwangerschaftswoche und nimmt anschließend kontinuierlich ab. Dabei kann die Expression von AP-2 $\gamma$  nur in Gonozyten, also frühen Keimzellen beobachtet werden. Sobald der nächste Differenzierungsschritt zur Pro-Spermatogonie erfolgt, geht die Expression von AP-2 $\gamma$  verloren, so dass keine Expression im adulten Hoden beobachtet werden kann (Hoei-Hansen et al. 2004; Pauls et al. 2005; Pauls et al. 2006).

Interessanterweise kann zudem die Expression AP-2 $\gamma$  in einigen Keimzelltumoren des Typ II beobachtet werden. Dabei findet man die Expression in den IGCNUs (siehe auch Kapitel 1.2.2), den Seminomen und den Dysgerminomen (Hoei-Hansen et al. 2004; Pauls et al. 2005; Pauls et al. 2006). Somit stellt die Expression AP-2 $\gamma$  einen weiteren Hinweis dar, dass die IGCNUs und damit die Seminome aus einer Gonozyten hervorgehen (Oosterhuis and Looijenga 2005).

AP-2 $\gamma$  ist mittlerweile ein weiterer wichtiger Marker für die differentielle Diagnose von Keimzelltumoren.

### **1.3.4 AP-2 $\delta$**

AP-2 $\delta$  ist als viertes Mitglied der Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren beschrieben worden. Es weist ebenfalls die für diese Familie typische hohe Sequenzhomologie der DNS-Bindedomäne, als auch der Dimerisierungsdomäne auf, unterscheidet sich aber deutlich in der Aminosäuresequenz der Transaktivierungsdomäne und weist somit insgesamt den kleinsten Verwandtschaftsgrad zu den übrigen Familienmitgliedern auf. Zudem scheint AP-2 $\delta$  trotz der hohen Homologie der DNS-Bindedomäne eine leicht modifizierte Konsensussequenz (5'-GCCTGAGGCG-3') mit hoher Affinität zu binden. Aufgrund dieser Beobachtungen wird vermutet, dass AP-2 $\delta$  mit anderen Proteinen in Promotorregionen interagiert und damit einen, zu den anderen Familienmitgliedern, veränderten Mechanismus zur Transkriptionskontrolle nutzt (Zhao et al. 2001). Diese Vermutung wurde erst kürzlich bestätigt, als gezeigt werden konnte, dass AP-2 $\delta$  mit den Histon-Methyltransferasen Ash2l

und ALR interagiert und über epigenetische Mechanismen (tri-Methylierung Histon H3 an Lysin 4) zur transkriptioneller Aktivität führt (Tan et al. 2008).

AP-2 $\delta$  wird während der murinen Embryogenese ab E9.5 im sich entwickelnden Myokardium und dem Gehirn exprimiert. Zudem ist ab E10.5 eine Expression im Rückenmark und zwischen den Entwicklungsstadien E12.5 bis E16.5 im Epithel der Retina zu beobachten und weist somit keine große Überlappung im spatio-temporalen Expressionsmuster der anderen Familienmitglieder auf (Zhao et al. 2003).

### 1.3.5 AP-2 $\epsilon$

Als fünftes Mitglied der Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren ist AP-2 $\epsilon$  beschrieben worden. Die Expression von AP-2 $\epsilon$  erfolgt während der murinen Embryogenese ab E8.5 in Zellen der Neuralfalte des späteren Mittelhirns. Ab E12.0 erfolgt zudem die Expression im Rückenmark und im olfaktorischen System (Feng and Williams 2003; Wang et al. 2004).

Da es bisher keine AP-2 $\epsilon$ -Nullmutanten gibt, liegen keine Informationen über die Funktion von AP-2 $\epsilon$  während der Entwicklung.

## 1.4 *In vitro* Systeme zur Erforschung der molekularbiologischen Mechanismen in Keimzellen

Die Erforschung der molekularbiologischen Mechanismen während der Keimzellentwicklung ist in vielerlei Hinsicht interessant, da eine Störung dieser Mechanismen zur Infertilität oder zur Entstehung der Keimzelltumore führen kann. Aufgrund der Tatsache, dass man es - insbesondere in frühen Entwicklungsstadien – nur mit einer sehr kleinen Zellpopulation zu tun hat (z.B. 40 spezifizierte PGCs an E7.5 der murinen Embryogenese), ergeben sich einige Probleme bei experimentellen Arbeiten *in vivo*. Zudem besteht das Problem, dass diese Zellen in ihrem nativen Status nicht in Kultur gehalten und expandiert werden können. Deshalb ist es von großem Interesse geeignete *in vitro* Systeme zu etablieren. Vorteile von solchen *in vitro* Systemen wären neben dem leichten Zugang zu jedem Entwicklungsstadium einer Keimzelle auch die Zeit- und Kostenersparnis.

Zwar ist es möglich primordiale Keimzellen aus Mausembryonen ab E10.5 zu isolieren, diese treten jedoch kurz nach der Entnahme in einen mitotischen Arrest und differenzieren unkontrolliert. Es ist zwar möglich, einige der entnommenen Keimzellen über diese Hürde des mitotischen Arrests mittels geeigneter Zellkultur-Bedingungen (*Steel*-exprimierende Fibroblasten, Zugabe von LIF (Leukemia inhibitory factor) und bFGF (basic fibroblast growth

factor)) zu kultivieren und zu expandieren, jedoch verändern sich die Zellen sehr schnell nach der Entnahme *ex vivo* (Matsui et al. 1992; Resnick et al. 1992). Schon 24 bis 48 Stunden nach Entnahme ändern die Zellen ihr Expressionsprofil und werden zu sogenannten Embryonalen Keimzellen (EG, embryonal germ cells). Diese Zellen durchlaufen zudem während der ersten Stunden der Kultur ein Reprogrammierungsereignis und sind in der Lage nach Injektion in Blastozysten an der Entwicklung von Chimären teilzunehmen (Labosky et al. 1994a; Labosky et al. 1994b). Sie stellen somit eher eine pluripotente ES-ähnliche Population als eine Keimzellpopulation dar und sind daher für die Erforschung von molekularbiologischen Mechanismen ungeeignet.

Zurzeit sind nur zwei Möglichkeiten bekannt die molekularbiologischen Zusammenhänge in Keimzellen *in vitro* zu untersuchen. Diese werden im Folgenden kurz beschrieben.

#### **1.4.1 ES-Zell-basierte *in vitro* Systeme**

Der erste Meilenstein in der Etablierung von *in vitro* Systemen zur Studie der Keimzellendifferenzierung wurde 2003 von der Arbeitsgruppe um H. Schöler gelegt. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass es möglich ist aus embryonalen Stammzellen primordiale Keimzellen und darüber hinaus Oozyten-ähnliche Strukturen zu gewinnen (Hubner et al. 2003). Dies erfolgte durch die spontane Differenzierung von ES-Zellen. Diese wurde durch die Wegnahme von Lif aus dem Kulturmedium und das Ausplattieren der Stammzellen als *Monolayer* (d.h. die Zellen wurden in einer einschichtigen Kultur angelegt) eingeleitet. Während der Kultivierung dieser Zellen bildeten sich nach ca. 7-9 Tagen distinkte Kolonien aus, die mit der Zeit Zellaggregate in Medium abgaben. Diese Zellaggregate sind aufgrund ihrer Markergenexpression (u.A. die Expression von Mvh und Oct3/4) als Aggregate aus postmigratorischen Keimzellen und somatischen Zellen identifiziert worden und konnten durch eine expandierte Kultivierung (ca. 3 Wochen) in Oozyten-ähnliche Strukturen differenziert werden. Jedoch ist man bisher weder in der Lage diese Differenzierung zu kontrollieren noch die entstandenen Oozyten erfolgreich zu fertilisieren. Eine weitere Verwendung dieser zweidimensionalen Kulturmethode durch Nayernia *et al.* hat durch die Zugabe von Retinsäure zu haploiden männlichen Gameten geführt, die in der Lage waren *in vitro* Oozyten zu fertilisieren und auch Nachwuchs zu generieren. Jedoch sterben diese Tiere postnatal aufgrund von Imprinting-Fehlern und genetischen Aberrationen (Nayernia et al. 2006).

Generell ist zu erwähnen, dass die Effizienz dieser zweidimensionalen Kultur-Methode sehr niedrig (ca. 1% der ES-Zellen differenzieren in PGCs) und durch die Zugabe von fetalem

Kälber-Serum (FCS) nicht stringenten Kulturbedingungen ausgesetzt ist, das das FCS Chargen-bedingt Unterschiede aufweisen kann.

Ein weiterer Ansatz zur Differenzierung von ES-Zellen in Keimzellen nutzt die Formation von Embryonic Bodies (EBs) aus embryonalen Stammzellen. Dabei handelt es sich um dreidimensionale Strukturen, in denen ES-Zellen in der Lage sind, in alle drei Keimblätter zu differenzieren und damit in gewisser Weise die Entwicklung innerhalb eines Embryos nachzuahmen (Leahy et al. 1999; Keller 2005). Der Vorteil hierbei ist, dass sich innerhalb eines EBs Zell-Zell-Kontakte und somit Nischen ausbilden, die für die Differenzierung von großer Bedeutung sind. Dieser Ansatz ist von vielen Arbeitsgruppen verfolgt worden; er ist zwar genauso schwer zu kontrollieren, scheint jedoch viel effizienter zu sein, als die zweidimensionale Kulturmethode (Wei et al. 2008).

Zusätzlich zu der Nischenstruktur in den EBs haben zwei Arbeitsgruppen lösliche Faktoren zu den EB-Kulturen hinzugegeben. Toyooka *et al.* haben Bmp-4 zu den Kulturen hinzugefügt, um die Spezifizierung von primordiales Keimzellen innerhalb der EBs zu begünstigen ((Toyooka et al. 2003) siehe auch Kapitel 1.1.1.2). Geijsen *et al.* haben Retinsäure, die die Differenzierung in männliche Keimzellen begünstigt, als ein weiteres Agens verwendet ((Geijsen et al. 2004) siehe auch Kapitel 1.1.14).

Erwähnenswert ist, dass die ES-basierten Methoden zwar die Differenzierung in Keimzellen ermöglichen, jedoch einige Limitationen aufweisen. Bei diesen Methoden besteht das Problem der Verwendung von fetalem Kälberserum im Kultursystem. Chargenbedingt sind immer Unterschiede in den Seren festzustellen, zudem ist nicht klar, welche Inhaltsstoffe im Serum die Differenzierung begünstigen oder gar inhibieren können und somit die Differenzierung nicht unter genau definierten Bedingungen abläuft und dadurch Schwankungen in der Effizienz und Qualität auftreten können. Hier ist es zwingend notwendig, ein Protokoll zu etablieren, das es erlaubt unter genau definierten Bedingungen (Zusammensetzung des Mediums) zu arbeiten. Zudem ist bei beiden methodischen Ansätzen immer ein Gemisch von Zellen vorhanden, das sowohl Keimzellen verschiedener Stadien aber auch viele andere Zelltypen enthält. Die Keimzellen können zwar anhand von Oberflächenantigenen (z.B. SSEA-1) von den übrigen Zellen separiert werden, bleiben aber weiterhin eine Mischung aus verschiedenen Entwicklungsstadien.

Ein weiterer großer Nachteil ist darin zu sehen, dass embryonale Stammzelllinien ebenfalls frühe Keimzellmarker, wie Stella, Oct3/4, Blimp1 und sogar späte Keimzellmarker, wie Mvh oder DAZL exprimieren und es deshalb schwierig ist diese von Keimzellen zu unterscheiden (Silva et al. 2009).

### 1.4.2 Zelllinien-basierte *in vitro* Systeme

Als eine weitere Möglichkeit zur Studie von molekularen Zusammenhängen in Keimzellen können Keimzelltumorkulturen dienen. Dabei sind natürlich Zelllinien nötig, die molekularbiologische Eigenschaften von primordialen Keimzellen aufweisen. Aufgrund der Expressionsprofile (Expression von Keimzellmarkern) und des DNS-Methylierungsmusters (biparentale DNS-Methylierung) wären Zelllinien von IGCNUs, den Vorläufer-Neoplasien der Typ II Keimzelltumore, oder von Seminomen am besten geeignet (siehe auch Kapitel 1.2.2). Leider sind bis zum heutigen Zeitpunkt keine Zelllinien aus IGCNUs verfügbar. Jedoch gibt es zwei Zelllinien, nämlich die Linien JKT-1 und TCam-2, die beide aus Seminomen generiert wurden (Mizuno et al. 1993; Kinugawa et al. 1998).

Der Nachteil dieser *in vitro* Systeme besteht jedoch darin, dass sie entartete Zellen mit ihren chromosomalen Aberrationen repräsentieren. IGCNUs und Seminome sind aneuploid und haben oft eine Amplifikation des Chromosoms 12p oder besitzen ein Isochromosom 12p (i12p) (Atkin and Baker 1982; Atkin and Baker 1983; von Eyben 2004). Dieser Chromosomenabschnitt codiert unter anderem für das Onkogen *KRAS* und das pluripotenzassoziierte Gen *NANOG*.

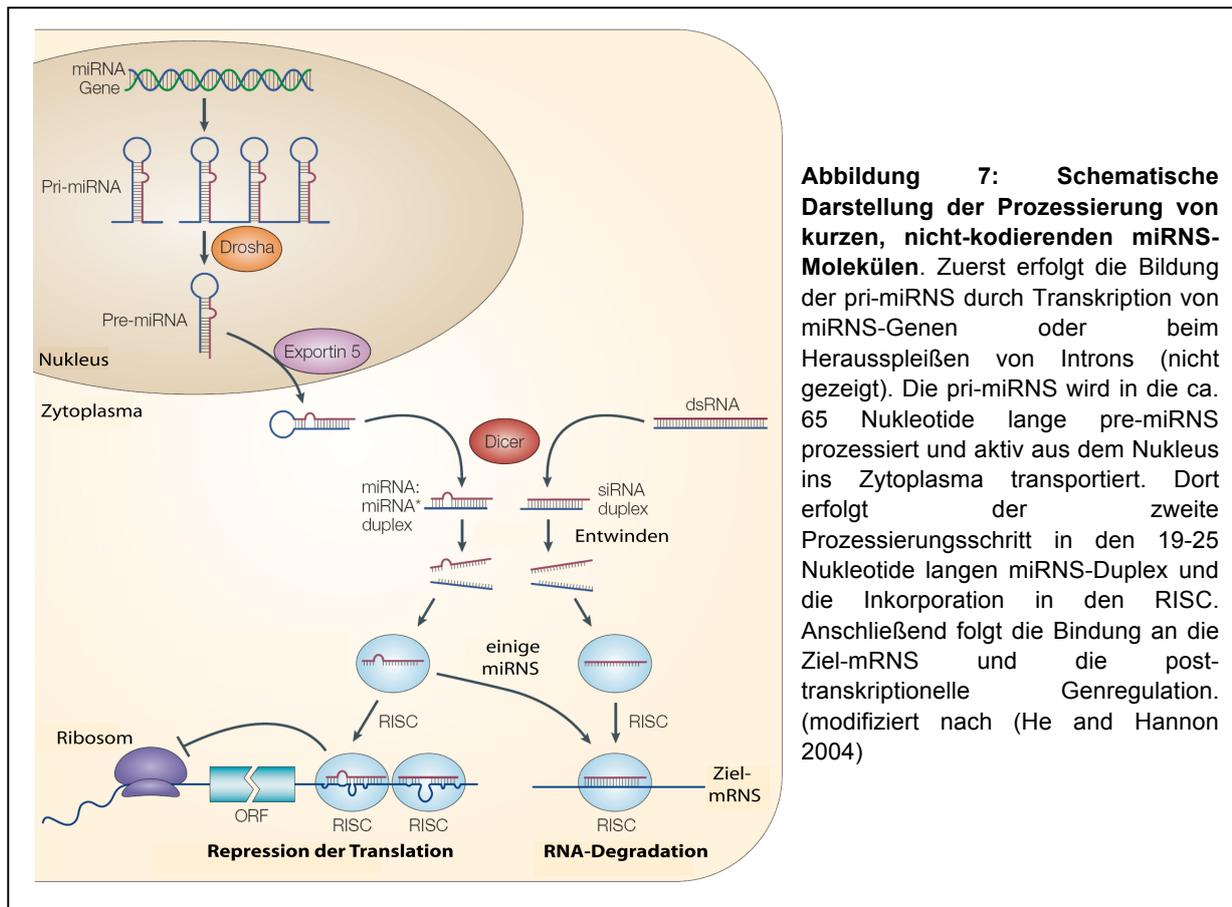
### 1.5 microRNS-Moleküle (miRNS) und die RNS-Interferenz (RNAi)

MicroRNS (miRNS) sind kurze, nicht-codierende RNS-Moleküle (ca. 19-25 Nukleotide lang), die ursprünglich bei einer Suche nach Faktoren, die für die zeitliche Abfolge von Entwicklungsprozessen verantwortlich sind, in *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurden (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993). Diese endogenen RNS-Moleküle sind entweder als unabhängige transkriptionelle Einheiten, als polycistronische Cluster oder in den Introns Protein-kodierender Gene codiert (Bartel 2004). In den meisten Fällen werden sie im Zellkern als ca. 500-3000 Nukleotide lange Vorläufer (pri-miRNS) mit Schleifen-Struktur durch RNS-Polymerase II transkribiert (Lee et al. 2004) und anschließend durch Drosha (eine RNase des Typs III) in pre-miRNS-Moleküle mit Haarnadelstruktur (ca. 65 Nukleotide lang) prozessiert (Lee et al. 2003). Es folgt der aktive Export durch Exportin 5 aus dem Nukleus ins Zytoplasma und ein weiterer Prozessierungsschritt durch die RNase Dicer. Diese Prozessierung resultiert in fertigen miRNS-Molekülen mit einer Länge 19-25 Nukleotiden.

Diese Duplexe werden in einen Multi-Protein-Komplex, den RISC (RNA induced silencing complex) inkorporiert. Innerhalb des RISC wird der RNS-Duplex entwunden und einer der RNS-Stränge wird katalytisch abgebaut. Der verbliebene miRNS-RISC-Komplex dockt nun an die entsprechende Ziel-mRNS an und ist in der Lage, die Translation einer mRNS auf

zwei verschiedene Arten zu inhibieren. Dabei ist von Bedeutung, ob die miRNS perfekt oder imperfekt komplementär zu einer Region auf der Ziel-mRNS ist. Ist die miRNS perfekt komplementär zu der Ziel-RNS, erfolgt der enzymatische Abbau dieses Transkriptes (Funktionsweise der siRNA (small interfering RNA, kleine interferierende RNS)).

Liegt keine perfekte Komplementarität vor, wird die Ziel-mRNS nicht abgebaut, es erfolgt dennoch eine post-transkriptionelle Regulation der Genexpression, d.h. das codierte Protein wird nicht translatiert (siehe Abb. 7). Dies kann entweder durch die Inhibition der Initiation



oder der Elongation der Translation oder durch den unverzüglichen Abbau des produzierten Proteins erfolgen (zusammengefasst in (Pillai et al. 2007)).

Dadurch, dass die meisten miRNS eine imperfekte Komplementarität zu ihrer Ziel-mRNS aufweisen, gestaltet sich die Suche nach validen Ziel-Transkripten schwierig. Es hat sich aber im Laufe der Zeit herauskristallisiert, dass die Komplementarität zwischen der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der Ziel-mRNS und der *Seed*-Sequenz (Nukleotide 2-8 am 5'-Ende der miRNS) eine große Rolle bei der Erkennung der Ziel-mRNS spielt (Lewis et al. 2003; Rajewsky and Succi 2004).

Der Einfluss von diesen kurzen nicht-codierenden RNS-Molekülen auf die Genregulation scheint zudem enorm, da bisweilen 695 miRNS im humanen und 488 miRNS im murinen Genom experimentell gefunden oder zumindest durch computergestützte Analysen vorhergesagt worden sind (Quelle: miRBase 12.0, <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>).

Zudem haben *in vitro* Experimente gezeigt, dass die Überexpression oder der Verlust einer miRNS bereits eine Veränderung von mehr als 100 Transkripten zur Folge hat, was zu der Annahme führen kann, dass viele der Protein-codierenden Gene durch miRNS reguliert werden (Lim et al. 2005; Selbach et al. 2008). Insofern ist es nicht überraschend, dass für nur eine miRNS mehrere hundert potentielle Ziel-mRNS möglich sind und die meisten dieser vorhergesagten Ziel-Moleküle noch experimentell bestätigt werden müssen.

Auch die Regulation der Expression der miRNS-Moleküle ist bis dato weitestgehend unbekannt. Nur die Regulation einiger Cluster ist zum Teil verstanden, z. B. ist bekannt, dass das miRNS-Cluster miR-17-92 (beinhaltet die miRNS miR-17-5p, miR-18, miR-19, miR-20, miR-92 and miR-106) von c-Myc positiv reguliert werden kann, andere miRNS jedoch negativ durch c-Myc reguliert werden (Chang et al. 2008). Interessanterweise hat eine computergestützte Analyse gezeigt, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit auch AP-2 Transkriptionsfaktoren (insbesondere AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$ ) bei der Regulation von miRNS eine Rolle spielen könnten, da sich oft AP-2-Konsensussequenzen nahe vieler miRNS-Gene befinden (Lee et al. 2007).

### **1.5.1 miRNS-Moleküle und das Zellschicksal**

Die miRNS-Maschinerie scheint für den Erhalt der Pluripotenz der Stammzell-Populationen verantwortlich zu sein, denn embryonale Stammzellen, bei denen Dicer deletiert ist, sind nicht in der Lage zu differenzieren (Bernstein et al. 2003; Kanellopoulou et al. 2005; Murchison et al. 2005).

Ein Hinweis darauf, dass die miRNS für die Entwicklung von großer Bedeutung sind, zeigen die Nullmutanten der RNase Dicer1, diese zeigen nämlich eine embryonale Letalität an E7.5 (Bernstein et al. 2003) und weisen einen Verlust an multipotenten Vorläuferzellen im Embryo auf. Konditionale Dicer-Nullmutanten zeigen verschiedene Phänotypen, je nach Zelltyp in dem die Dicer-Allele ablatiert worden ist. Diese Defekte reichen von der Morphogenese des Lungenepithels (Harris et al. 2006), der Neurodegeneration (Schaefer et al. 2007) bis hin zur Entwicklung der Skelettmuskulatur (O'Rourke et al. 2007).

Doch scheinen miRNS nicht nur für den Erhalt der Pluripotenz verantwortlich zu sein, sondern sie spielen ebenfalls eine Rolle bei der Bestimmung des Zellschicksals. Ivey *et al.* konnten erst kürzlich zeigen, dass die Überexpression der miR-133 und der miR-1 in embryonalen Stammzellen zu einer Differenzierung in mesodermale Zellen, insbesondere in Kardiomyozyten und Myoblasten führt. Während beide zuerst die mesodermale Differenzierung in embryonalen Stammzellen initiieren, wobei hier der Effekt der miR-133 stärker ist als der von miR-1, begünstigt im späteren Verlauf die Expression der miR-1 die

Bildung von Kardiomyozyten, die Expression von miR-133 hingegen die Proliferation dieser (Ivey et al. 2008). Eine weitere miRNS, die in Zusammenhang mit mesodermaler Differenzierung bzw. der Differenzierung von Kardiomyocyten in Verbindung gebracht wird, ist miR-138, von der bekannt ist, dass sie für die Musterbildung im Herzen verantwortlich ist (Morton et al. 2008). Welche Gene durch diese miRNS-Moleküle reguliert werden bzw. welche Regulation diese miRNS selbst erfahren, ist jedoch nur rudimentär bekannt. Zumindest für miR-1 und miR-133 ist bekannt, dass sie von myogenen Faktoren wie SRF (serum response factor) oder MyoD, einem bei der Muskel-Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktor reguliert werden können und mit diesem vermutlich in einer Rückkopplungsschleife interagieren (Chen et al. 2006).

### **1.5.2 Rolle kurzer nicht-codierender RNS-Moleküle während der Keimzellentwicklung**

Auch in der Keimzellentwicklung scheinen mRNS-Moleküle eine Rolle zu spielen. Hayashi *et al.* haben ein miRNS-Expressionsprofil von migratorischen und post-migratorischen Keimzellen (E9.5-E13.5) erstellt (Hayashi et al. 2008). Dabei ist aufgefallen, dass auch das miRNS-Profil der primordialen Keimzellen dem der embryonalen Stammzellen sehr ähnlich ist. Primordiale Keimzellen und ES-Zellen exprimieren den Cluster miR-290-295 (beinhaltet die miRNS miR-291a-3p, miR-291b-3p, miR-294, miR-295), welcher mit Pluripotenz und der Transition von der G1 zur S-Phase in Verbindung gebracht wird (Houbaviy et al. 2003; Wang et al. 2008).

Des Weiteren haben Hayashi *et al.* gezeigt, dass der miR-17-92 Cluster in migratorischen und post-migratorischen Keimzellen exprimiert wird. Von diesem miRNS-Cluster wird angenommen, dass es als Onkogen fungieren kann, da es in vielen Tumorentitäten hoch exprimiert wird und es mit der Zell-Zyklus-Progression und der Inhibition Apoptose in Tumorzellen in Verbindung gebracht wird (Hayashita et al. 2005; Murakami et al. 2006; Volinia et al. 2006). Anzumerken ist hier, dass diese miRNS-Moleküle an E13.5 nur in den weiblichen Keimzellen herabreguliert wurden. Zu diesem Zeitpunkt treten die weiblichen Keimzellen in die Meiose ein, die männlichen Keimzellen befinden sich hingegen immer noch in der mitotischen Teilung, was die Vermutung zulässt, dass dieser miRNS-Cluster für die Progression des Zell-Zyklus in Keimzellen verantwortlich sein könnten.

Die Expression der miRNS in primordialen Keimzellen ist zudem essentiell, da Dicer-defiziente primordiale Keimzellen einen Proliferationsdefekt zeigen und deshalb eine stark verminderte Anzahl an PGCs aufweisen. Dieser Effekt könnte durch das Aufheben der posttranskriptionellen Kontrolle von PTEN durch die, in diesem miRNS-Cluster befindlichen, miR-19a und miR-19b zu erklären sein, da diese miRNS-Moleküle die PTEN-mRNS als

putative Ziel-mRNAs haben (Lewis et al. 2003). PTEN ist wiederum als antiproliferativer Faktor in Keimzellen beschrieben worden ((Kimura et al. 2003; Moe-Behrens et al. 2003), siehe auch Kapitel 1.2.1).

## 1.6 Gezielte Mutagenese im Modellorganismus Maus (*Mus musculus*)

### 1.6.1 Herstellung von konditionalen Mausmutanten

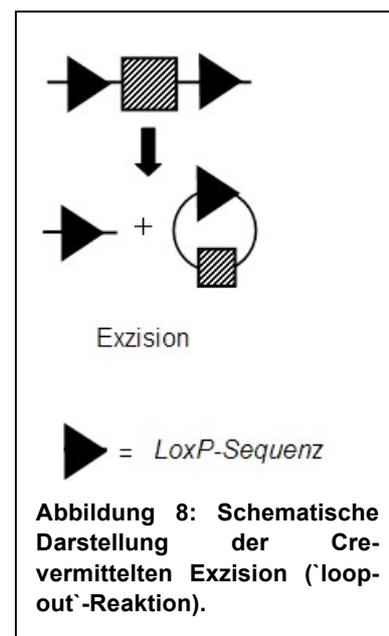
Zur Herstellung einer konditionalen (zelltypspezifischen) Deletionsmutante kann man sich zusätzlicher Rekombinasesysteme bedienen. Dies ist insbesondere dann von Interesse, wenn eine konstitutive Deletionsmutante nicht für die Erforschung der Funktion eines Gens geeignet ist, z. B. wenn die Deletion eines Gens zur Letalität während der Embryogenese führt, man aber die Genfunktion im adulten Tier untersuchen möchte.

Hierzu bedient man sich in der Regel zweier verschiedener Rekombinationssysteme, dem Cre/loxP- und dem Flp/FRT-System.

Das Cre/loxP-System aus dem Bakteriophagen P1 besteht dabei aus zwei Komponenten: der Cre-Rekombinase (causes recombination) und den palindromischen Erkennungssequenzen, den loxP-Sites (locus of crossing over of P1) (Orban et al. 1992; Lakso et al. 1996). Damit

ein Gen konditional deletiert werden kann muss es stromaufwärts und stromabwärts von zwei gleich orientierten loxP-Sequenzen flankiert ('gefloxt') werden, zuvor müssen jedoch die Erkennungssequenzen durch homologe Rekombination gegen das wildtyp-Allel ausgetauscht werden. Durch anschließende Verpaarungen von Mäusen mit 'geflochten Allelen' mit transgenen Mäusen, die die Cre-Rekombinase zelltyp-spezifisch exprimieren, wird der loxP-flankierte Bereich im Genom nun ausgeschnitten (Exzision, siehe Abb. 8).

Das Flp/FRT-System funktioniert auf die gleiche Art und Weise, wie das Cre/loxP-System. Hier bedient man sich aus Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gewonnenen Flp-Rekombinase (Flippase) und den dazugehörigen FRT-Erkennungssequenzen (Flippase recognition target) (Dymecki 1996).



### 1.6.2 Konditionale Mausmutanten von AP-2 $\gamma$

In der vorliegenden Arbeit wurde eine konditionale Mutante von AP-2 $\gamma$  verwendet. Bei dieser Mauslinie ist auf beiden Allelen das Exon 5 des AP-2 $\gamma$ -Gens von loxP-Sequenzen flankiert (AP-2 $\gamma^{\text{loxP/loxP}}$ ). Exon 5 codiert dabei für einen Teil der DNS-Bindedomäne und ist somit für die Funktion von AP-2 $\gamma$  als Transkriptionsfaktor essentiell (Werling and Schorle 2002a). Eine Cre-vermittelte Exzision dieses Exons führt folglich zu einem Nullallel. Um Embryonen zu erhalten, in denen beide Allele von AP-2 $\gamma$  deletiert sind, wurden weibliche AP-2 $\gamma^{\text{loxP/loxP}}$  - Mäuse mit männlichen Tieren verpaart, die einerseits die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Sox2-Promotors exprimieren und andererseits heterozygot defizient für die AP-2 $\gamma$ -Allele sind (Sox2Cre<sup>+</sup>AP-2 $\gamma^{\text{+/-}}$ ). Die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Sox2-Promotors erfolgt ab E6.5 nur im Epiblast und nicht im Trophektoderm (Hayashi et al. 2002; Hayashi et al. 2003). Dadurch wird die essentiellen Funktion von AP-2 $\gamma$  für die Entwicklung der Plazenta erhalten und ermöglicht so die Charakterisierung der Funktion von AP-2 $\gamma$  im Embryo bis hin zum adulten Tier (siehe auch Kapitel 1.3.3).

## 1.7 Zielsetzung

Eine Analyse von konstitutiven AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten zeigte eine essentielle Rolle dieses Transkriptionsfaktors in der Entwicklung des extraembryonalen Gewebes. Durch die Deletion kommt es zu einer verminderten Proliferation der Riesenzellen in der Plazenta und aufgrund dessen zu einer Unterversorgung des Embryos. Dies führt zu einem retardierten Größenwachstum des Embryos und schließlich zu einer frühen Letalität (Werling and Schorle 2002b).

Konditionale AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten, bei denen beide Allele nur im embryonalen Gewebe deletiert wurden, weisen hingegen einen Verlust der Keimzellen in einem frühen Stadium der Embryogenese auf (ca. E8.0-E8.5). Dieser Keimzellverlust geht mit der Sterilität adulter Tiere einher (Dissertation Susanne Weber), so dass dieser Phänotyp auf eine Rolle von AP-2 $\gamma$  in der Keimzellbiologie hinweist.

In dieser Arbeit sollte zunächst die Expression von AP-2 $\gamma$  in primordialen Keimzellen nachgewiesen werden und zudem die molekularbiologischen Konsequenzen des AP-2 $\gamma$ -Verlustes in der Keimzellbiologie untersucht werden. Die Untersuchung der molekularbiologischen Mechanismen von AP-2 $\gamma$  in primordialen Keimzellen sollte dabei mittels geeigneter *in vitro* Systeme erfolgen.

## 2 Material

### 2.1 allgemeine Chemikalien

2-Propanol	Merck, Darmstadt
Acrylamid Mix (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich, München
Ampicilin	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
BM-Purple	Roche, Penzberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Cacodylat	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxiribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen, Karlsbad
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dithiotreitol 0,1M (DTT)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd-Lösung (37%)	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	KMF, Lohmar
Glycerol	Sigma-Aldrich, München
Hefe-Extrakt	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Lämmli-Probenpuffer	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS	Sigma-Aldrich, München

Natriumacetat, 3M, pH4,6	Applied Biosystems, Warrington, GB
Natrium Borhydrid (NaBH <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRad, München
Natronlauge (5M)	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide (Primer)	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Pferde-Serum	Vector Laboratories
Phenol/ Chloroform	Roth, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)- Tabletten	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
TRIzol	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypton	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe

### 2.1.1 Radiochemikalien

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-Cytidintriphosphat

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

1,5ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
2,0ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
96-Loch-Mikrotiterplatten	TPP
48-Well-Zellkulturschalen	TPP
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Einstreu	Ssniff, Soest
Glaskapillaren	Drummond Scientific, Broomall, USA
Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger	Menzel, Braunschweig
PCR-Reaktionsgefäße 100 $\mu$ l	Axygen (Nerbe Plus), Winsen, Luhe
Petrischalen 10cm	Greiner Labortechnik, Solingen

Petrischalen 3cm	TPP
Tierfutter	Ssniff, Soest
Roti-PVDF-Membran	Roth, Karlsruhe
Röntgenfilme	Kodak, Rochester, USA
Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup>	Greiner
Zellkulturschalen 10cm	TPP
Zellkulturschalen 15cm	TPP
Zellsieb 20µm Maschendurchmesser	Greiner

### 2.3 verwendete Enzyme

DNaseI	New England Biolabs, Schwalbach
Platinum Taq-Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
RNaseOUT	Invitrogen, Carlsbad, USA
SuperScript III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad, USA
Terminale Transferase	New England Biolabs, Schwalbach
Trypsin	PAN Biotech, Wien, Österreich

### 2.4 Laborgeräte

Bakterienschüttler	Innova 4000	New Brunswick Scientific
Gelsysteme	50ml, 100ml, 250ml	Peqlab
Homogenisator	Micra D-8	Labortechnik, Müllheim
Inkubator		Heraeus
Luminometer	Centro LB960	Berthold
Nassblot-Kammer	Trans-Blot-Cell	BioRad
Netzgerät	E143	Consort
Photometer	NanoDrop	Peqlab
Sequenzierer	ABI Prism310	Applied Biosystems
	Genetic Analyser	
Speed-Vac	Concentrator 5301	Eppendorf
Sterilbank	Hera Safe	Kendro

Thermocycler	PTC-200	MJ Research
Thermoschüttler	Thermomixer compact	Eppendorf
UV-System/ Kamera	Classic Uno	Intas
Wasserbad		GFL
Zell-Inkubator	Cytoperm 2	Heraeus
Zentrifugen	5417	Eppendorf
	5415D	Eppendorf

## 2.5 Puffer, Lösungen, Medien

Soweit nicht anders beschrieben, handelt es sich bei dem verwendeten Wasser um ddH<sub>2</sub>O.

### 2.5.1 allgemeine Lösungen

10x Ladepuffer	49% Glycerol; 49% H <sub>2</sub> O; 2% 50x TAE 1 Spatelspitze Bromphenolblau 1 Spatelspitze Xylencyanol
Laufpuffer Westernblot	50mM Tris ; 384mM Glycin ; 0,1% SDS
1M Tris-Puffer	In H <sub>2</sub> O; pH-Wert mit HCl oder NaOH einstellen
20x MOPS	400mM MOPS; 100mM Nac; 10mM EDTA
20x SSC pH7,0	174g NaCl; 88,2g Na-Citrat add 1l H <sub>2</sub> O
50x TAE	2M Tris; 1M NaOAc; 50 mM EDTA
10x TBE	1,0 M Tris-Borat ; 20 mM EDTA pH 8,3
ChIP-Lyse-Puffer	50 mM HEPES-KOH pH7.5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA pH8; 1% Triton X-100; 0.1% Natriumdesoxycholat; 0.1% SDS Protease-Inhibitoren (frisch hinzufügen)
ChIP-Wasch- und Bindepuffer	0.1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA pH8; 150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH8
ChIP-Elutionspuffer	50 mM Glycin; pH 2.5-3.0; 1.0 M Tris pH 7.5
CoIP-Lysepuffer	20 mM Tris HCl pH 8; 137 mM NaCl; 10% glycerol; 1% Nonidet P-40 (NP-40); 2 mM EDTA
Ethidiumbromid-Stammlösung	10mg*ml <sup>-1</sup> Ethidiumbromid
PBT	0,1% Triton-X100; 2,0% BSA in PBS

PBSMT	0,1% Tween-20, 1,5% Milchpulver in PBS
PBST	0,1% Tween-20 in PBS
Qiagen-Puffer P1	50mM Tris-HCl pH8; 10mM EDTA; 100µg/ml RnaseA
Qiagen-Puffer P2	200mM NaOH; 1% SDS
Qiagen-Puffer P3	3,0M KAc pH 5,5
Qiagen-Puffer QBT	750mM NaCl; 50mM MOPS pH7; 5% Isopropanol 0,15% Triton
Qiagen-Puffer QC	1M NaCl; 50mM MOPS pH7; 15% Isopropanol
Qiagen-Puffer QF	1,25 mM NaCl ; 50mM Tris-HCl pH8,5 15% Isopropanol
RIPA-Puffer	10 mM Phosphatpuffer; 0,1 % SDS; 1 % Triton- X100; 0,1 % Natriumdesoxycholat; vor Verwendung Protease-Inhibitor hinzugeben
RNA-Denaturierungspuffer	6,5% Formaldehyd; 0,5% Ethidiumbromid; 4x MOPS; 50% Formamid (rekristallisiert)
Stripping-Puffer Westernblot	100mM Mecaptoethanol; 2% SDS; 62,5 mM Tris pH 6,6
1x TdT-Puffer	30mM Tris; 140mM Cacodylat, pH7,2; 25mM CoCl <sub>2</sub>
Transferpuffer Westernblot	25mM Tris ; 192mM Glycin ; 20% Methanol

### 2.5.2 Lösungen für die Zellkultur

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco`s MEM mit Glutamax (DMEM)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Hyclone, Logan, USA
FugeneHD	Roche, Penzberg
Gelatine	Sigma-Aldrich, München
Leukemia Inhibiting Factor (Lif)	Millipore, Schwalbach
L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad, USA
MACS-Puffer	2mM EDTA; 0,5% BSA in PBS
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA) (100x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Penicilin/Streptomycin (P/S)	Invitrogen, Carlsbad, USA

Phosphat-gepufferte Salzlösung	Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin	PAN Biotech, Wien, Österreich
β-Mercaptoethanol (β-Me)	Invitrogen, Carlsbad, USA

### 2.5.3 Medien für die Zellkultur

ES-Medium (Medium für embryonale Stammzellen)	DMEM; 15% FCS; 50 U/ml P/S; 200nM L-Glutamin; 1X NEAA; 1000 U/ml Lif; 100nM β-Me
EB-Medium (Medium für embryoid bodies)	DMEM; 15% FCS; 50 U/ml P/S; 200nM L-Glutamin; 1X NEAA; 100nM β-Me
Einfriermedium	10% DMSO; 90% FCS
Fibroblasten-Medium (Feeder-Medium)	DMEM; 15% FCS; 50 U/ml P/S; 200nM L-Glutamin; 1X NEAA; 100nM β-Me
TCam-2-Medium	RPMI; 10%FCS; 200nM L-Glutamin; 50 U/ml P/S

### 2.5.4 Lösungen für die Bakterienkultur

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

### 2.5.5 Lösungen für die Präparation und Antikörperfärbung von Mausembryonen

DMEM-BSA	DMEM; 20mg/ml BSA
PBS-EDTA	PBS; 1mM EDTA
PBST	PBS; 2%BSA; 0,1% Triton-X100

## 2.6 Nukleinsäuren

### 2.6.1 Oligonukleotide zur Detektion muriner Sequenzen

In4down	5'- AACAGGTTATCATTTGGTTGGGATT -3'
Ex5up	5'- CAATTTTGTCCAACCTTCTCCCTCAA -3'
Ex6up	5'- AATAGTCAGCCACCGCTTTACTAGG -3'
Cre-F	5'- CCACGACCAAGTGACAGCAATG -3'
Cre-R	5'- CAGAGACGGAAATCCATCGCTC -3'
mAct-F	5'- GGTCAGAAGGACTCCTATGT -3'
mAct-R	5'- ATGAGGTAGTCTGTCAGGTC -3'
mAP-2g-F	5'- ATTTTCGATGACCAAGAACCCTTTG -3'
mAP-2g-R	5'- ACGAGAGACGTGAGGAGAGTGAC-3'
mBlimp-F	5'- GCCAACCAGGAACTTCTTGTGT -3'
mBlimp-R	5'- AGGATAAACCACCCGAGGGT -3'
mDAZL-F	5'- CAGCAACCACAAGTCAAGGA -3'
mDAZL-R	5'- ACGTGGCTGCACATGATAAG -3'
mHOXB1-F	5'- GATCCTACAGGTCTTGGGACC -3'
mHOXB1-F	5'- AGCTCAAAGGCACTGAACTGAG -3'
mKit-F	5'- CATCCATCCATCCAGCACAA -3'
mKit-R	5'- CACAACAGGGATAGCCTTGA -3'
MVH-F	5'- CCAAAAGTGACATATATACCC -3'
MVH-R	5'- TTGGTTGATCAGTTCTCGAG -3'
mNanos3-F	5'- TCCCGTGCCATCTATCAG -3'
mNanos3-R	5'- GGATGTTGAGGCAACACC -3'
mNkx2.5-F	5'- CAAGTGCTCTCCTGCTTTCC -3'
mNkx2.5-R	5'- AGGTACCGCTGTTGCTTGAA -3'
mOct4-F	5'- CTAGCATTGAGAACCGTGTGAG -3'
m-Oct4-R	5'- GAAAGGTGTCCTGTAGCCTCAT -3'
mPrdm14-F	5'- GCCTGAACAAGCACATGAGA -3'
mPrdm14-R	5'- AGGAAGCCTTTCCCACAAAT -3'
mStella-F	5'- GTCGGTGCTGAAAGACCCTA -3'
mStella-R	5'- GATTTCCCAGCACCAGAAAA -3'

### 2.6.2 Oligonukleotide zur Detektion humaner Sequenzen

hAFP-F	5'- AGCTTGGTGGTGGATGAAAC -3'
hAFP-R	5'- CCCTCTTCAGCAAAGCAGAC -3'
hAP-2g-F	5'- CCCACTGAGGTCTTCTGCTC -3'
hAP-2g-R	5'- AGAGTCAC ATGAGCGGCTTT -3'
hBLIMP-F	5'- GGGTGCAGCCTTTATGAGTC -3'
hBLIMP-R	5'- CCTTGTTCA TGCCCTGAGAT -3'
hBUOLE-F	5'- TATAAGGATAAGAAGCTGAACATTGGT-3'
hBOULE-R	5'- CGAAGTTACCTCTGGAGTATGAAAATA-3'
hDAZL-F	5'- ATGTTAGGATGG ATGAAACTGAGATTA -3'
hDAZL-R	5'- CCATGGAAATTTATCTGTGATTCTACT -3'
hGAPDH-F	5'- TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC -3'
hGAPDH-R	5'- ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC -3'
HOXB1-F	5'- TCAGAAGGAGACGGAGGCTA -3'
HOXB1-R	5'- GTGGGGGTGTTAGGTTCTGA -3'
hOCT4-F	5'- CGAAAGAGAAAGCGAACCCAG -3'
hOCT4-R	5'- GCCGGT TACAGAACCACACT -3'
hPRMT5-F	5'- TTGCCGGC TACTTTGAGACT -3'
hPRMT5-R	5'- AAGGCAGGA AAGCAGATTGA -3'
hVASA-F	5'- AGAAA GTAGTGATACTCAAGGACCAA -3'
hVASA-R	5'- TGACAGAGATTAGCTTCTTCAAAGT -3'

### 2.6.3 siRNS

hAP-2 $\gamma$ -siRNS	sc29696, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
-----------------------	---

### 2.6.4 Oligonukleotide für die Synthese von cDNS

Oligo-d(T) <sub>20</sub> -Primer	New England Biolabs, Schwalbach
----------------------------------	---------------------------------

### 2.6.5 Oligonucleotide zur radioaktiven Detektion von miRNS

miR-1	5'- TGG AATGTAAAGAAGTATGTATCCTGTCTC-3'
miR-133a	5'- TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG CCTGTCTC-3'

miR-133b	5`- TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTA CCTGTCTC-3`
miR-138	5`- AGCTGGTGTGTGAATCAGGCCGCCTGTCTC-3`
U6snRNA	5`- CCCTGCGCAAGGATGACACGCA CCTGTCTC-3`

## 2.7 Antikörper und magnetische Beads

### 2.7.1 primäre Antikörper

anti-AP-2 $\gamma$	H-77, Kaninchen, polyklonal, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-AP-2 $\gamma$	6E4/4, Maus, monoklonal, Millipore, Schwalbach
anti-AFP	(A0008), Kaninchen, polyklonal, DAKO, Hamburg
anti- $\beta$ -Actin	AC-15, monoklonal, Maus, Sigma-Aldrich, München
anti-Blimp1	3H2-E8, Maus, monoklonal NOVUS Biologicals, Littleton, USA
anti-Blimp1	Maus, monoklonal, zur Verfügung gestellt von Dr. H-M Jäck, Erlangen
anti-DIG-HRP	Roche, Penzberg
anti-H2A/H4R3me2	Kaninchen, polyklonal Abcam, Cambridge, England
anti-cKit	A4502, Kaninchen, polyklonal, DAKO, Hamburg
anti-Oct	C-10, Maus, polyklonal, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-PRMT5	O14744, Kaninchen, polyklonal, Millipore, Schwalbach
anti-SSEA-1	MC-480, Maus, Monoklonal R&D Systems, Mineapolis, USA
anti-Stella	ab19878, Kaninchen, polyklonal Abcam, Cambridge, England

### 2.7.2 sekundäre Antikörper

anti-Kaninchen-Alexa-488	Ziege, Invitrogen, Carlsbad, USA
anti-Kaninchen-Alexa-594	Ziege, Invitrogen, Carlsbad, USA
anti-Maus-Alexa-488	Ziege, Invitrogen, Carlsbad, USA
anti-Maus-Alexa-594	Ziege, Invitrogen, Carlsbad, USA
anti-Kaninchen-HRP	Ziege, DAKO, Hamburg
anti-Maus-Alexa-HRP	Ziege, DAKO, Hamburg

### 2.7.3 magnetische Beads

anti-Maus-IgM	Miltenyi, Bergisch Gladbach
DYNABEADS®	Invitrogen, Carlsbad, USA

## 2.8 Zellsysteme

### 2.8.1 Prokarioten

TOP10F`	<i>E. coli</i> -Stamm: F`{ <i>lacIq</i> Tn10 (TetR)} <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i>
---------	---

### 2.8.2 Eukaryoten

JKT-1	Humane Keimzelltumorzelllinie aus einem Seminom. Zur Verfügung gestellt von K. Kinugawa,
TCam-2	Humane Keimzelltumorzelllinie aus einem Seminom. Zur Verfügung gestellt von S. Kitazawa,
AP-2 $\gamma$ <sup>+/+</sup> L1	Murine ES-Zelllinie, 25%B6, 75%129/SV Zur Verfügung gestellt von Dr. S. Buhl
AP-2 $\gamma$ <sup>-/-</sup> L20	Murine ES-Zelllinie, 25%B6, 75%129/SV Zur Verfügung gestellt von S. Buhl
MEF	murine embryonale Fibroblasten

## 2.9 Mauslinien

129/SV-AP-2 $\gamma^{\text{loxP/loxP}}$	homozygot konditionale AP-2 $\gamma$ -Linie genetischer Hintergrund: 129/SV
B6-Sox2Cre-AP-2 $\gamma^{+/-}$	heterozygote AP-2 $\gamma$ -Linie, Cre-Expression unter der Kontrolle des Sox2-Promotors genetischer Hintergrund: 25% 129/SV, 75%B6

## 2.10 Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
mirVana™ miRNA Detection Kit	Applied Biosystems, Warrington, GB
mirVana™ miRNA Probe Construction Kit	Applied Biosystems, Warrington, GB
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen HiSpeed Maxi Kit	Qiagen, Hilden
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Perbio

## 3 Methoden

### 3.1 Tierhaltung

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

Das Töten der Tier erfolgte durch zervikale Dislokation.

Nach Verpaarung der Tiere für die Gewinnung von Embryonen wurde jeden Morgen eine Pfropfkontrolle durchgeführt. Der Tag, an dem ein Vaginalpfropf gefunden wurde, wurde als Tag 0,5 der Embryonalentwicklung festgelegt (E0.5).

### 3.2 Mikrobiologische Methoden

#### 3.2.1 Präparation kompetenter *E.coli*-Kulturen

Eine Bakterienkultur wurde in 50ml LB-Medium ü/N bei 37°C und 250rpm in einem Bakterenschüttler inkubiert (Vorkultur). 1ml der Vorkultur wurde anschließend 1:100 in LB-Medium verdünnt und noch einmal bis zu einer OD<sub>650</sub> 0,2 weiter wachsen lassen (37°C, 250rpm). Anschließend wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (5 min, 2500rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 50 l kalten CaCl<sub>2</sub> (50mM) vorsichtig resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation (5 min, 2500rpm, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 10ml kalten CaCl<sub>2</sub> (50mM) + 15% Glycerol resuspendiert und schließlich in 100µl Aliquots in Reaktionsgefäßen portioniert. Vor der Lagerung bei -80°C wurden die Aliquots in flüssigen N<sub>2</sub> schockgefrostet.

#### 3.2.2 Herstellung von LB-Amp-Agarplatten

LB-Agar wird in der Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 55°C mit 100µg/ml Ampicillin versetzt. Danach wird der LB-Amp-Agar auf Petrischalen (9cm) portioniert und zum Gelieren abgekühlt.

### 3.2.3 TOPO-Klonierung

Die TOPO-Klonierung stellt eine schnelle und effiziente Methode zur Subklonierung von PCR-Produkten dar. Dabei macht sich die TOPO-Klonierung die Tatsache zunutze, dass die bei der PCR benutzte *Taq*-Polymerase an das 3'-Ende des PCR-Produktes ein Deoxyadenosin (A) anhängt. Dadurch lässt sich das PCR-Fragment leicht in den pCR-II-TOPO-Vektor (im Kit enthalten) zwischenklonieren, da dieser Desoxythymin-Überhänge an den 5'-Enden aufweist.

Bei allen Schritten wurde sich streng an die Herstellerangaben gehalten.

### 3.2.4 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA ("Mini-Präp")

Die Mini-Präp dient der späteren Identifizierung von positiven Bakterienklonen.

Für die Mini-Präp wurden 2,5ml Selektionsmedium mit einer Bakterienkolonie von einer LB-Amp-Agarplatte beimpft und ü/N bei 37°C unter Schütteln (225rpm) inkubiert.

1,5ml der Übernachtskultur wurden anschließend pelletiert (2 min, 13200rpm), der Überstand verworfen und das Pellet in 150µl Qiagen-Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300µl Qiagen-Puffer P2 wurden die Bakterien lysiert (alkalische Lyse). Das Lysat wurde anschließend mit 150µl Qiagen-Puffer P3 neutralisiert. Durch Zentrifugation (5 min, 13200 rpm) wurde das ausgefallene SDS pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Extraktion und Präzipitation der DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und EtOH. Die aufgereinigte DNA wurde in 40µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen.

### 3.2.5 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA ("Maxi-Präp")

Die Maxi-Präp dient der Vermehrung eines Plasmides, dabei wurde das Qiagen HiSpeed Maxi Kit zur Aufreinigung der Plasmid-DNA verwendet, dabei wurde streng nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Zunächst wurden 200ml einer Übernachtskultur zentrifugiert (15 min, 5000rpm, 4°C) und der Überstand verworfen. Danach erfolgte die Resuspension der Bakterien in Qiagen-Puffer P1 und die anschließende Lyse mit Qiagen-Puffer P2 (5 min, RT). Es folgte die Neutralisierung mit Qiagen-Puffer P3 (10 min, RT). Mittels der QIA-Filter-Maxi-Cartidge wurden die Zelltrümmer, genomische DNA und das ausgefallene SDS abfiltriert und die Plasmid-DNA in einer Säule (HiSpeed Maxi Tip) an einer Anionenaustauscher-Matrix aufgereinigt.

Anschließend wurde die DNA an der Silika-Membran des QIA-Precipitators entsalzt, konzentriert und mit 1000µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> eluiert.

### **3.3 Nukleinsäureanalytik**

#### **3.3.1 DNS-Isolation aus Geweben und Zellen**

Die Gewebestücke oder Zellpellets wurden über Nacht in 710µl Lyse-Puffer und 40µl Proteinase K-Lösung (10mg/ml) bei 55°C lysiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben 5min bei Raumtemperatur gemischt. Nach Zugabe von 300µl 5 M NaCl, wurden die Proben erneut 5min gemischt und 10min bei 13000rpm und 10°C zentrifugiert. 750µl des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit vorgelegten 1000µl 2-Propanol überführt. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch eine zweistündige Inkubation bei -20°C anschließen folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 13000rpm und 4°C. Das so erhaltene Präzipitat wurde zweimal mit 500µl 80%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C für 30min getrocknet und anschließend in 400µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Danach wurde die DNS 2h bei 37°C gelöst.

#### **3.3.2 RNS-Isolation aus Geweben und Zellen**

Das Gewebe oder die Zellpellets wurden zunächst in 800µl Trizol lysiert. Das Lysat konnte zu diesem Zeitpunkt bei -70°C gelagert werden oder wurde sofort weiterbearbeitet. Als Nächstes wurden 400µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben. Das Gemisch wurde 15sec kräftig geschüttelt, dann für 5 min bei RT inkubiert und schließlich zentrifugiert (15min, 10600rpm, 4°C). Danach wurden maximal 600µl der wässrigen RNA-haltigen Phase sorgfältig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde anschließend mit 1500µl Isopropanol versetzt und für 2 Stunden bei -80°C inkubiert und danach zentrifugiert (15min, 10600rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierte RNA wurde zweimal mit 1000µl 70% Ethanol (verdünnt in DEPC-Wasser) gewaschen und zentrifugiert (5min, 8000rpm, 4°C). Der Überstand wurde dekantiert und die sedimentierte RNS 10min lang luftgetrocknet. Danach wurde die RNS in 400µl DEPC-Wasser für 10min bei 55°C auf dem Schüttler gelöst.

### **3.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung Nukleinsäure-haltiger Lösungen**

Bei der Konzentrationsbestimmung erfolgt die Messung der Absorption mittels Photometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260\text{nm}$  (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren). Dabei wird gegen das Lösungsmittel gemessen. Zudem lässt sich anhand des Quotienten der Absorption bei  $\lambda=260\text{nm}$  und  $\lambda=280\text{nm}$  (Absorptionsmaximum aromatischer AS der Proteine) die Reinheit einer Nukleinsäure-Lösung eruieren. Der Quotient sollte bei DNS-haltigen Lösungen um 1,8 liegen, bei RNS-haltigen Lösungen um 2,0.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am NanoDrop. Dieses Gerät ermöglicht die photometrische Konzentrationsbestimmung mit geringen Volumina ( $1\mu\text{l}$ ).

### **3.3.4 Restriktionsverdau**

Für den Restriktionsverdau von DNS wurden Typ II Restriktionsendonukleasen verwendet.

Für einen analytischen Verdau wurde  $1\mu\text{g}$  DNS mit  $2\mu\text{l}$  10x Restriktionspuffer und  $1,5\mu\text{l}$  Enzym ( $10\text{U}/\mu\text{l}$ ) versetzt und das Reaktionsvolumen mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf  $20\mu\text{l}$  eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde für 2h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

Für einen präparativen Verdau wurden  $5\mu\text{g}$  DNS mit  $8\mu\text{l}$  10xRestriktionspuffer und  $5\mu\text{l}$  Enzym ( $10\text{U}/\mu\text{l}$ ) versetzt und das Reaktionsvolumen mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf  $80\mu\text{l}$  eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend ü/N bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

### **3.3.5 DNaseI-Verdau von RNS-Lösungen**

Um Kontaminationen von RNS-Lösungen mit genomischer DNS zu eliminieren, wurde die DNS mithilfe von DNaseI enzymatisch abgebaut. Dazu wurden  $1\mu\text{g}$  RNS mit  $1\mu\text{l}$  DNase-Puffer und  $1\mu\text{l}$  DNaseI versetzt und das Volumen auf  $10\mu\text{l}$  mit RNase-freiem Wasser eingestellt. Nach einer Inkubation von 10min bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von  $1\mu\text{l}$   $0,25\text{mM}$  EDTA abgestoppt und die DNase durch Hitze inaktiviert (15min,  $70^\circ\text{C}$ ).

### **3.3.6 Denaturierung von RNS-haltigen Lösungen zur qualitativen Analyse**

Für die anschließende Qualitätskontrolle von RNS-haltigen Lösungen wurde die RNS denaturiert. Dazu wurden  $1\mu\text{g}$  RNS in  $10\mu\text{l}$  RNA-Denaturierungspuffer aufgenommen und anschließend für 10min bei  $65^\circ\text{C}$  denaturiert.

### 3.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur präparativen Isolierung und Analyse verschiedener doppelsträngiger DNS-Fragmente wurden horizontale Agarose-Gele gegossen. Dazu wurde Agarose in 1xTAE-Puffer aufgenommen und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach einer kurzen Abkühlphase wurde die flüssige Agarose mit Ethidiumbromid (0,5µg/ml) versetzt. Das auspolymerisierte Gel wurde anschließend mit 1xTAE-Puffer überschichtet und mit DNS (versetzt mit Ladepuffer) beladen.

Für die qualitative Analyse von RNS wurden ebenfalls horizontale Agarose-Gele gegossen. Dazu wurde 1,2g Agarose in 5ml 20xMOPS-Puffer und 83ml ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wurden 12ml 37%-iger Formaldehyd-Lösung hinzugegeben. Das auspolymerisierte Gel wurde anschließend mit 1xMOPS-Puffer überschichtet und mit denaturierter RNS (versetzt mit Ladepuffer) beladen.

In einem elektrischen Feld können anschließend die Nukleinsäurefragmente der Länge nach aufgetrennt werden. Die Detektion und Dokumentation der Nukleinsäuren wurde unter UV-Licht ( $\lambda = 322\text{nm}$ ) durchgeführt.

### 3.3.8 Elution von DNS aus Agarose-Gelen

Dieses Verfahren ermöglicht die Isolation eines gewünschten DNS-Fragmentes mit dem Qiagen Gel extraction Kit. Ein DNS-Gemisch wurde dabei in einer Agarose Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt und das gewünschte Fragment unter UV-Licht ( $\lambda = 322\text{nm}$ ) lokalisiert. Das Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen.

Das Gelstück wurde anschließend mit dem dreifachen Volumen an QG-Puffer versetzt und die Agarose bei 50°C gelöst. Die Lösung wurde dann mit einem Gelvolumen Isopropanol versetzt, gemischt, in die QIAGEN-Säule gegeben und 1min bei 13200rpm zentrifugiert. Dabei bindet DNS aufgrund der hohen Affinität zur Silikamatrix an die Membran der Säule. Anschließend erfolgt das Waschen der DNS mit 750µl PE-Puffer für 5 min. Danach erfolgte zwei Zentrifugationsschritte (je 1min, 13200rpm). Die aufgereinigte DNS konnte nun anschließend durch Auftropfen von 30µl H<sub>2</sub>O und erneuter Zentrifugation (1min, 13200rpm) aus der Membran eluiert werden.

### 3.3.9 Synthese von copy-DNS (cDNS)

Durch die reverse Transkription von mRNA in cDNS kann man die einzelsträngige mRNA in doppelsträngige DNS-Moleküle umschreiben. Dabei bedient man sich Reverser Transkriptasen aus Viren.

Als Startermolekül dient ein Oligonukleotid (Oligo-d(T)), das an die poly(A)-Sequenz der mRNA bindet. Mittels der reversen Transkription (RT) und einer anschließenden Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, siehe Kapitel 3.3.9) ist man in der Lage, die Transkripte einzelner Gene in Verhältnis zueinander zu setzen und somit Aussagen über die Regulation von Genen zu machen. Mithilfe eines Referenzgens ist es möglich, die Transkriptmengen verschiedener Proben zu vergleichen. Die Kombination von cDNS-Synthes und anschließender PCR wird auch als Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) bezeichnet.

Für die Synthese von cDNS wurde wie folgt verfahren:

100ng DNaseI-behandelte RNA wurde mit 1µl Oligo-d(T) und 2µl dNTPs (10mM) gemischt und das Volumen mit RNase-freien Wasser auf 13µl eingestellt. Anschließend folgte ein Denaturierungsschritt für 5min bei 65°C um eventuelle Sekundärstrukturen der RNS aufzulösen. Nach dem Denaturieren wurde das Nukleinsäure-Gemisch auf Eis abgekühlt und es folgte die Zugabe von 1µl SuperScript III Reverser Transkriptase, 1µl DTT (0,1M), 1µl RNaseOut und 4µl Reverse Transkriptase-Puffer. Die Synthese der cDNS erfolgte für 1h bei 55°C.

Die so gewonnene cDNS kann nun in einer PCR benutzt werden.

### 3.3.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine feanalytische Technik zur logarithmischen Amplifikation von DNS Fragmenten. Eine PCR beruht auf der Tatsache, dass ausgewählte Startermoleküle (Primer, Oligonukleotide, die die Sequenz von Interesse flankieren) bei einer bestimmten Temperatur (Annealingtemperatur) an homologe Sequenzen binden und sich anschließend in 5'→3'-Richtung durch eine DNA-Polymerase verlängern lassen. Dieser Zyklus kann wiederholt werden, was eine Amplifikation der, durch die Primer flankierten, Sequenz führt.

Im Verlauf einer PCR wird die doppelsträngige Matrizen-DNS (dsDNS) bei Temperaturen oberhalb 90°C zu einzelsträngiger DNS (ssDNS) denaturiert. Anschließend wird die Temperatur auf die Annealingtemperatur herabgesetzt und die Primer werden durch eine thermostabile DNA-Polymerase in 5'→3'Richtung verlängert.

Die PCR wurde in dieser Arbeit sowohl zur Genotypisierung von Mäusen und Zellen, als auch zur semiquantitativen Analyse von Transkriptmengen (RT-PCR, siehe auch Kapitel 3.3.9) benutzt.

Reaktionsansatz für die Genotypisierung muriner AP-2 $\gamma$ -Allele:

10,0 $\mu$ l genomische DNS  
 1,0 $\mu$ l dNTPs (10mM)  
 1,0 $\mu$ l In4down (10 $\mu$ M)  
 1,0 $\mu$ l Ex5up (10 $\mu$ M)  
 1,0 $\mu$ l Ex6up (10 $\mu$ M)  
 5,0 $\mu$ l PCR-Puffer  
 2,5 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50mM)  
 0,2 $\mu$ l Platinum-Taq-Polymerase (5U/ $\mu$ l)  
 ad 50 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

Reaktionsprotokoll für die Genotypisierung muriner AP-2 $\gamma$ -Allele:

94°C, 2min  
 94°C, 45sec  
 55°C, 30sec  
 72°C, 1min

} x37

Reaktionsansatz für den Nachweis von Transkripten:

1,0 $\mu$ l cDNS  
 1,0 $\mu$ l dNTPs (10mM)  
 1,0 $\mu$ l Oligonukleotid-F (10 $\mu$ M)  
 1,0 $\mu$ l Oligonukleotid-R (10 $\mu$ M)  
 5,0 $\mu$ l PCR-Puffer  
 2,0 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50mM)  
 0,2 $\mu$ l Platinum-Taq-Polymerase (5U/ $\mu$ l)  
 ad 50 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

Reaktionsprotokoll für den Nachweis von Transkripten:

94°C, 2min  
 94°C, 45sec  
 55-62°C, 30sec  
 72°C, 45sec

} Anzahl der Zyklen siehe Tabelle 1

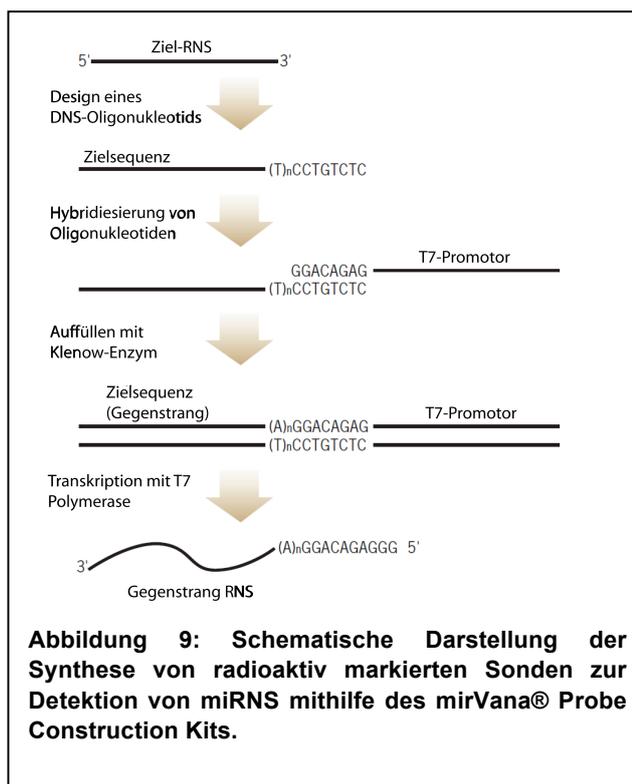
Transkript	Oligonukleotide	Annealing-Temperatur (°C)	Zyklenzahl	Produktgröße (bp)
β-Actin	mAct-F mAct-R	55	30	428
AFP (human)	hAFP-F hAFP-R	60	35	250
AP-2γ (murin)	mAP-2g-F mAP-2g-R	57	30	326
AP-2γ (human)	hAP-2g-F hAP-2g-R	60	25	240
Blimp1 (murin)	mBlimp-F mBlimp-R	58	30	320
Blimp1 (human)	hBLIMP-F hBLIMP-R	60	30	290
Boule (human)	hBUOLE-F hBOULE-R	60	30	210
Brachyury (murin)	mBrachyury-F mBrachyury-R	55	30	750
Dazl (murin)	mDAZL-F mDAZL-R	59	30	313
Dazl (human)	hDAZL-F hDAZL-R	60	25	210
GAPDH (human)	hGAPDH-F hGAPDH-R	60	20	336
Hoxb1 (murin)	mHOXB1-F mHOXB1-F	60	30	380
Hoxb1 (human)	hHOXB1-F hHOXB1-F	58	30	220
c-Kit (murin)	mKit-F mKit-R	55	30	536
MVH	MVH-F MVH-R	59	30	450
Nanos 3	mNanos3-F mNanos3-R	58	30	500
Nkx2.5	mNkx2.5-F mNkx2.5-R	55	35	249
Oct3/4 (murin)	mOct4-F m-Oct4-R	58	25	228
Oct3/4 (human)	hOCT4-F hOCT4-R	60	20	170

Prdm14 (murin)	mPrdm14-F mPrdm14-R	60	30	244
Prmt5 (human)	hPRMT5-F hPRMT5-R	60	30	400
Stella (murin)	mStella-F mStella-R	58	30	279
Vasa	hVASA-F hVASA-R	60	30	220

**Tabelle 1:** Übersicht über die Bedingungen für die Reverse Transkriptase-PCR und den resultierenden Produktgrößen. Alle Oligonukleotide für die RT-PCR wurden so ausgewählt, dass sie Intron-überspannend sind und somit die angegeben Produktgröße nur bei der Amplifikation der entsprechenden cDNS zu Stande kommen kann.

### 3.3.11 Synthese von radioaktiv markierten Sonden zur Detektion von miRNS

Zur Synthese von radioaktiv markierten RNS-Sonden zur Detektion von miRNS-Molekülen wurde das mirVana® Probe Construction Kit verwendet. Die Prozedur beruht darauf, dass zuerst ein DNS-Oligonukleotid (Template) designt wird, dass aus der Zielsequenz und einem 3'-CCTGTCTC-Anhang besteht. Dieser Anhang ermöglicht die Hybridisierung eines weiteren Oligonukleotids (T7 Promotor Primer) das aus der Promotor-Sequenz für die T7-Polymerase und einer dem 3'-Anhang des Templates komplementären Sequenz. Es folgt das Auffüllen der einzelsträngigen Bereiche mit dem Klenow-Enzym und eine anschließende Transkription mit der T7-Polymerase. Bei der Transkription wird das radioaktiv markierte Nukleotid [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-Cytidintriphosphat eingebaut (siehe Abb. 9).



Bei der Transkription wird das radioaktiv markierte Nukleotid [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-Cytidintriphosphat eingebaut (siehe Abb. 9).

Für die Herstellung von radioaktiv markierten Sonden wurden zunächst 2µl des Template-Oligonukleotids (100µM) mit 2µl des T7-Promotor Primers und 6µl Hybridisierung-Puffer gemischt und für 5min auf 70°C erhitzt. Das Gemisch wurde dann 5min auf RT abgekühlt.

Anschließend wurden 2µl dNTP-Mix, 2µl Klenow-Puffer, 2µl Klenow-Enzym und 4µl Nuklease-freies H<sub>2</sub>O hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 30min bei 37°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 5µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-Cytidintriphosphat, 2µl T7-Puffer, 2µl T7 Polymerase und jeweils 1µl UTP, GTP und ATP (jeweils 10mM) hinzugegeben, gemischt und für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die DNS-Oligonukleotide mit 1µl DNaseI für 10min bei 37°C abgebaut. Um die Sonde von nicht inkorporierten Nukleotiden zu befreien, wurden sie zunächst mit gleichen Volumen Ladepuffer gemischt und für 3min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde eine Acrylamid-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.3.13) durchgeführt und die Sonde aus dem Gel eluiert (siehe Kapitel 3.3.14).

### **3.3.12 Hybridisierung von radioaktiv markierten Sonden mit total-RNS-haltigen Lösungen**

Nach der Aufreinigung der radioaktiv markierten Sonden wurden diese mit total-RNS-haltigen Lösungen hybridisiert. Für diese Prozedere wurde das mirVana® Detection Kit benutzt. Dazu wurden 1µl der aufgereinigten Sonde, mit 5µg total-RNA, 2µl Hybridisierungspuffer gemischt und das Volumen mit Nuklease-freien H<sub>2</sub>O auf 20µl eingestellt. Das Gemisch wurde für 3min auf 95°C erhitzt und es folgte eine Inkubation über Nacht bei 42°C.

Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation des Reaktionsgemisches mit 150µl RNase-Puffer und 1,5µl RNaseA/RNaseT1 für 30min bei 37°C. Dabei erfolgt der enzymatische Abbau von einzelsträngigen RNS-Molekülen, die Sonde/Ziel-RNS-Duplex wird dabei nicht abgebaut. Anschließend wurden die RNasen durch Zugabe von 225µl RNase inactivation /PPT-Lösung inaktiviert. Durch Zugabe von 225µl 100%igen Ethanol und die Inkubation von 2h bei -20°C und anschließende Zentrifugation (20min, 13000rpm, 4°C) wurden die Nukleinsäuren präzipitiert und pelletiert. Der Überstand wurde abgezogen, das Pellet luftgetrocknet, in 5µl Lade-Puffer gelöst und anschließend für 3min bei 95°C denaturiert.

### **3.3.13 Acrylamid-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

Für die Größentrennung von kurzen Nukleinsäuren wurde ein Acrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt, da diese eine höhere Auflösung bietet als eine Agarose-Gelelektrophorese. Die verwendeten Gele hatten einen 15% Anteil an Acrylamid. Dazu wurden 23,98g Harnstoff, 5ml 10xTBE-Puffer, 25ml Acrylamid-Lösung (30%ig) gemischt. Anschließend wurden 250µl APS (10%ig) und 50µl TEMED hinzugegeben und das Gel gegossen.

Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde dieses in die Elektrophoreskammer eingespannt und mit 1xTBE-Puffer überschichtet. Die hitzedenaturierten Proben wurden in die Geltaschen geladen und es folgte eine vertikale Gelelektrophorese.

### **3.3.14 Elution von radioaktiv markierten Sonden aus Acrylamid-Gelen**

Nach der Synthese der radioaktiv markierten Sonden erfolgte Acrylamid-Gelelektrophorese, um die Sonde von nicht-inkorporierte Nukleotiden zu trennen. Nach der radiografischen Detektion der Sonde wurde der entsprechende Teil des Gels mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und für 45min bei 37°C in 300µl Elutions-Puffer inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgezogen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### **3.3.15 Detektion von miRNS**

Nach der Acrylamid-Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Elektrophoreskammer entnommen, in Frischhaltefolie eingepackt und eine Filmkassette eingelegt. Die Detektion der synthetisierten Sonde und der Sonde/Ziel-RNS-Duplex erfolgte auf Röntgenfilmen.

### **3.3.16 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)**

Die Chromatinimmunpräzipitation erlaubt es die Bindung eines Proteins an einer genomischen Region von Interesse nachzuweisen. Dabei werden die Proteine an der DNS kovalent gebunden und mithilfe magnetischer Partikel immunpräzipitiert. Danach werden die Proteine durch eine Protease von der DNS entfernt. Sollte das Protein an der genomischen Sequenz von Interesse gebunden haben, so wurde durch die Präzipitation der Sequenzabschnitt angereichert. Diese Anreicherung kann in der folgenden PCR nachgewiesen werden.

Für die ChIP wurde eine Einzellzellsuspension aus  $10^7$  Zellen erstellt und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 0,75%PFA resuspendiert und die Zellen für fixiert (10 min, RT, schütteln). Die Zellen werden anschließend pelletiert und das Formaldehyd mit Glycin (125mM) abgestoppt (5 min, RT, schütteln). Die Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit ChIP-Lysispuffer auf Eis für 30 min lysiert (750µl/ $10^7$  Zellen). Danach wurde das Lysat sonifiziert (Puls 30 sec/30 sec, 3 mal 5 min, in Eiswasser, DNS sollte in Fragmenten von 300- 500 bp Länge vorliegen). Anschließend wird das Lysat 30 sec bei

13000rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wird die Konzentration der sonifizierten DNS photometrisch bestimmt.

25µl der magnetischen Partikel (Beads) werden in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 1 min in den Magneten gespannt. Danach werden die Beads zwei mal mit 200 µl ChIP-Wasch- und Bindepuffer gewaschen und in den Magneten gespannt. Danach werden 5 µg des Antikörpers in 200 µl ChIP-Wasch- und Bindepuffer verdünnt und die Beads damit resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wird das Reaktionsgefäß wieder in den Magneten eingespannt und der Überstand abgenommen und das Pellet dreimal mit 200µl ChIP-Wasch- und Bindepuffer gewaschen. Die Beads werden nun in einem Volumen an Lysat, das 25 µg sonifizierter DNS entspricht, über Nacht bei 4° und Rotation inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird danach in den Magneten eingespannt und dreimal mit 1000 µl ChIP-Wasch- und Bindepuffer gewaschen in 100µl ChIP-Wasch- und Bindepuffer aufgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, danach in den Magneten eingespannt und der Überstand abgenommen.

Anschließend erfolgt die Elution mit 100 µl ChIP-Elutions-Puffer für 10 min und der Proteinase K Verdau mit anschließender Phenol:Chloroform Extraktion der DNS (s.o.)

Danach erfolgt die PCR zum Nachweis der Präzipitation der genomischen Region von Interesse.

## **3.4 Proteinanalytik**

### **3.4.1 Proteinisolation aus Gewebe und Zellen**

Tiefgefrorenes Gewebe oder pellettierte Zellen wurden in 1ml RIPA-Puffer (bei einer 10cm Zellkulturschale) lysiert und für 10min auf Eis inkubiert, währenddessen einige Male gevortext. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13000rpm für 10min. Der Überstand, der den Proteinextrakt enthält, wurde abgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **3.4.2 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen**

Die Protein-Konzentration wurde mittels des BCA Protein Assay Kit bestimmt. Dabei wurde streng nach Herstellerprotokoll verfahren. Nach dem Auslesen der Extinktionswerte der Eichgeraden konnte mittels einer Regressionsgleichung die Konzentration der Proben errechnet werden.

### 3.4.3 Immunpräzipitation

Mittels der Immunpräzipitation ist es möglich die Interaktion von Proteinen in Geweben oder Zellen nachzuweisen. Dazu werden Proteinextrakte hergestellt, die anschließend mit Antikörpern gegen das Protein von Interesse inkubiert. Die Antikörper wurden zuvor an supramagnetische Partikel gekoppelt und können so mit einem Magneten aus dem Proteinlysate extrahiert werden. Liegt eine Interaktion von zwei Proteinen vor, so wird der Proteinkomplex aus dem Gesamtlysate mit dem gekoppelten Antikörper extrahiert. Anschließend wird das Präzipitat einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und einem Western Blot unterzogen und das interagierende Protein detektiert.

25µl der magnetischen Partikel (Beads) werden in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 1 min in den Magneten gespannt. Danach werden die Beads zweimal mit 200 µl ChIP-Wasch- und Bindepuffer gewaschen und in den Magneten gespannt. Danach werden 5 µg des Antikörpers in 200 µl PBS verdünnt und die Beads damit resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wird das Reaktionsgefäß wieder in den Magneten eingespannt und der Überstand abgenommen und das Pellet dreimal mit 200µl PBS gewaschen. Die Beads werden nun 25µg Proteinlysate über Nacht bei 4° und Rotation inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird danach in den Magneten eingespannt, dreimal mit 1000 µl PBS gewaschen, in 100µl PBS aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wird das Reaktionsgefäß in den Magneten eingespannt und der Überstand abgenommen. Anschließend werden die Pellets in Lämmli-Puffer denaturiert und die magnetischen Partikel mithilfe des Magneten separiert. Der Überstand wird anschließend einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und einem Immunoblot unterzogen.

### 3.4.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung relativ großvolumiger Proteingemische bedarf einer Fokussierung in scharfen Zonen. Dies wird mithilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erreicht (Laemmli 1970). Im großporigen Sammelgel ordnen sich die SDS-Protein-Komplexe zwischen den vorauslaufenden Chloridionen und den Glyzin-Molekülen an. Beim Eintritt in das kleinporige Trenngel werden die Proteinproben zu einer scharfen Bande gestaucht. Glyzin erhält eine negative Gesamtladung und überholt die SDS-Protein-Komplexe, wodurch der Sammeleffekt aufgehoben wird. Die SDS-Protein-Komplexe trennen sich nun nach ihrer molekularen Masse auf.

Die Gelapparatur wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt und anschließend das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel

auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol dekantiert und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Währenddessen wurden die Proteinproben (20µg) in 4xLämmli-Probenpuffer denaturiert (10min, 95°C) und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden in das vorbereitete Gel geladen und anschließend bei 30mA elektrophoretisch aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurden 10%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet. Die verwendeten Trenn- und Sammelgele setzten sich wie folgt zusammen:

Trenngel (10%), :	Sammelgel (5%)
4,0 ml H <sub>2</sub> O	3,40 ml H <sub>2</sub> O
3,3 ml Acrylamid-Lsg (30%)	0,83 ml Acrylamid-Lsg (30%)
2,5 ml Tris-Puffer (1,5M, pH8,8)	0,63 ml Tris-Puffer (1M, pH6,8)
0,1 ml SDS (10%)	0,05 ml SDS (10%)
0,1 ml APS (10%)	0,05 ml APS (10%)
4,0 µl TEMED	5,00 µl TEMED

### 3.4.5 Immuno-Blot-Analyse (Western-Blot)

Proteine können nach elektrophoretischer Auftrennung mit der Methode des Elektrotransfers (Towbin et al. 1979) auf Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membranen übertragen (Western-Blot) und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Der Transfer wurde mit Hilfe einer Nassblot-Kammer durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde vor dem Transfer für 3min in Methanol aktiviert und anschließend für 2 min in Transferpuffer äquilibriert. Das SDS-Polyakrylamid-Gel wurde für 10min in Transferpuffer gewaschen und anschließend luftblasenfrei auf die PVDF-Membran gelegt. Auf beiden Seiten wurden jeweils zwei in Transferpuffer getränkte Whatmann-Papiere, sowie jeweils ein in Transferpuffer getränkter Schwamm platziert. Die Transfereinheit wurde anschließend so in die Kammer gestellt, dass die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zur Anode wandern und durch die hydrophoben Wechselwirkungen an die Membran binden konnten. Der Transfer wurde in gekühltem Transferpuffer über Nacht bei 30 V und 4°C durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Membran 5min in PBS geschwenkt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran für 1h bei RT in PBSMT geblockt. Dann wurde die Membran ü.N. bei 4°C mit einem spezifischen Primärantikörper (verdünnt in PBSMT) inkubiert. Nach Inkubation wurde die Membran dreimal für jeweils 5min mit PBST gewaschen. Der sekundäre, Peroxidase-gekoppelte Antikörper wurde 1:1000 in PBSMT

verdünnt und für 1h auf die Membran gegeben. Abschließend erfolgen drei Waschschrirte mit PBST für jeweils 5 min, bevor eine Chemiluminiszenz-Detektion durchgeführt wurde.

primär-Antikörper	Verdünnung	Inkubationsbedingungen
anti- $\beta$ -Actin	1:10000	1h, RT
anti-AP-2 $\gamma$	1:500	über Nacht, 4°C
anti-Blimp1	1:100	über Nacht, 4°C
anti-H2A/H4 R3me2	1:500	über Nacht, 4°C

### 3.4.6 Chemoluminiszenz-Detektion

Die an die Sekundärantikörper konjugierte Peroxidase katalysiert unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol. Als direktes Reaktionsprodukt entsteht eine elektronisch angeregte Form des 3-Aminophthalats, das bei Relaxion in den elektronischen Grundzustand Strahlung abgibt, die mittels Röntgenfilm detektiert. Die Chemolumineszenz-Reaktion wurde mit dem SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate durchgeführt. Die Membran wurde dazu für 2min in der Reaktionslösung inkubiert und anschließend in eine Fotokassette mit Röntgenfilm gelegt, der nach einer entsprechenden Expositionszeit entwickelt wurde.

### 3.4.7 Entfernen von Antikörpern von der PVDF-Membran (`strippen`)

Nach der Chemoluminiszenz-Detektion kann die PVDF-Membran mit den immobilisierten Proteinen einer weiteren Detektion mit Antikörpern unterzogen werden. Dafür wird die Membran 30min bei 60°C mit Stripping-Puffer gewaschen, um Reaktionslösung sowie Primär- und Sekundärantikörper zu entfernen. Nach der Inkubation mit Stripping-Puffer wurde die Membran zweimal für jeweils 10min mit PBST gewaschen und konnte anschließend wie gewohnt mit PBSTM geblockt werden.

## **3.5 Zellkultur**

### **3.5.1 Präparation, Kultivierung und Mitose-Inaktivierung von embryonalen Fibroblasten**

Fibroblasten (Feederzellen) wurden aus den Rümpfen von 14 Tage alten Embryonen gewonnen. 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 zerkleinert, zusätzlich mit einer Pipette noch mehrmals auf- und abpipettiert und anschließend bei 37°C für 30 min inkubiert. Danach wurden die Zellen durch ein Zellsieb vom übrigen Gewebe getrennt und in einem 50ml Blaudeckelröhrchen gesammelt. Es wurde Feedermedium zugegeben, 3 min bei 1200 rpm abzentrifugiert, in Feedermedium resuspendiert und auf 15 cm-Platten ausplattiert (etwa 1 Platte pro Embryo). Die Feederzellen wurden gesplittet, sobald die Zellkulturschale konfluent war. Durch die Behandlung der Feederzellen mit Mitomycin C (10 µg/ml) für 2 h im Inkubator bei 37°C wurde deren Proliferation gestoppt. Am folgenden Tag wurden die Feeder-Zellen trypsinisiert und aliquotiert.

### **3.5.2 Trypsinisieren und Vereinzeln von Zellen**

Zum Vereinzeln von Zellen auf der Kulturschale wurden die Zellen zunächst zweimal mit kaltem PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit Trypsin versetzt und für 3 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wird das Trypsin mit einer äquivalenten Menge an Medium abgestoppt und die Suspension 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Verwurf des Überstands wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert.

### **3.5.3 Bestimmung der Zellzahl**

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

entsprechend ausplattiert oder eingefroren werden.

#### **3.5.4 Einfrieren von Zellen**

Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen trypsinisiert, vereinzelt, gewaschen und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in einem geeigneten Volumen Einfriermedium aufgenommen und ü.N. bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff transferiert und gelagert.

#### **3.5.5 Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden schnell bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut, in Medium gewaschen und anschließend in einer entsprechenden Menge Medium aufgenommen und ausplattiert.

#### **3.5.6 Gelatinisieren von Zellkulturschalen**

Die Gewebekulturschalen und Platten wurden mit Gelatinelösung (0,1% in  $\text{H}_2\text{O}$ ) benetzt, kurz im Inkubator inkubiert und anschließend die Lösung wieder abgesaugt.

#### **3.5.7 Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES-Kultur)**

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

Die embryonalen Stammzellen wurden auf gelatinisierten Gewebekulturschalen auf einer Schicht embryonaler Feederzellen kultiviert und regelmäßig gesplittet. Zudem erfolgte täglich ein Mediumwechsel.

### **3.5.8 Trennung embryonaler Stammzellen von Feederzellen**

Zur Trennung der embryonalen Stammzellen von den Feederzellen wurden die Zellsuspension nach dem Trypsinisieren auf eine gelatinisierte Gewebekulturschale gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und in eine neue Schale überführt und erneut auf eine gelatinisierte Gewebekulturschale gegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 1 h bei 37°C enthält der Überstand nun zu 99% ES-Zellen, die jetzt zur Aggregation in embryonic bodies genutzt werden können.

### **3.5.9 Aggregation von ES-Zellen in Tropfenkulturen ('hangig drop culture')**

Zur Aggregation von ES-Zellen in Embryonic Bodies wurde eine ES-Zellsuspension mit der Konzentration von 30000 ES-Zellen/ml Medium in EB-Medium hergestellt. Anschließend wurden Tropfen von je 25 µl mit je 750 Zellen in den Deckel einer 15cm-Kulturschale aufgetropft und diese dann gekippt, so dass die Zellen durch Schwerkraft im unteren Bereich des 'hängenden Tropfens' ('hangig drop') sedimentieren und aggregieren können.

### **3.5.10 EB-Kultur zur Differenzierung von ES-Zellen in primordiale Keimzellen**

Nach drei Tagen der Aggregation der ES-Zellen in hängenden Tropfen wurden jeweils 15 EBs in einer 3cm nicht-adhärenenten Kulturschale zusammengeführt und weitere 6 Tage kultiviert. Dabei wird jeden zweiten Tag ein Drittel des Mediums abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

### **3.5.11 Zellseparation mit magnetischen Partikeln**

Die Zellseparation mit magnetischen Partikeln diente zur Fraktionierung der SSEA-1-positiven von der SSEA-1-negativen Zellpopulationen. Dabei wurden magnetische Partikel und Trennsäulen der Firma Miltenyi verwendet und sich streng an die Vorgaben des Herstellers gehalten.

Zuerst wurden die EBs eingesammelt und zweimal mit kalten PBS gewaschen. Danach folgte die Vereinzelung der Zellen. Dazu wurden die gewaschenen EBs für 4 min bei 37°C trypsinisiert. Nach Absättigung des Trypsins mit Medium wurden die Zellen durch ein Zellsieb (20µm Maschendurchmesser) in ein Blaukappenröhrchen pipettiert und gezählt.

Zu der Einzelzellsuspension wurden 5  $\mu$ l (0,1mg/ml) SSEA-1-Antikörper pro  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen hinzugegeben und die Suspension unter leichten Schütteln für 15 min bei 4°C inkubiert. Danach erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 2 ml MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen und Zentrifugation bei 1000 rpm für 10 min. Nach dem Dekantieren des Überstandes werden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert (80  $\mu$ l Puffer/ $10^7$  Zellen) und mit anti-Maus IgM MicroBeads (20  $\mu$ l Beads/ $10^7$  Zellen) gemischt und für 15 min unter leichten Schütteln bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit jeweils 2 ml MACS-Puffer pro  $10^7$  gewaschen und bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird danach in 500  $\mu$ l MACS-Puffer pro  $10^8$  Zellen resuspendiert und es erfolgte die magnetische Zellseparation nach Herstellerangaben mittels der MACS Column und dem MACS Separator. Dabei wird die SSEA-1-negative Zellfraktion zuerst isoliert und anschließend die SSEA-1-positive Zellfraktion aus den Säulen eluiert.

Beide Fraktionen werden gewaschen, pelletiert und für die RNA-Isolation verwendet.

### **3.5.12 Ablegen von Einzelzellsuspensionen auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger**

Allantoides oder EBs wurden zunächst zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin 5-7 min bei 37°C inkubiert und danach das Trypsin mit DMEM-BSA abgestoppt. Das Zellmaterial wurde im Anschluss mit der Pipette aufgelockert und vereinzelt. Die Einzelzellsuspension wurde dann auf Poly-L-Lysin beschichtete gegeben und in einer feuchten Kammer bei 4°C für 45-60 min stehen lassen. Der Überstand wird anschließend vorsichtig abgezogen und die Zellen mit 200  $\mu$ l 4% PFA für 30 min bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit kalten PBS gewaschen und weiter behandelt (siehe Kap. 3.6.5)

## **3.6 Histologische Analytik**

### **3.6.1 Fixierung**

Soweit nicht anders beschrieben wurden die Gewebe für 2 h bei 4°C in 4%-Paraformaldehyd inkubiert und anschließend dreimal für 10 min bei RT gewaschen.

### **3.6.2 Einbetten**

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

### **3.6.3 Herstellung von Paraffin-Schnitten**

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

### **3.6.4 Indirekte Immunfluoreszenz von AP-2γ auf Paraffin-Schnitten**

Die Schnitte wurden zuerst in Xylol (2x 10 min), danach in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (100%, 96%, 70%, jeweils 5 min) und in H<sub>2</sub>O überführt. Anschließend folgte die Antigendemaskierung in Citratpuffer in der Mikrowelle (5x 5min bei 500 W). Danach wurden die Schnitte 15 min mit Pferde-Serum bei RT geblockt und der Primärantikörper zugegeben (in 1:200 in PBSMT) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte für 5 min bei RT in PBS. Danach wurden die Schnitte mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RT (1:500 in PBSMT) inkubiert.

### **3.6.5 Permeabilisierung von Zellen**

Die fixierten Zellen wurden mittels 0,1% TritonX-100 in PBS für 30 sec permeabilisiert und anschließend dreimal mit PBS bei RT gewaschen.

### 3.6.6 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Proben wurden mit PBSMT für 1 h bei RT geblockt und danach dreimal für 5 min mit PBS bei RT gewaschen. Anschließend wurde der Primärantikörper zugegeben (siehe Tabelle) und bei entsprechenden Bedingungen inkubiert. Nach drei Waschschritten für 5 min bei RT in PBS erfolgte die Inkubation mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tabelle).

Ausgangsmaterial	Antikörper	Verdünnung in PBST	Inkubationszeit -temperatur
Zellen auf Objektträgern oder in 24 -well Platten	anti-AP-2 $\gamma$ : H-77	1:200	4°C, ü/N
	6E4/4	1:250	
	anti-Blimp1		4°C, ü/N
	anti-H2A/H4R3me2		4°C, ü/N
	anti-PRMT5		4°C, ü/N
	anti-SSEA-1	1:250	1 h, RT
	anti-Stella	1:250	4°C, ü/N
Embryonen	Sekundärantikörper	1:500	1 h, RT
	anti-AP-2 $\gamma$ : H-77	1:200	4°C, 4 d
	6E4/4	1:250	
	anti-Stella	1:250	4°C, 4 d
	Sekundärantikörper	1:500	4°C, 3 d

### 3.6.7 Nachweis apoptotischer Zellen in ganzen Embryonen mittels TUNEL-Assay

Frisch präparierte Embryonen wurden mit 4% PFA für 2 h bei 4°C fixiert und anschließend dreimal 10 min bei RT mit PBST gewaschen. Danach wurden die Embryonen für 5-6 h in 100%igen Methanol/30%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5:1) bei RT gebleicht und anschließend mittels einer absteigenden Methanol-Reihe (90%, 75%, 50%, 25%) rehydriert. Dann folgten 4 Waschschriffe á 10 min bei RT mit PBST. Anschließend wurde das Gewebe der Embryonen mit 20 $\mu$ g/ml Proteinase K in PBST für 3-5 min aufgelockert und die Embryonen 3 mal á 10 min bei RT in PBST gewaschen. Es folgte die Refixierung mit frisch angesetzten 0,2% Glutaraldehyd/4%PFA für 20 min bei RT mit anschließenden Waschschriffen (3x 10 min RT mit PBST). Die Embryonen wurden danach für 20 min bei RT in 0,1%igen NaBH<sub>4</sub> inkubiert.

Anschließend erfolgte das Equilibrieren in 1XTdT-Puffer für 20min bei 37°C, dann wurde der Überstand abgezogen und die Embryonen in 50 µl 1xTdT-Puffer, 20 µm Dig-dUTP, 20 µm dTTP und 0,3U/µl Terminaler Transferase für 3 h bei 37°C inkubiert. Nach 4 Waschschritten mit PBST (10 min bei RT) wurden die Embryonen in 0,5% BM-Block in PBT für 1 h bei RT geblockt und der Anti-DIG-Antikörper 1:5000 in BM-Block vorgeblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper bei 4°C über Nacht. Nach 6 Waschschritten (10 min, RT, PBST) erfolgte die Färbung der Embryonen in BM-Purple in PBST.

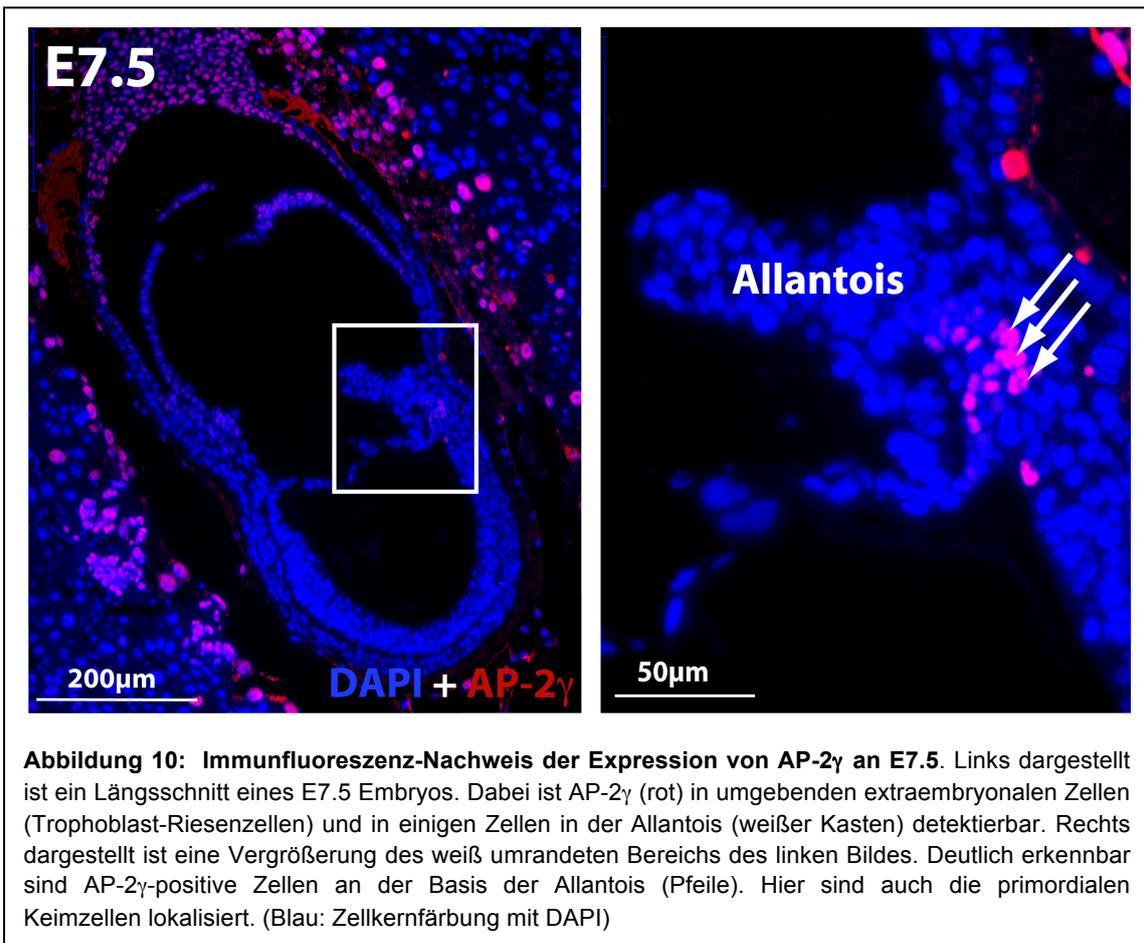
### **3.6.8 Nachweis von Apoptosen in ganzen Embryonen mittels LysoTracker**

Die Embryonen wurden in DMEM/BSA (DMEM ohne Phenolrot) präpariert und danach mit 5µl/ml LysoTracker in DEMEM/BSA für 45 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgten 5 Waschrritte á 5 min in kalten PBS und das Fixieren für 2 h bei 4°C in 4% PFA. Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt und die Embryonen 5mal in PBS gewaschen.

## 4 Ergebnisse

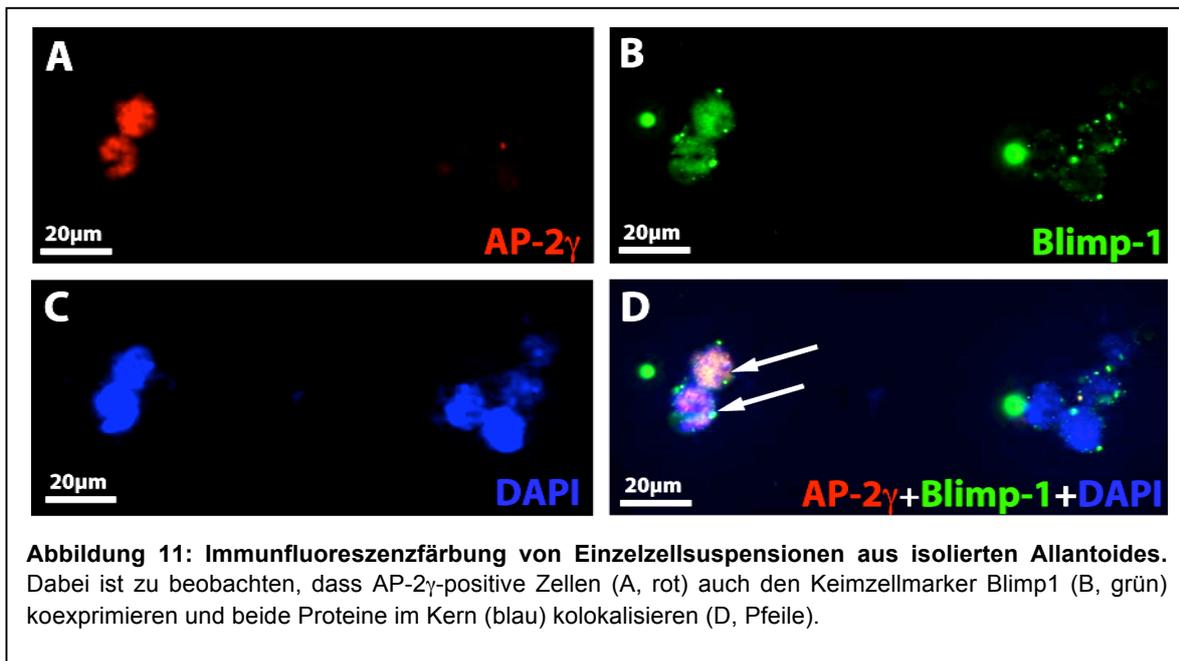
### 4.1 Expressionsmuster von AP-2 $\gamma$ während der Keimzellentwicklung

Die Spezifizierung der primordialen Keimzellen ist früh in der Embryogenese abgeschlossen (E7.0-7.5, siehe auch Kapitel 1.1.1.2). Die spezifizierten Zellen sind an der Basis der Allantois lokalisiert, in ihrem Transkriptom von den umgebenden somatischen Zellen abgegrenzt und exprimieren bereits viele der Keimzellmarker, wie Stella und Blimp1.



**Abbildung 10: Immunfluoreszenz-Nachweis der Expression von AP-2 $\gamma$  an E7.5.** Links dargestellt ist ein Längsschnitt eines E7.5 Embryos. Dabei ist AP-2 $\gamma$  (rot) in umgebenden extraembryonalen Zellen (Trophoblast-Riesenzellen) und in einigen Zellen in der Allantois (weißer Kasten) detektierbar. Rechts dargestellt ist eine Vergrößerung des weiß umrandeten Bereichs des linken Bildes. Deutlich erkennbar sind AP-2 $\gamma$ -positive Zellen an der Basis der Allantois (Pfeile). Hier sind auch die primordialen Keimzellen lokalisiert. (Blau: Zellkernfärbung mit DAPI)

Die PGCs müssen jedoch weiterhin von extrazellulären Differenzierungssignalen geschützt werden, was hauptsächlich durch Repression des somatischen Genprogramms durch Blimp1 geschieht. Neben der Blimp1-abhängigen Repression erfolgt aber auch eine Blimp1-abhängige Aktivierung von PGC-spezifischen Genen, wie z. B. von Stella, Prdm14 und c-Kit, die für die Keimzellentwicklung eine wichtige Rolle spielen. Auch das Transkript von AP-2 $\gamma$  scheint durch die Expression von Blimp1 positiv reguliert zu werden (Kurimoto et al. 2008), zudem weisen AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten bereits früh einen Keimzellverlust auf (Abb. 6) und sind steril (Dissertation Susanne Weber).

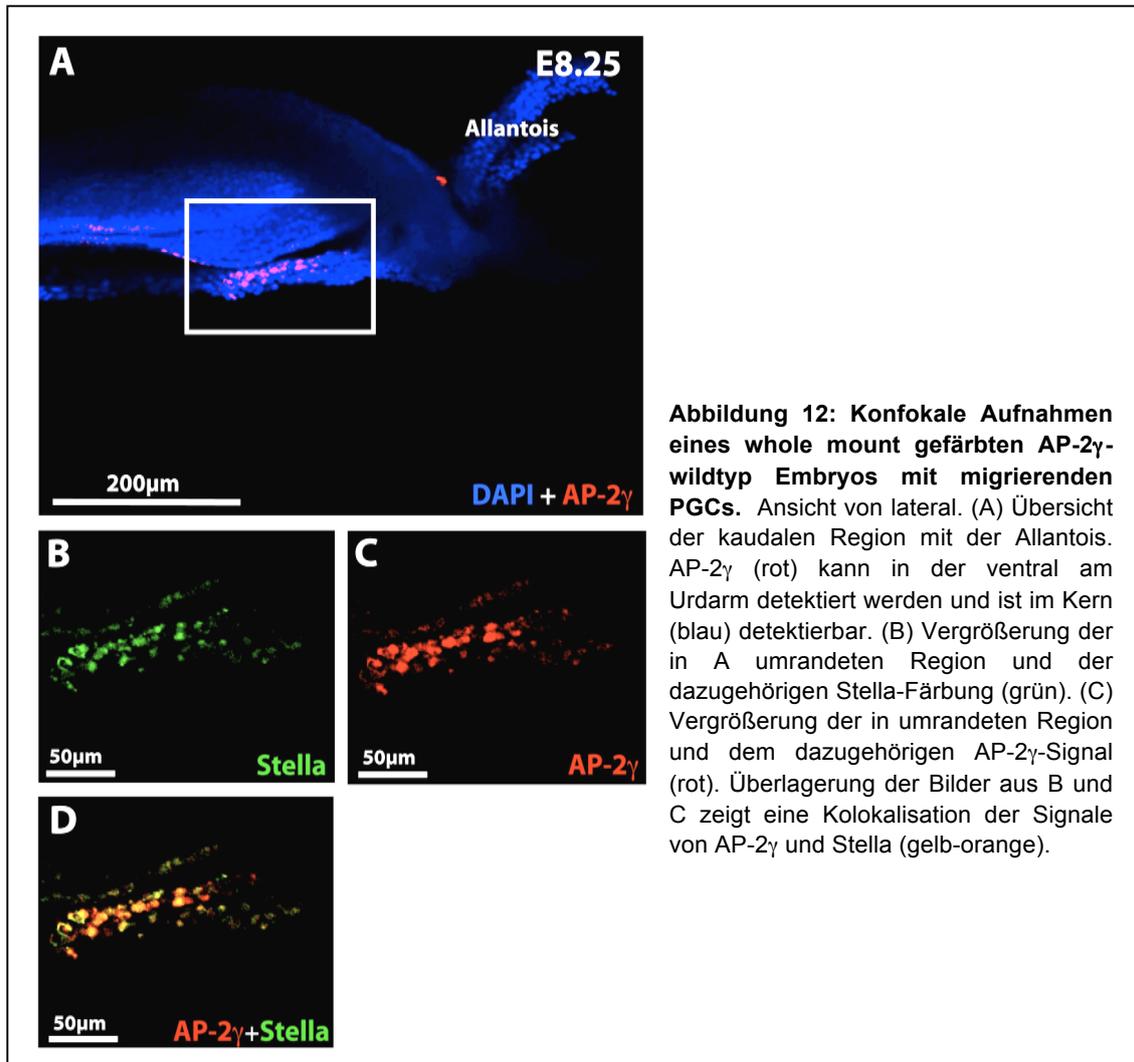


Um die Expression von AP-2 $\gamma$  in frühen embryonalen Stadien zu charakterisieren, wurden komplette Implantationen von E7.5 Embryonen fixiert und Paraffin-Schnitte gefärbt. Dabei konnte AP-2 $\gamma$  sowohl in Trophoblast-Riesenzellen, dem ekto-plazentalen Konus als auch in Zellen an der Basis der Allantois detektiert werden (siehe Abb. 10). Um eine genauere Aussage über den Zelltyp dieser AP-2 $\gamma$ -positiven Zellen an der Basis der Allantois zu treffen, wurden mittels Mikromanipulation die Allantoides von Embryonen des Stadiums E7.5 isoliert, die Zellen vereinzelt und auf Objektträgern angefärbt. Dabei konnte beobachtet werden, dass Zellen, die Blimp1 exprimieren, AP-2 $\gamma$  co-exprimieren. Zudem waren ausschließlich Blimp1-positive Zellen positiv für AP-2 $\gamma$  (siehe Abb. 11 D).

Nach der Spezifizierung der primordialen Keimzellen beginnen diese mit der Migration entlang des Urdarms in Richtung Genitalanlagen, die sie zwischen E10.5-11.0 erreichen. Auch während der Migrationssphase ist die Expression von AP-2 $\gamma$  (siehe Abb. 12 A, C) detektierbar, dabei kolokalisiert das Signal von AP-2 $\gamma$  mit dem Signal von Stella (siehe Abb. 12, D). Die Expression von AP-2 $\gamma$  bleibt bis E12.5 bestehen, also in post-migratorischen Keimzellen, die kurz vor der sexuellen Differenzierung stehen (E13.5) (Weber, Eckert *et al.* in Revision).

Die Beobachtungen, dass einerseits AP-2 $\gamma$  bereits in spezifizierten Keimzellen exprimiert wird und der Verlust beider AP-2 $\gamma$ -Allele bereits früh zu einem Verlust von alkalischer Phosphatase-positiven primordialen Keimzellen führen, lassen die Vermutung zu, dass der Transkriptionsfaktor AP-2 $\gamma$  bereits kurz nach der Spezifizierung eine essentielle Rolle in der

Keimzellbiologie hat. Dabei kommen zwei Möglichkeiten in Frage. Einerseits könnte der Verlust von AP-2 $\gamma$ , wie der von Dnd1, Oct3/4 oder Nanos3 zum Verlust der Keimzellen durch Apoptose führen, andererseits könnte AP-2 $\gamma$  die Keimzellen vor Differenzierung bewahren und somit eine Rolle in dem von Blimp1 regulierten Netzwerk zum Erhalt der Pluripotenz primordialer Keimzellen spielen.



#### 4.2 Untersuchungen zu apoptotischen Vorgängen in AP-2 $\gamma$ -defizienten PGCs

Sowohl die Nullmutanten von Oct3/4, als auch von Dnd1 und Nanos3 weisen einen Keimzellverlust auf. Dabei werden die defizienten primordialen Keimzellen durch apoptotische Vorgänge aus dem Organismus beseitigt. Nun könnte auch der Verlust beider AP-2 $\gamma$ -Allele zur Apoptose in primordialen Keimzellen führen. Um eventuelle apoptotische Vorgänge in AP-2 $\gamma$ -defizienten primordialen Keimzellen festzustellen, wurden die Embryonen entweder einem TUNEL-Verfahren unterzogen oder mit einer acidotropischen Färbelösung (LysoTracker) angefärbt.

Das TUNEL-Verfahren beruht darauf, dass während der Apoptose die DNS fragmentiert wird und deshalb Strangbrüche vorkommen, an die mittels des Enzyms Terminale Transferase markierte Nukleotide angehängt werden. Diese können anschließend mit einem Peroxidasegekoppelten Antikörper sichtbar gemacht werden.

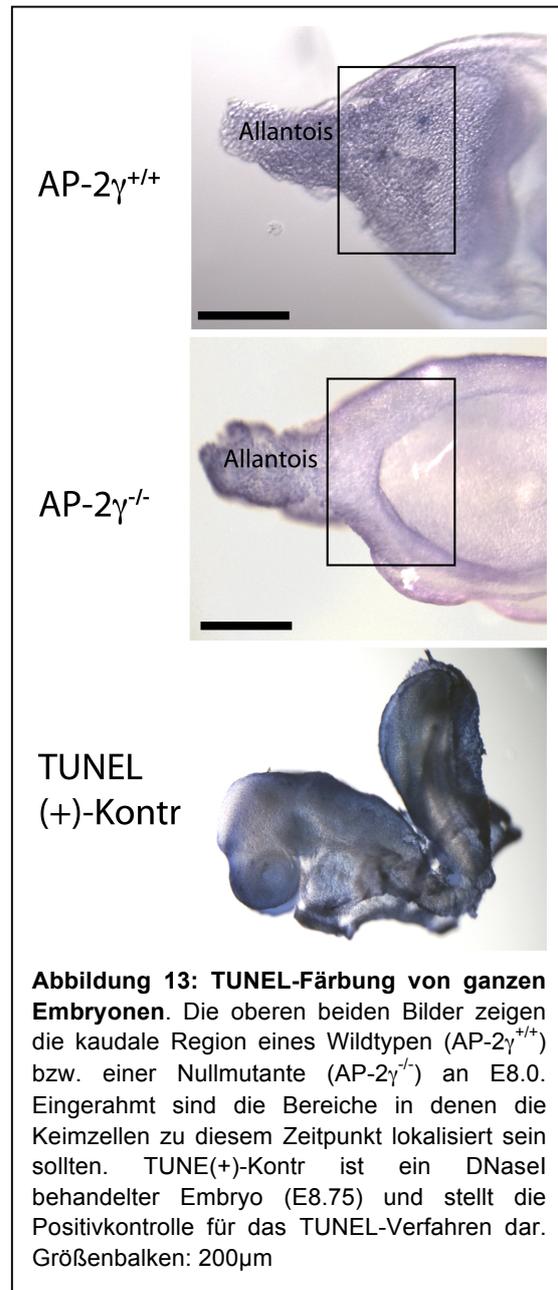
Für dieses Verfahren wurden Embryonen des Entwicklungsstadiums E8.0 benutzt, da ungefähr zu diesem Zeitpunkt nur noch wenige primordiale Keimzellen mittels alkalischer Phosphatase in den Nullmutanten detektiert werden können. Sollten die PGCs zu diesem Zeitpunkt das apoptotische Merkmal der DNS-Degradation aufweisen, sollten sie durch eine intensive und körnige Blau-Färbung detektierbar sein (siehe Abb. 13 positiv-Kontrolle).

Interessanterweise konnte durch das TUNEL-Verfahren keine intensive und körnige Blau-Färbung proximal von der Allantois beobachtet werden (siehe Abb. 13 eingerahmter Bereich). Die zu beobachtende Färbung wies zudem keinerlei Unterschied zwischen den Genotypen auf und stellt nur eine Hintergrundfärbung dar.

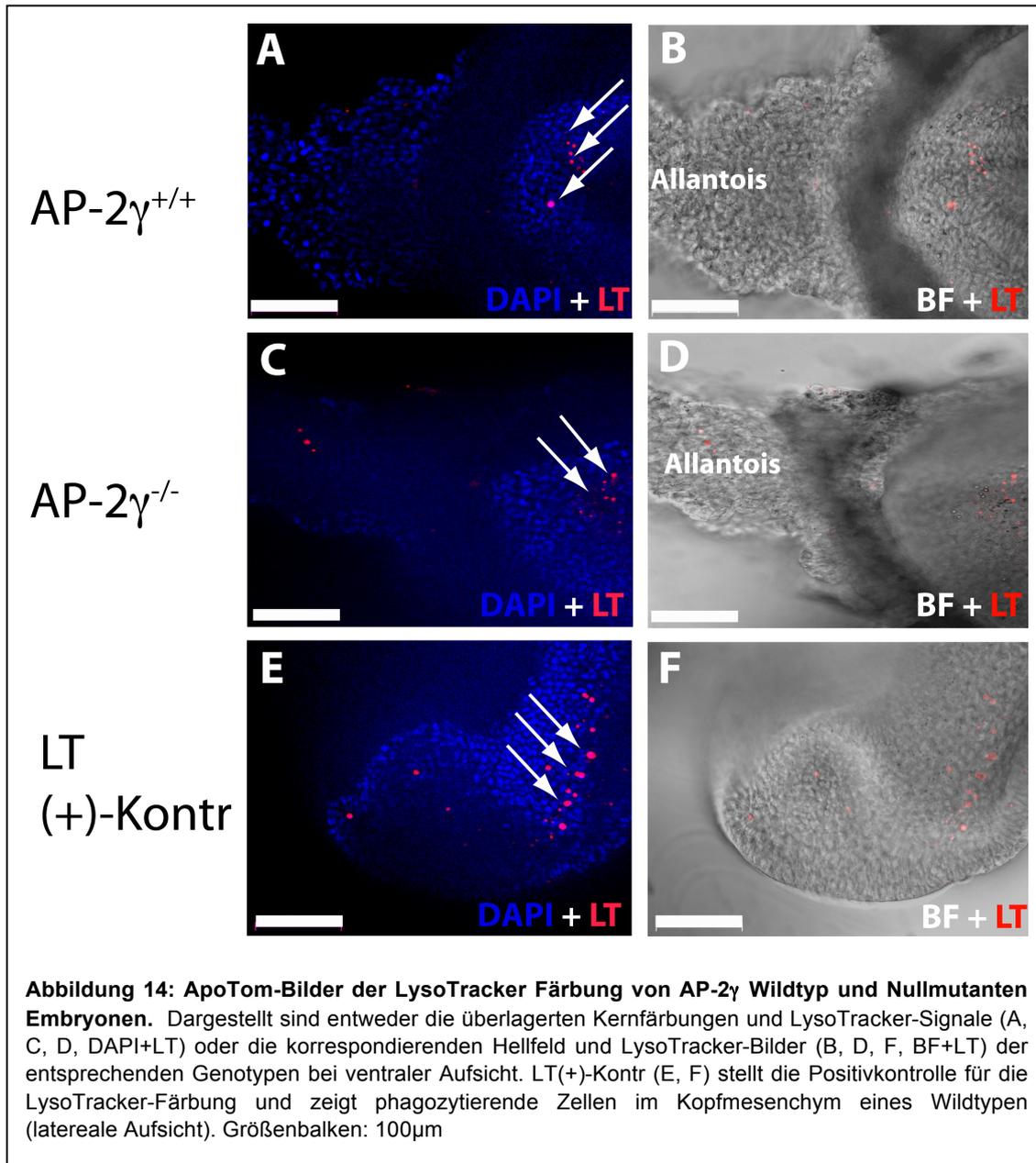
Um dieses Ergebnis des TUNEL-Verfahrens abzusichern, wurde zusätzlich eine Färbung der Lysosomen mittels des acidotropen

Farbstoffs LysoTracker durchgeführt. Diese Färbemethode erlaubt es, Aussagen über die Aktivität der Lysosomen zu machen. Während der Apoptose schrumpfen die Zellen und werden durch umliegende Zellen phagozytiert. Diese Phagozytose führt zu einer stark erhöhten lysosomalen Aktivität, die sich durch eine starke Rot-Färbung der Zellen durch den LysoTracker Farbstoff widerspiegelt. Auf diese Weise sind phagozytierende Zellen durch die Intensität der Färbung von nicht phagozytierenden Zellen gut unterscheidbar (Zucker et al. 1999).

Auch für die lysosomale Färbung mittels LysoTracker wurden Embryonen zum geeigneten Zeitpunkt (E8.0) präpariert und gefärbt. Jedoch zeigte auch die LysoTracker-Färbung



keinerlei Unterschiede zwischen Wildtypen und AP-2 $\gamma$ -Nullmutante. Beide zeigen eine starke Färbung einiger Zellen proximal zur Allantois (siehe Abb A-D, Pfeile). Dabei handelt es sich vermutlich um Zellen, die durch die Präparation beschädigte Zellen phagozytiert haben und deshalb eine hohe lysosomale Aktivität aufweisen. Als Positivkontrolle für die LysoTracker-Färbung diente das Kopfmesenchym dieser Embryonen, da hier während der Embryogenese Apoptose beschrieben ist (siehe Abb. 14, D,E Pfeile)



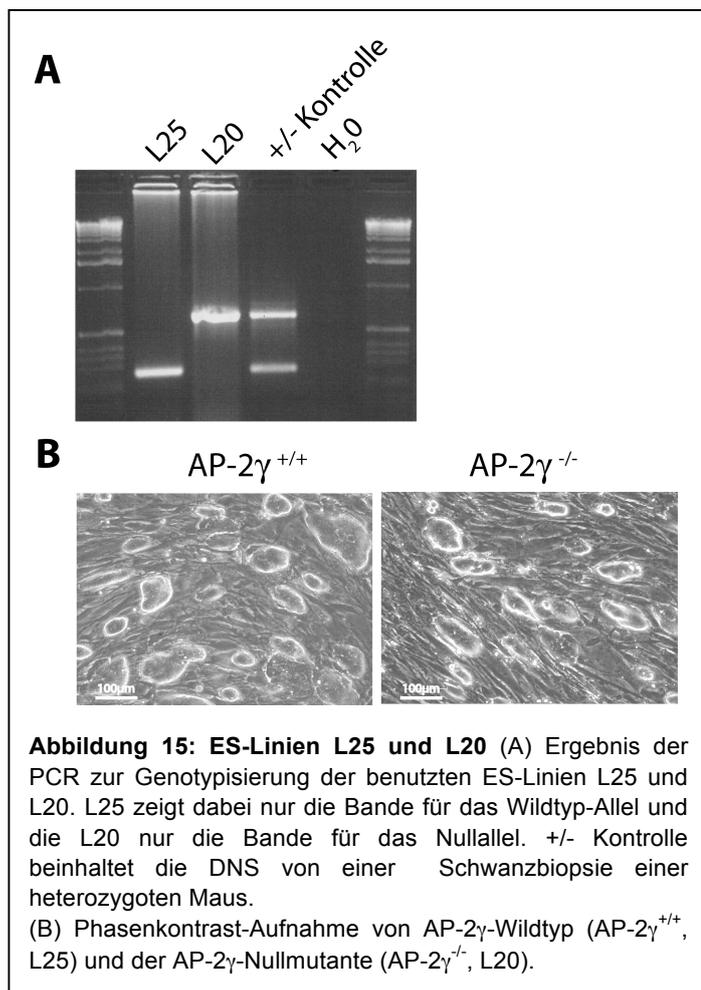
Somit konnte weder durch die TUNEL-Analyse noch durch die Anfärbung der Lysosomen eine erhöhte Apoptose-Rate in den Keimzellen der Nullmutanten detektiert werden und folglich ausgeschlossen werden.

### 4.3 *In vitro* Analysen zur Rolle von AP-2 $\gamma$ in der Keimzellbiologie

Aufgrund dessen, dass keine apoptotischen Vorgänge in den primordialen Keimzellen von AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten detektiert werden konnten, sind andere Mechanismen für den Keimzellverlust verantwortlich. Da aber zum Zeitpunkt des Keimzellverlustes die Zellpopulation sehr klein ist (ca. 100 Zellen) und diese Zellen zudem nicht *in vitro* kultiviert und expandiert werden können, gilt es geeignete *in vitro* Systeme zu benutzen, die Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen des Keimzellverlustes in AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten erlauben. Als geeignete Systeme kommen die spontane Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu primordialen Keimzellen und Keimzelltumorzelllinien in Frage. Dabei wären Zelllinien aus Seminomen oder IGCNUs am besten geeignet, da diese Tumore den Keimzellen in Genexpression und Morphologie sehr ähnlich sind.

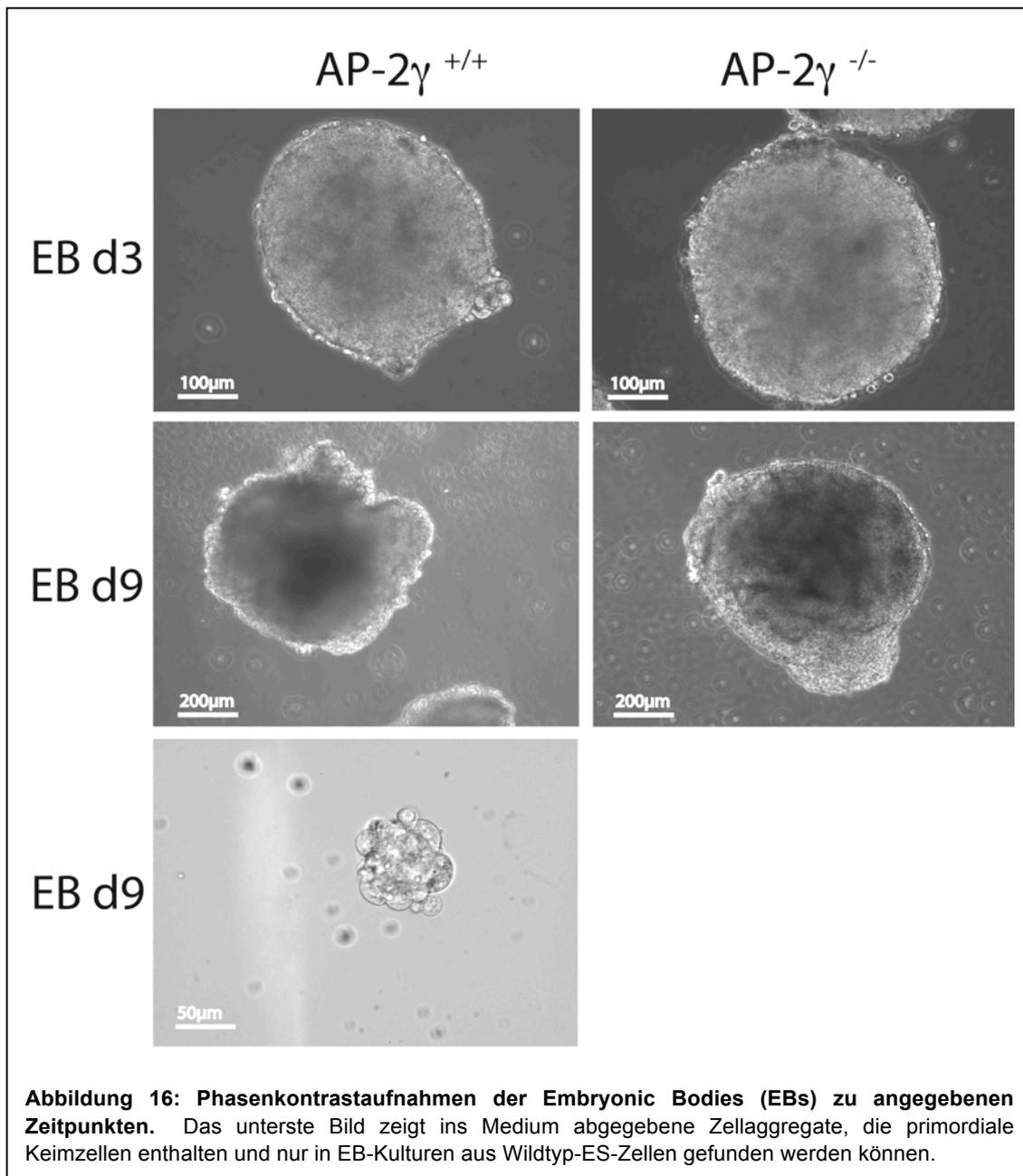
#### 4.3.1 *In vitro* Differenzierung von embryonalen Stammzellen in PGCs

Um neben der TCam-2 Zelllinie ein weiteres *in vitro* System zur Untersuchung der Rolle von AP-2 $\gamma$  in Keimzellen zur Verfügung zu haben, wurde das Verfahren der spontanen Differenzierung von embryonalen Stammzellen in primordiale Keimzellen genutzt. Durch die Aggregation der Embryonalen Stammzellen in Embryonic Bodies (EB) und die Wegnahme des zum Pluripotenz aufrechterhaltenden Faktor LIF bilden sich innerhalb der Aggregate Nischen aus, in denen die geeigneten Bedingungen für die Differenzierung von embryonalen Stammzellen in primordiale Keimzellen vorherrschen. Zur Aufklärung der Rolle von AP-2 $\gamma$  in primordialen Keimzellen wurden, im Labor etablierte, embryonale Stammzellen benutzt, die entweder



Wildtyp ( $AP-2\gamma^{+/+}$ , L25) oder  $AP-2\gamma$ -Nullmutanten ( $AP-2\gamma^{-/-}$ , L20) sind (siehe Abb. 15, A). Dabei unterscheiden sich beide Zelllinien morphologisch nicht und zeigen charakteristische Kolonien auf den Feeder-Zellen (siehe Abb. 15, B), was ein Hinweis dafür ist, dass der Verlust von  $AP-2\gamma$  die Etablierung und Erhaltung der ES-Zellen nicht beeinträchtigt.

Nachdem die Feeder-Zellen von den ES-Zellen depletiert worden sind, wurden die ES-Zellen unter entsprechenden Bedingungen (siehe Kap. 3.5.8) in hängenden Tropfen zu EBs aggregiert und insgesamt 9 Tage kultiviert.



Bei den entstandenen EBs sind, im Zeitraum von d3-d6 der Tropfen-Kulturen, keine morphologischen Unterschiede feststellbar (siehe Abb. 16). Ab d7 ist jedoch zu beobachten, dass einige der EBs beginnen rhythmische Kontraktionsbewegungen auszuführen, wobei der

Anteil dieser `schlagenden EBs` in den aus AP-2 $\gamma$ <sup>-/-</sup>-ES-Zellen aggregierten EBs höher ausfällt als bei den aus AP-2 $\gamma$ <sup>+/+</sup>-ES-Zellen (15% gegen 3%, siehe Abbildung 17). Im weiteren Verlauf der Differenzierung nimmt die Anzahl der schlagenden EBs zu und zum Zeitpunkt d9 liegt der Anteil der kontraktilen EB bei den AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten bei 62%, bei den Wildtypen jedoch bei 16% (siehe Abb. 17). Die Ausbildung von kontraktilen Strukturen ist ein Hinweis für Myokarddifferenzierungen und soll später noch einmal genauer untersucht werden.

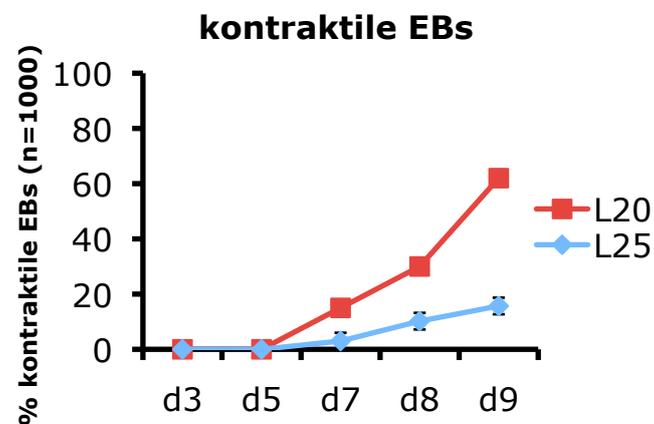
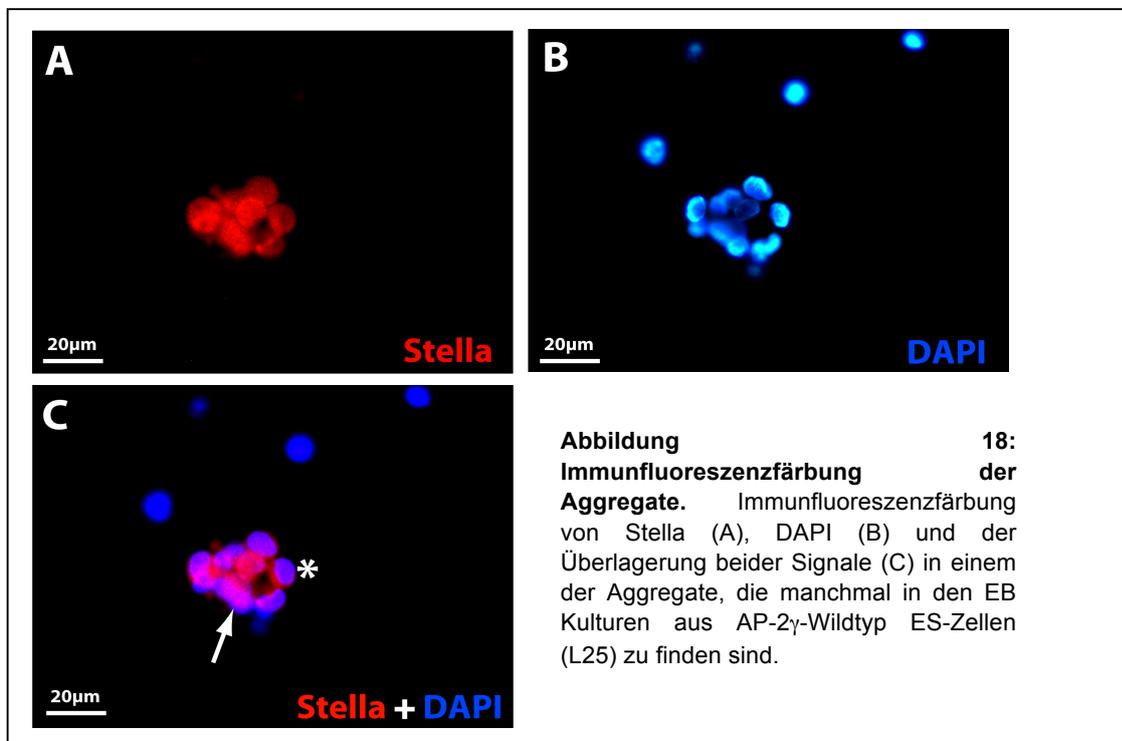


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Anteile an kontraktilen EBs in Prozent zu den angegebenen Zeitpunkten der Differenzierung.

Zudem fallen ab d8 in den aus AP-2 $\gamma$ <sup>+/+</sup>-ES-Zellen generierten EBs einige kleine



Zellaggregate auf, die in den Nullmutanten nicht vorzufinden sind (siehe Abb. 16 unten und Abb. 18).

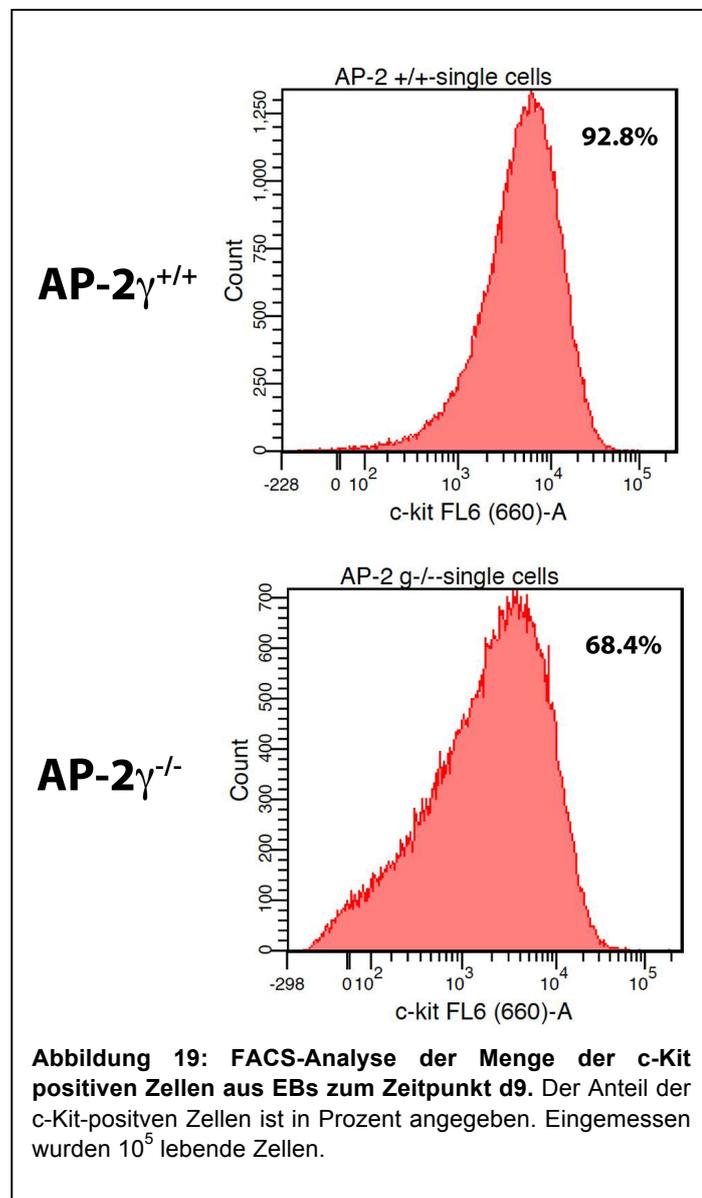
Die Immunfluoreszenzanalyse zeigt, dass einige Zellen dieser Aggregate Stella exprimieren und dabei sowohl eine kernständige (Abb. 18 C, Pfeil) als auch eine zytoplasmatische Lokalisation des Proteins (Abb. 18 C, Stern) vorliegt.

Diese Aggregate sind für die spontane Differenzierung von ES-Zellen in primordiale Keimzellen charakteristisch und stellen laut Literatur Aggregate aus postmigratorischen Keimzellen und somatischen Zellen dar, die aus den EBs migrieren können (Hubner et al. 2003; Kerkis et al. 2007).

#### 4.3.1.1 SSEA-1 als Oberflächenmarker für PGCs in EB-Kulturen

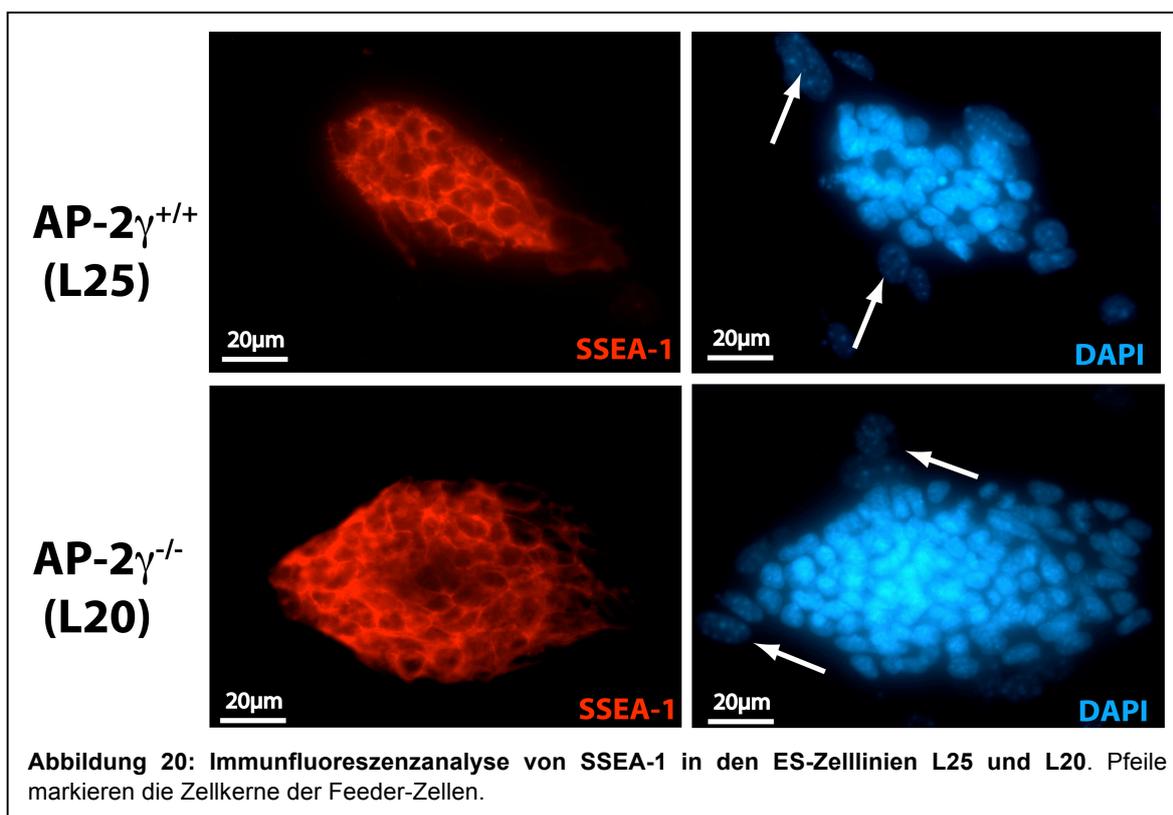
Da die verwendete Differenzierung von embryonalen Stammzellen in EBs unkontrolliert verläuft, differenzieren die Stammzellen in viele verschiedene Zelltypen. Deshalb ist es zwingend notwendig, die Zellfraktion von Interesse aus den EB-Kulturen anzureichern bzw. von den übrigen Zellen zu trennen, um weitere Analysen durchführen zu können. Dazu sollte ein keimzellspezifischer Marker zur Selektion benutzt werden. Hierzu wären Oberflächenantigene, die von Antikörpern erkannt werden können und es somit erlauben die gewünschte Zellfraktion aus dem Zellgemisch zu isolieren, am besten geeignet.

Als mögliche Oberflächenantigene kommen hier c-Kit oder SSEA-1 in Frage, die beide auf der Oberfläche von primordiales Keimzellen exponiert werden (Marani et al. 1986; Godin et al. 1991). Eine FACS-Analyse von



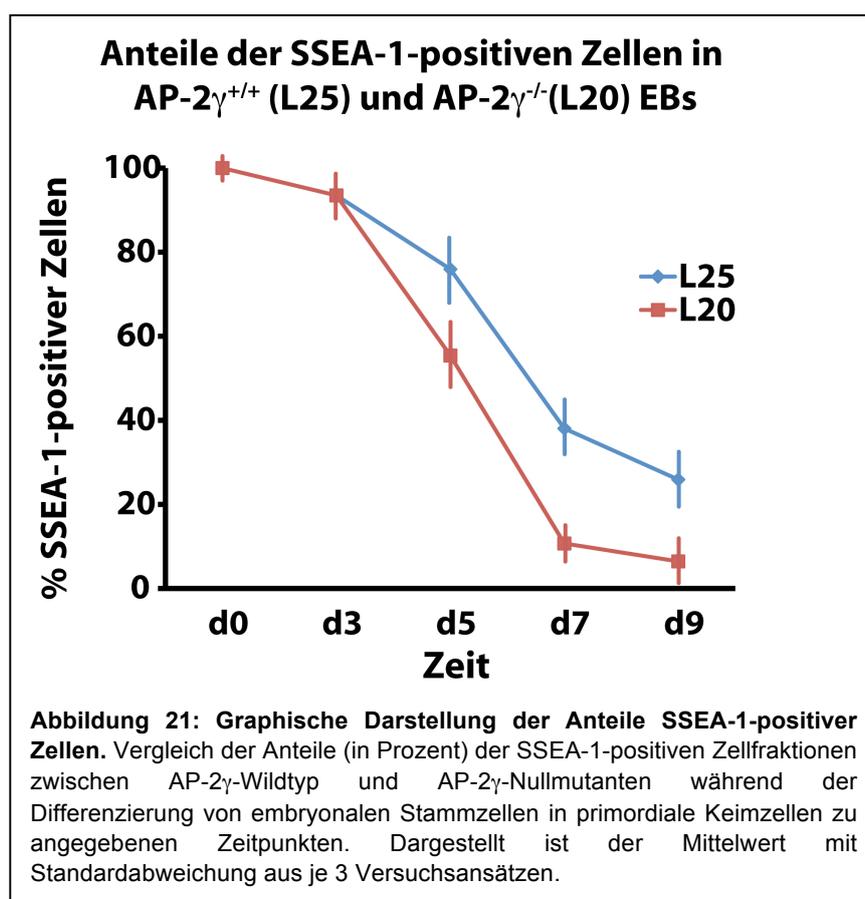
Einzelzellsuspensionen aus EB-Kulturen (d9) zeigte, dass 92,8% der aus AP-2 $\gamma^{+/+}$  ES-Zellen

differenzierten Zellen sind noch positiv für c-Kit. Bei den, aus  $AP-2\gamma^{-/-}$  ES-Zellen differenzierten, Zellen beträgt der Anteil der c-Kit-positiven Zellen hingegen noch 68,4% (siehe Abb. 19). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, durch den Verlust von  $AP-2\gamma$  es zu einer signifikanten Reduktion von c-Kit-positiven Zellen kommt. Aufgrund dessen, dass die Differenzierung von ES-Zellen in primordiale Keimzellen unkontrolliert verläuft und c-Kit zudem *in vivo* in vielen verschiedenen Zelltypen, wie den interstitiellen Zellen von Cajal (Beckett et al. 2003), in Mastzellen (Yamazaki et al. 1994), in neuronalen Vorläufern (Hirata et al. 1993; Hirata et al. 1995), in hämatopoetischen Vorläufern (Andre et al. 1989) und anderen Zelltypen exprimiert wird kann von diesem Ergebnis jedoch nicht geschlossen werden die Differenzierung der ES-Zellen in primordiale Keimzellen durch die  $AP-2\gamma$ -Mutation beeinträchtigt wird. Somit kann c-Kit als geeignetes Oberflächenantigen ausgeschlossen werden und deshalb andere Marker in Betracht gezogen werden müssen.



SSEA-1 zeigt bereits in der murinen Embryogenese ein deutlich distinkteres Expressionsmuster als c-Kit. Außer in primordialen Keimzellen ist die Expression von SSEA-1 im neuralen Ektoderm, der Neuralleiste und einigen Zellen in Nierentubuli detektierbar (Fox et al. 1981). Zudem gilt SSEA-1 als Oberflächenmarker für embryonale Stammzellen (Kimber et al. 1993) und wird in allen Zellen, die für die Differenzierung benutzt, ES-Zelllinien L25 und L20 exprimiert (siehe Abb. 20). Dabei ist ein membranständiges SSEA-1-Signal in allen embryonalen Stammzellen einer Kolonie detektierbar; die Feeder-Zellen sind negativ (siehe Abb. 20, Pfeile).

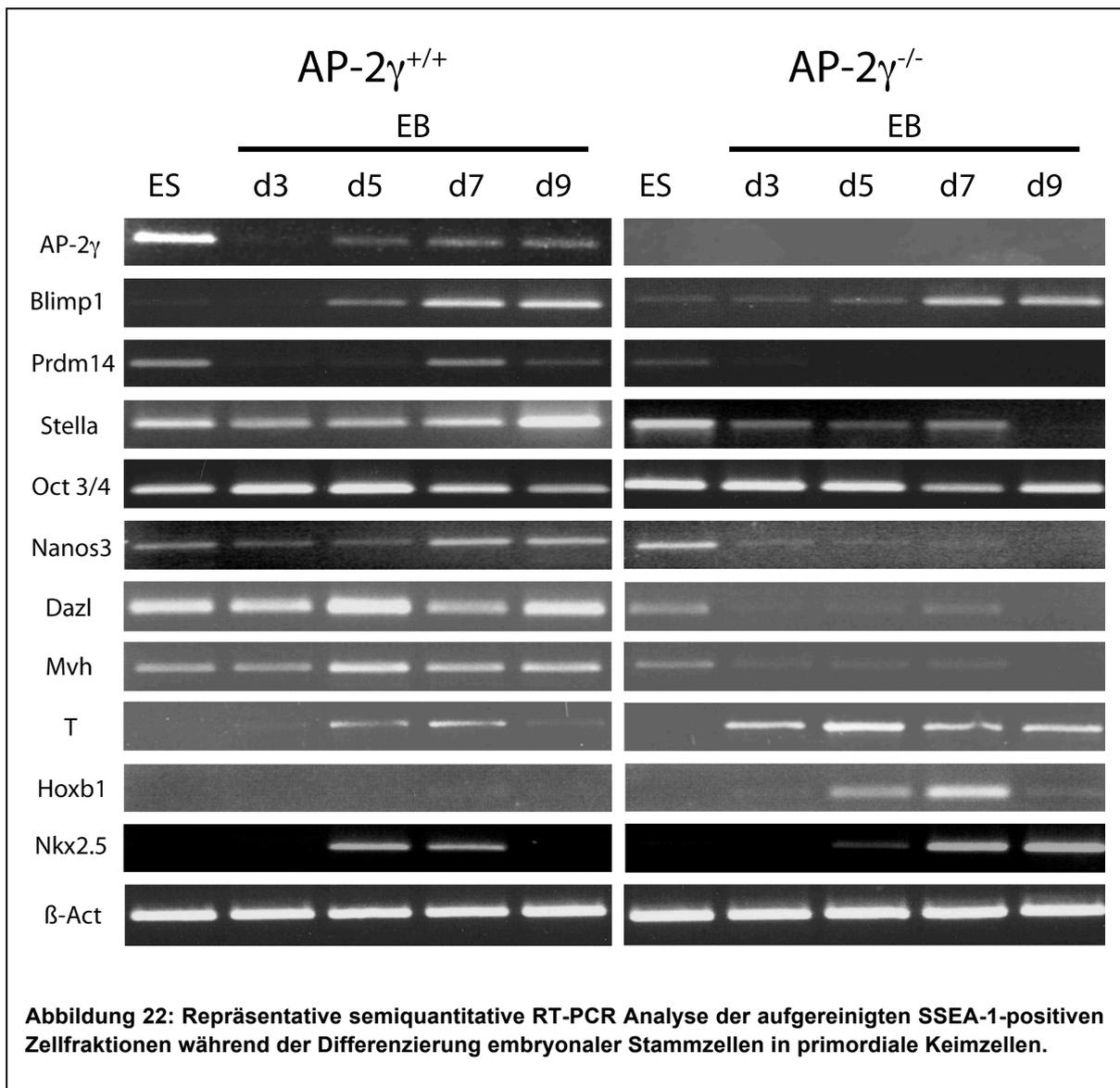
Um die Anteile der SSEA-1-positiven Zellfraktion zu bestimmen, wurden die SSEA-1-positiven Zellen mittels supramagnetischer Partikel von den SSEA-1-negativen Zellen separiert. Dabei zeigte sich, dass zwischen den AP-2 $\gamma^{+/+}$  und den AP-2 $\gamma^{-/-}$  Zellen ab d5 deutliche Unterschiede in den Anteilen der SSEA-1-positiven zu beobachten sind. Haben sowohl die beiden ES-Linien (100%, siehe auch Abb. 20) als auch die EBs an d3 (beide 94%, siehe Abb. 25) noch gleiche Anteile an SSEA-1-positiven Zellen, so beginnt sich ab d5 der Differenzierung ein Unterscheid herauszukristallisieren. An d5 zeigen die AP-2 $\gamma^{+/+}$ -EBs noch einen Anteil von 75% an SSEA-1-positiven Zellen, während in den AP-2 $\gamma^{-/-}$ -EBs nur noch 54% der Zellen SSEA-1-positiv sind. Auch im weiteren Verlauf der Differenzierung der embryonalen Stammzellen in primordiale Keimzellen ist diese Diskrepanz zwischen den Genotypen festzustellen. Zum Endpunkt der Versuchsreihe sind in den AP-2 $\gamma^{+/+}$ -EBs noch 25%, in den AP-2 $\gamma^{-/-}$ -EBs hingegen nur noch 6,5% der Zellen SSEA-1-positiv (siehe Abb. 21). Aufgrund der Tatsache, dass die Anteile an SSEA-1-positiven Zellen deutlich geringer sind als die der c-Kit-positiven, ist SSEA-1 ein geeigneter Marker für die Anreicherung der *in vitro* differenzierten primordialen Keimzellen.



Die Ergebnisse dieser Experimente lassen die Schlussfolgerung zu, dass unter exakt gleichen Bedingungen die Differenzierung der ES-Zellen innerhalb der EBs unterschiedlich verläuft und für den Unterschied der AP-2 $\gamma$ -Genotyp verantwortlich zu sein scheint.

#### 4.3.1.2 Unterschiede in den Expressionsprofilen zwischen AP-2 $\gamma$ <sup>+/+</sup> und AP-2 $\gamma$ <sup>-/-</sup> Zellen

Um Hinweise auf die Rolle von AP-2 $\gamma$  in der Keimzellbiologie zu bekommen, wurde ein Expressionsprofil der SSEA-1-positiven Zellfraktionen mittels RT-PCR erstellt. Dazu wurden die EBs beider Genotypen vereinzelt, die SSEA-1-positive Fraktion mittels supramagnetischer Partikel isoliert und die cDNS aus diesen Zellen synthetisiert. Anschließend wurde das Expressionsmuster keimzellspezifischer Gene während der *in vitro* Differenzierung untersucht.



**Abbildung 22: Repräsentative semiquantitative RT-PCR Analyse der aufgereinigten SSEA-1-positiven Zellfraktionen während der Differenzierung embryonaler Stammzellen in primordiale Keimzellen.**

Die semiquantitative RT-PCR-Analyse zeigt, dass bereits die ES-Zellen (sowohl AP-2 $\gamma$ <sup>+/+</sup> als auch AP-2 $\gamma$ <sup>-/-</sup>) interessanterweise die Expression von Keimzellmarkern zeigen. So werden die frühen Keimzellmarker Blimp1, Prdm14, Stella, Nanos3 in geringen Mengen exprimiert, wobei die Expression von Blimp1 und Prdm14 in den AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten geringer ist als in

den AP-2 $\gamma$ -Wildtypen, die Expression von Stella und Nanos3 hingegen in den Nullmutanten höher als in den Wildtypen ist. Auch die Expression von Markern für postmigratorische Keimzellen wie Dazl und Mvh ist in beiden Zelllinien vorzufinden und fällt jedoch in den AP-2 $\gamma^{+/+}$  Zellen höher aus als in den AP-2 $\gamma^{-/-}$  Zellen.

Interessanterweise wird AP-2 $\gamma$  in den embryonalen Stammzellen (nur AP-2 $\gamma^{+/+}$ ) exprimiert und zeigt hier sogar den höchsten Expressionslevel während der gesamten EB-Kultur. Jedoch scheint die Expression in den ES-Zellen keinen Einfluss auf die Morphologie und die Etablierung und Erhaltung dieser zu haben (siehe auch Kap. 4.3.1). Die Expression von AP-2 $\gamma$  nimmt während der EB-Differenzierung zunächst ab und ist an d3 nicht detektierbar. Im weiteren Verlauf der EB-Kultur nimmt die Expression jedoch wieder zu (d5) und scheint in ein Plateau überzugehen (d7+d9).

Ähnlich verhält es sich im Verlauf der EB-Kultur mit dem Expressionssignal von Blimp1, dass in den ES-Zellen nur schwach ist und an d3 nicht (AP-2 $\gamma^{+/+}$ ) oder kaum (AP-2 $\gamma^{-/-}$ ) detektiert werden kann. Zum Zeitpunkt d5 steigt die Expression von Blimp1 in den Wildtyp-Zellen, während sie in den Nullmutanten im Vergleich zum Zeitpunkt d3 gleich bleibt. Mit Erreichen des Tages 7 (d7) der EB-Kultur steigt die Expression von Blimp1 in AP-2 $\gamma^{+/+}$  und AP-2 $\gamma^{-/-}$  EBs an und persistiert bis d9, wobei sich die Signalstärke zwischen Wildtyp und Nullmutante nicht unterscheidet.

Die Expression von Prdm14 und Nanos3 ist in AP-2 $\gamma^{+/+}$  und AP-2 $\gamma^{-/-}$  ES-Zellen detektierbar, sie nimmt jedoch in den Nullmutanten schnell ab und kann im weiteren Verlauf der EB-Kultur nicht mehr (Prdm14) oder kaum noch (Nanos3) detektiert werden. In den Wildtypen ist jedoch ein Anstieg der Transkription beider Gene ab d7 detektiert und erreicht zu diesem Zeitpunkt ein Plateau.

Die beiden untersuchten Marker für postmigratorische Keimzellen Dazl und Mvh werden in den AP-2 $\gamma^{-/-}$ -Zellen herunterreguliert und zeigen bis d7 nur eine geringe Expression, die an d9 nicht mehr detektiert werden kann. Hingegen können in den AP-2 $\gamma^{+/+}$ -Zellen beide Transkripte über den gesamten Zeitraum der EB-Kultur detektiert werden, wobei an d9 die Expression am höchsten ist.

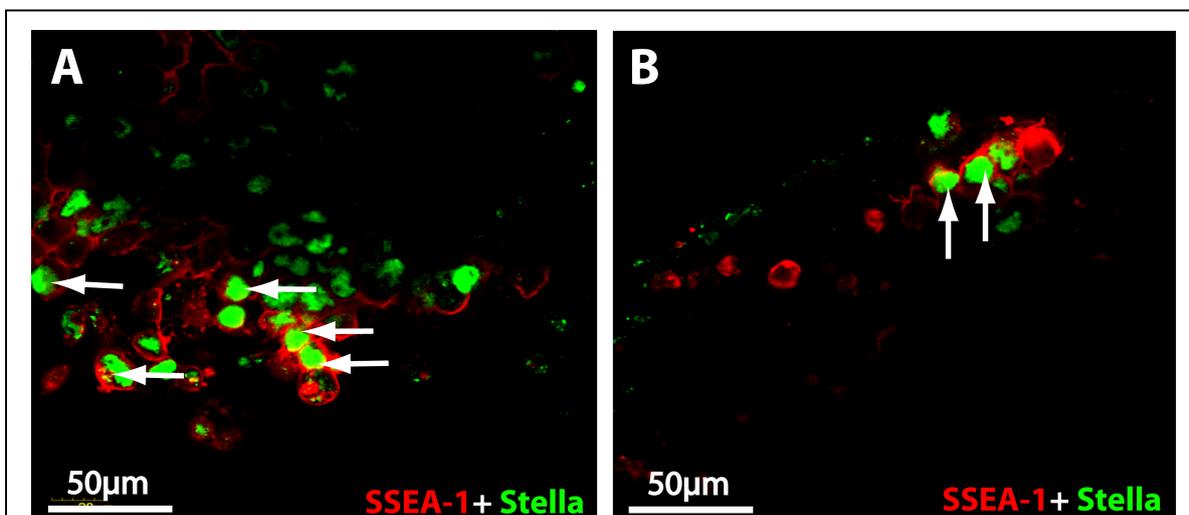
Zu beobachten ist auch die Expression des mesodermalen Markers T (Brachyury), der ab d3 sowohl in den Wildtypen als auch in den Nullmutanten detektiert werden kann. Hier ist jedoch die Expression in den AP-2 $\gamma^{-/-}$ -Zellen bereits an d3 höher als in den AP-2 $\gamma^{+/+}$ -Zellen und ist bis d9 detektierbar. Zu diesem Zeitpunkt ist in den AP-2 $\gamma^{+/+}$ -Zellen eine Expression von Brachyury kaum noch zu detektieren.

Vergleicht man das Expressionsmuster von Hoxb1 zwischen AP-2 $\gamma^{+/+}$  und AP-2 $\gamma^{-/-}$  -Zellen, so ist auch hier ein Unterschied feststellbar. Während in den Wildtyp-Zellen die Expression über die gesamte Dauer der EB-Kultur nicht detektiert werden, ist diese in den AP-2 $\gamma$ -

Nullmutanten-Zellen ab d3 zu beobachten. Dabei erreicht sie den höchsten Level an d7 der EB-Kultur und nimmt im weiteren Verlauf ab.

Aufgrund der bereits erwähnten Unterschiede in den Anteilen an kontraktile EBs während der Kultivierung (siehe Kap. 4.3.3) wurde das Expressionslevel von Nkx2.5, einem Marker für Vorläufer von Kardiomyozyten (Kasahara et al. 1998), bestimmt. Vergleicht man nun die Expression dieses Markers zwischen AP-2 $\gamma^{+/+}$  und AP-2 $\gamma^{-/-}$ -Zellen, so stellt man fest, dass die Expression sowohl in den Wildtypen, als auch in den Nullmutanten zum Zeitpunkt d5 beginnt. Hier ist der Expressionslevel in den Wildtypen zwar höher, jedoch nur über einen Zeitraum zwischen d5 und d7 detektierbar. In den AP-2 $\gamma^{-/-}$ -Zellen kann die Expression Nkx2.5 jedoch bis d9 detektiert werden und ist generell höher.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl in AP-2 $\gamma^{+/+}$  als auch in AP-2 $\gamma^{-/-}$ -EBs während der Kultur Keimzellmarker exprimiert werden und somit eine Differenzierung von ES-Zellen zu primordialen Keimzellen in den EBs erfolgt und diese aufgrund der Blimp1-Expression zwischen d5 und d7 initiiert wird. Jedoch zeigen die AP-2 $\gamma^{-/-}$ -Zellen im Verlauf der Differenzierung einen Verlust der Keimzellmarker wie Stella, Prdm14, Nanos3, Mvh und Dazl. Zudem zeigen die AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten eine Expression des somatischen Markers Hoxb1 und eine verlängerte und deutlich stärkere Expression des mesodermalen Markers Brachyury und von Nkx2.5, eines Markers für Kardiomyozytenvorläufer (siehe Abb. 22).



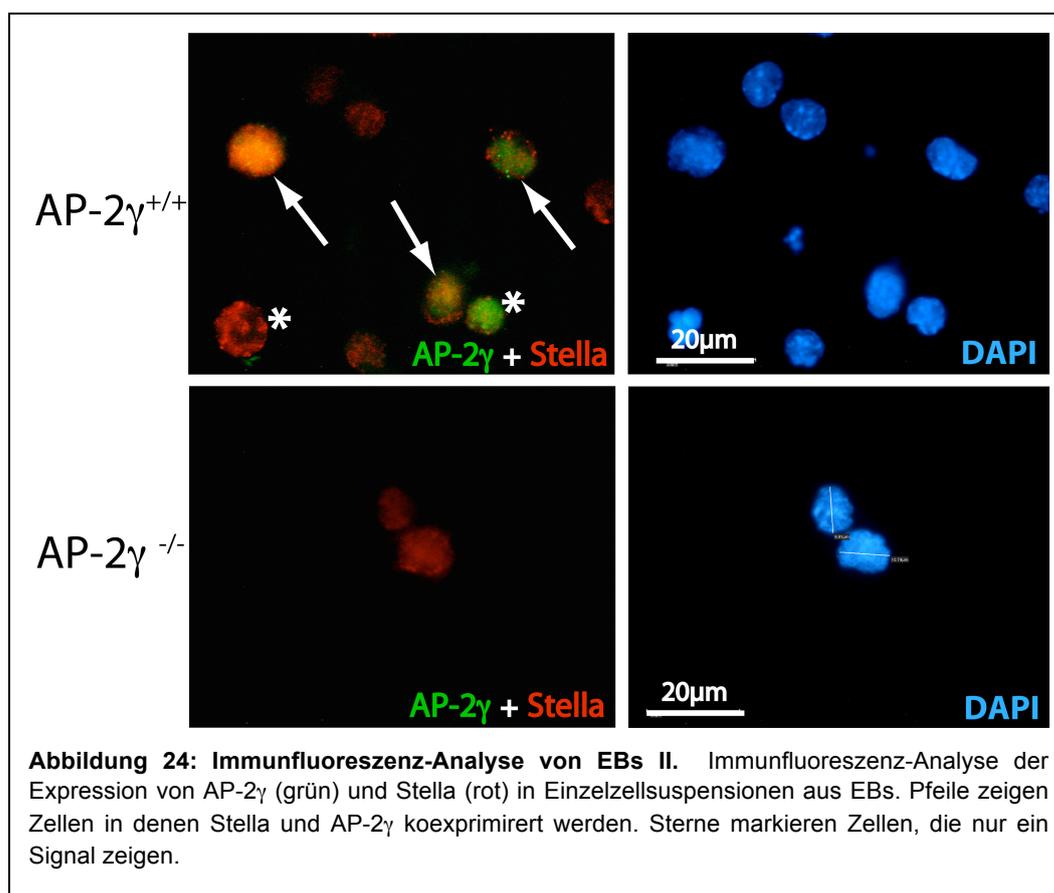
**Abbildung 23: Immunfluoreszenz-Analyse von EBs I.** Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von EBs. (A) Zeigt die SSEA-1 (rot) und Stella (grün)-Färbung eines AP-2 $\gamma^{+/+}$ -EBs an d9. (B) Zeigt die SSEA-1 (rot) und Stella (grün)-Färbung eines AP-2 $\gamma^{-/-}$ -EBs an d9. Pfeile weisen auf Zellen hin, die beide Antigene zeigen.

Auch die Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass an d9 der EB-Kultur in den AP-2 $\gamma^{+/+}$ -EBs deutlich mehr SSEA-1-positive Zellen vorhanden sind als in den AP-2 $\gamma^{-/-}$ -EBs (vergleiche Abb. 23 A, B). Sie zeigen dabei ein membranständiges SSEA-1-Signal und ein zytoplasmatisches und kernständiges Stella-Signal. Zudem enthalten die Wildtyp-Kulturen

mehr Stella-positive Zellen, dabei ist das Stella-Signal häufig mit dem SSEA-1-Signal in der gleichen Zelle zu detektieren (siehe Abb. 23 A, Pfeile). Auch die Koexpression von Stella und SSEA-1 ist in AP-2 $\gamma$ <sup>-/-</sup>-EBs zu beobachten, dies stellt jedoch ein sehr seltenes Ereignis dar (Abb. 23 B, Pfeile).

Interessant ist auch die Beobachtung, dass die doppelt-positiven Zellen in Clustern innerhalb des EBs zu finden sind und nicht gleichmäßig innerhalb eines EBs verteilt sind. Diese Clusterbildung ist dabei ein Indiz für die Nischenbildung innerhalb der EBs.

Weitere Immunfluoreszenzfärbungen zeigen zudem eine Koexpression von Stella und AP-2 $\gamma$  in Zellen aus EBs aus denen eine Einzellsuspension hergestellt worden ist. Dabei ist die Koexpression in ca. 40% aller Stella-positiven Zellen vorzufinden (siehe Abb. 24). Was darauf hindeutet, dass nicht alle SSEA-1+Stella-positiven Zellen in den EBs auch primordiale Keimzellen sind.

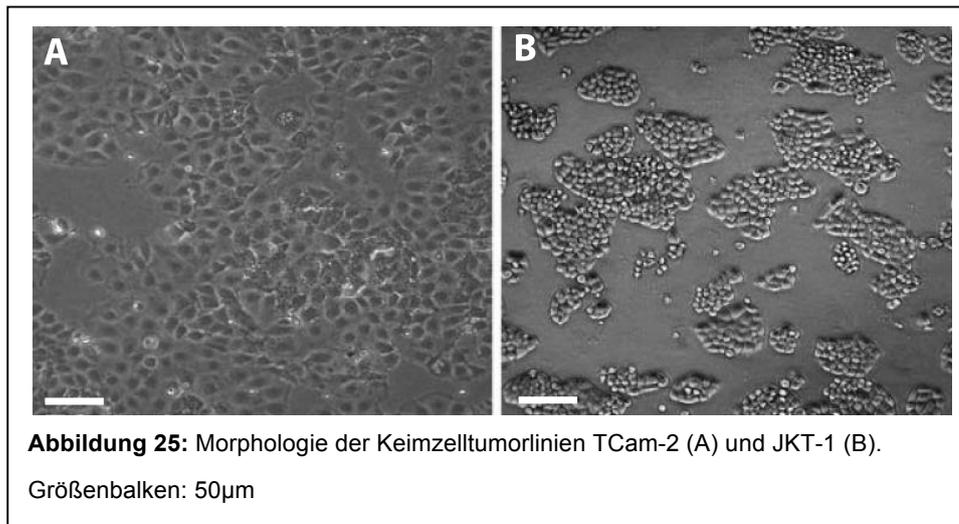


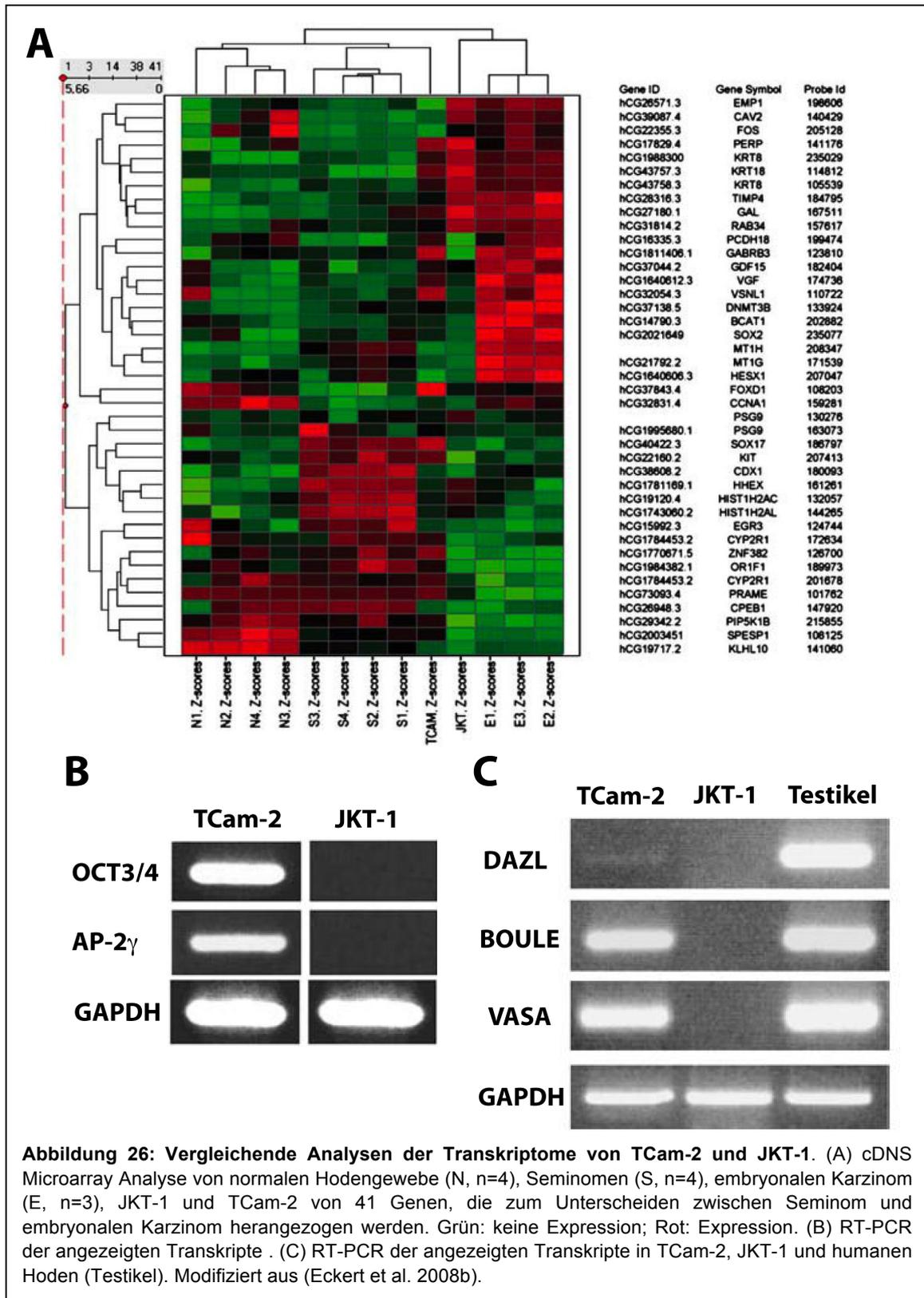
Die Ergebnisse der RT-PCR und der Immunfluoreszenz-Analyse lassen die Schlussfolgerung zu, dass primordiale Keimzellen sowohl aus AP-2 $\gamma$ <sup>+/+</sup> als auch aus den AP-2 $\gamma$ <sup>-/-</sup>-ES-Zellen differenziert werden, in den Nullmutanten diese aber verloren gehen und laut der Expression von Markergenen möglicherweise dabei eine somatische (mesodermale) Differenzierung vollziehen.

#### 4.3.2 Die Keimzelltumorklinien TCam-2 und JKT-1

Die durch die Differenzierung embryonaler Stammzellen in primordiale Keimzellen gewonnenen Ergebnisse, sollten auch in einem weiteren *in vitro* System bestätigt werden. Als geeignetes *in vitro* System könnten dabei humane Keimzelltumorklinien in Betracht gezogen werden. Dabei wäre eine Zelllinie aus einem Seminom oder einer IGCNU am besten geeignet, da diese Tumoren viele Eigenschaften, wie Markergenexpression und Morphologie, primordialer Keimzellen aufweisen. Zudem wäre es von großem Interesse weitere Parallelen in den molekularbiologischen Mechanismen zwischen der menschlichen und murinen Keimzellbiologie aufzeigen zu können.

Aufgrund der Tatsache, dass es bis heute keine Zelllinien einer IGCNU gibt, wurden Seminom-Zelllinien als potentielle *in vitro* Systeme benutzt. Zurzeit gibt es nur zwei humane Zelllinien, die erfolgreich aus Seminomen etabliert werden konnten, nämlich die Zelllinie TCam-2 (Mizuno et al. 1993) und die Zelllinie JKT-1 (Kinugawa et al. 1998),.





Um beide Zelllinien auf die Eignung als *in vitro* System für Keimzellen zu untersuchen, wurden beide genauer charakterisiert.

Dabei zeigt sich bereits in der Morphologie ein Unterscheid der beiden Zelllinien. Während

die TCam2-Zellen eher flach und polygonal sind, sind die JKT-1-Zellen eher rund und kompakt und erreichen erst mit zunehmender Konfluenz eine polygonale Zellform. Zudem weisen die TCam-2-Zellen ein größeres Verhältnis von Zytoplasma zu Zellkern als die JKT-1-Zellen auf (siehe Abb. 25).

Bei der Untersuchung der Transkriptomprofile von TCam-2 und JKT-1 im Vergleich zu normalen Hodengewebe, Seminomen und embryonalen Karzinomen mittels cDNA Microarrays, zeigte sich, dass sich die beiden Zelllinien in der Hierarchie zwischen den untersuchten Tumorentitäten befinden. Dabei scheint das Expressionsmuster der TCam-2 Zellen eher dem der Seminome als dem der embryonalen Karzinome zu entsprechen, während die JKT-1-Zelllinie durch die hierarchische Auswertung des cDNA Microarrays eher zu den embryonalen Karzinomen eingeordnet wird (siehe Abb. 26 A).

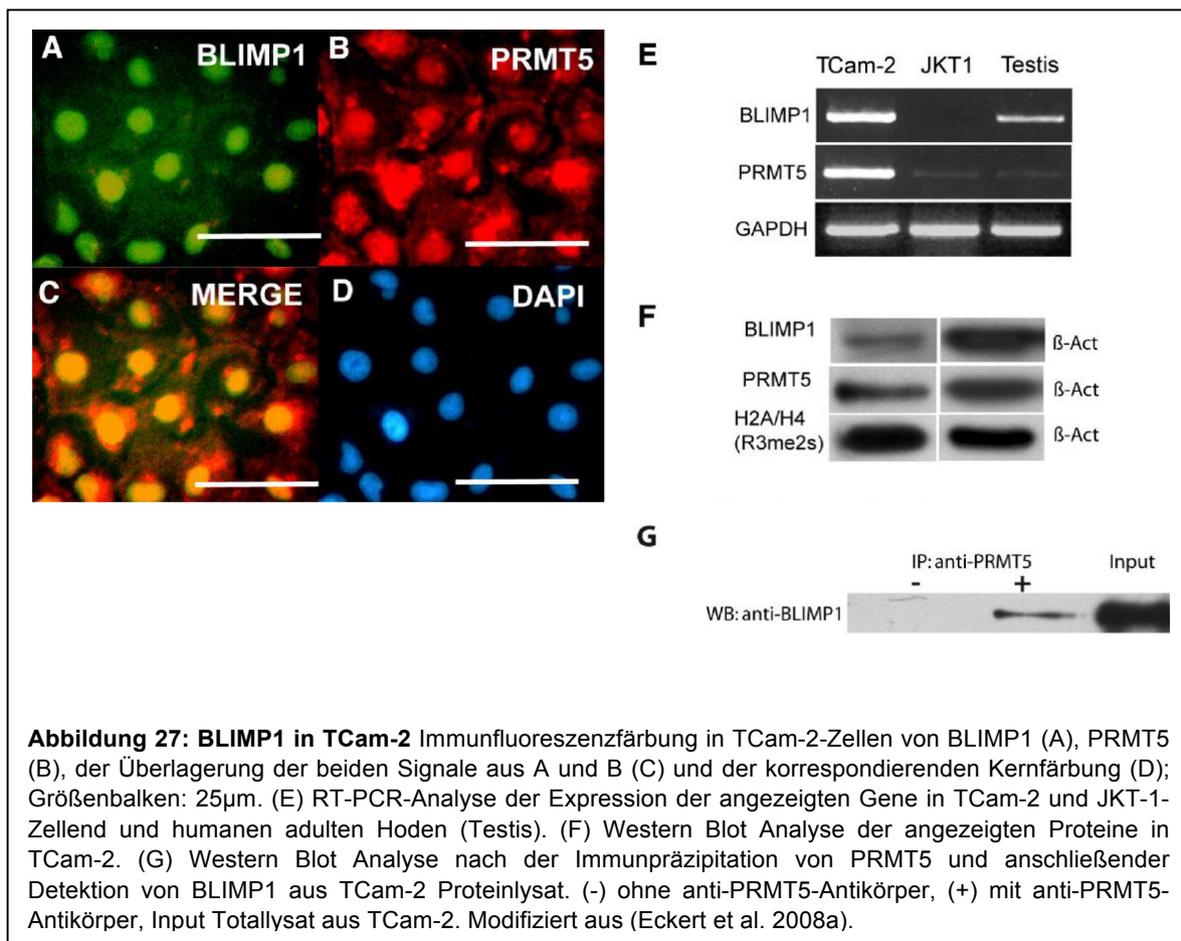
Zum Beispiel zeigen die TCam-2 Zellen - genau wie Seminome und IGCNUs - die Expression von SOX17, aber keine Expression von SOX2. JKT-1 zeigt jedoch die Expression von SOX2 und keine von SOX17. Tatsächlich gilt SOX17 als ein Marker zur Differenzierung zwischen Keimzelltumorentitäten und wird in IGCNUs und Seminomen exprimiert, während SOX2 in humanen primordiales Keimzellen und embryonalen Karzinomen exprimiert wird (de Jong et al. 2008).

Zudem zeigt die TCam-2-Zelllinie eine Expression von AP-2 $\gamma$  und dem pluripotenzassoziierten Gen OCT3/4, deren Expression in den JKT-1-Zellen nicht nachgewiesen werden kann (siehe Abb. 26, B). Die Expression dieser Gene ist jedoch für IGCNUs, Seminome und humane primordiales Keimzellen und Gonozyten charakteristisch (Looijenga et al. 2003; Hoei-Hansen et al. 2004; Pauls et al. 2005).

Interessanterweise kann in den JKT-1 Zellen, im Gegensatz zu der TCam-2-Zelllinie, keine Expression der Gene DAZL, BOULE (Familienmitglied von DAZL) und VASA detektiert werden (siehe Abb. 26, C). Die Expression dieser Gene wäre aber bei einer Zelllinie mit Keimzellursprung gefordert, da im murinen System in humanen postmigratorischen Keimzellen/ Gonozyten diese Gene exprimiert werden (Anderson et al. 2007).

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Untersuchung, welche der beiden Zelllinien als *in vitro* System für primordiales Keimzellen dienen könnte, wäre die Expression von Blimp1 zu nennen, da dieser Faktor in der Maus dafür verantwortlich ist essentielle Vorgänge sowohl bei der Spezifikation als auch beim Erhalt der Pluripotenz der PGCs zu regulieren. Dabei ist die Interaktion zwischen Blimp1 und Prmt5 in der Maus für die symmetrische Di-Methylierung von Histon H2A/H4 an Arginin 3 (H2A/H4 R3me2) und dadurch für eine genetische Regulation verantwortlich (Ohinata et al. 2005; Saitou et al. 2005; Ancelin et al. 2006; Kurimoto et al. 2008).

Auch in humanen primordialen Keimzellen konnten wir die Expression von BLIMP1 und PRMT5 zeigen, zudem kann man die Expression beider Gene und die aus der Interaktion beider Proteine resultierende Histon-Modifikation in Seminomen und IGCNUs vorfinden. Jedoch sei hier angemerkt, dass in Seminomen und IGCNUs das PRMT5-Protein nicht im Kern lokalisiert ist und vermutlich das Familienmitglied PRMT7 die Funktion von PRMT5 als Interaktionspartner für BLIMP1 übernimmt (Eckert et al. 2008a).



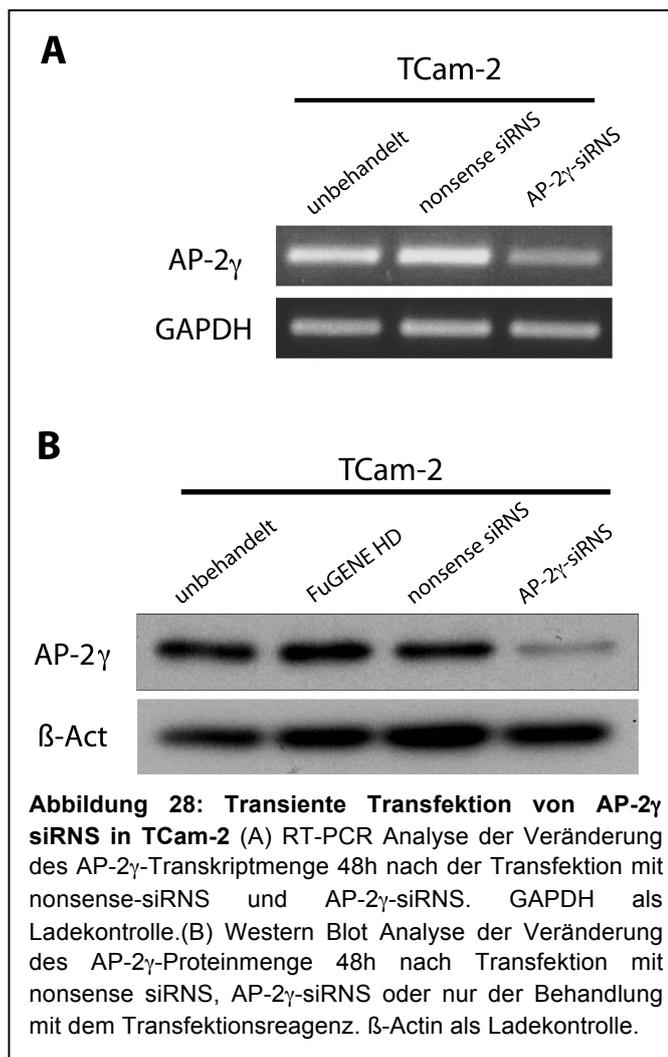
Um eine mögliche Expression von BLIMP1 und PRMT5 in den beiden Zelllinien nachzuweisen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Diese zeigte, dass BLIMP1 und PRMT5 in TCam-2 exprimiert werden. Die JKT-1 Zelllinie weist jedoch nur eine schwache Expression von PRMT5 auf (siehe Abb. 27, E). Zudem zeigt die Immunfluoreszenzfärbung, dass beide Proteine im Zellkern jeder TCam-2-Zelle kolokalisiert sind, PRMT5 aber auch membranständig detektiert werden kann. Auch die in der Maus beschriebene Interaktion von Blimp1 und Prmt5 kann in der TCam-2-Zelllinie gefunden werden, da BLIMP1 mit PRMT5 co-immunpräzipitiert (siehe Abb. 27, G). Des Weiteren kann die aus der Interaktion beider Proteine resultierende Histonmodifikation (H2A/H4R3me2) in TCam-2 detektiert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Versuche zur Rolle von AP-2 $\gamma$  in der Keimzellbiologie die Zelllinie TCam-2 als geeignetes *in vitro* System benutzt.

#### 4.3.2.1 RNAi induzierte *knock down* von AP-2 $\gamma$ in der TCam-2 Zelllinie

Um die Rolle von AP-2 $\gamma$  in der Keimzellbiologie *in vitro* näher zu untersuchen, wurde mittels eines siRNS-Gemisches (drei verschiedene siRNS für AP-2 $\gamma$ ) ein transienter *knock down* des endogenen AP-2 $\gamma$ -Proteins in TCam-2 Zellen herbeigeführt, dabei binden die siRNS-Moleküle an das Transkript von AP-2 $\gamma$  und führen zu einem transienten Abbau und/oder zur Inhibition der Translation des AP-2 $\gamma$ -Proteins.

Als Kontrollen für die Spezifität der siRNS-Moleküle wurden nonsense siRNS verwendet, die einerseits durch eine Kopplung mit einem Fluoreszenz-Farbstoff die Effizienz der Transfektion visualisierbar machen, und zweitens keine Ziel-mRNS haben und somit Aussagen zur Spezifität der AP-2 $\gamma$ -siRNS erlauben. Zudem wurden die TCam-2 Zellen nur mit FuGENE HD (Schein-Transfektion/mock Transfektion) behandelt, um eine unspezifische Reaktion der Zellen auf das Transfektionsreagenz auszuschließen. Die unbehandelten TCam-2 Zellen dienen als Ausgangswert für die Menge an AP-2 $\gamma$ -Transkript oder Protein.

Um die Auswirkungen der transienten Transfektionen zu untersuchen, wurden die TCam-2 Zellen transfiziert und die Ergebnisse dieser



Transfektion nach 48h mit RT-PCR und Western Blot ausgelesen. Dabei zeigte sich, dass sowohl die nonsense siRNS, als auch das Transfektionsreagenz keinerlei Auswirkungen auf die Menge an AP-2 $\gamma$ -mRNS (siehe Abb. 28, A) oder Protein haben (siehe Abb. 28, B). Die Transfektion der AP-2 $\gamma$ -siRNS zeigt wie erwartet eine Verminderung der AP-2 $\gamma$ -mRNS, die jedoch im Vergleich zu unbehandelten TCam-2 nicht besonders stark ist (siehe Abb. 28, A). Auf der Protein-Ebene ist jedoch eine starke Verminderung des AP-2 $\gamma$ -Proteins zu beobachten (auf ca. 10-20% der Ausgangsmenge). Dies lässt den Schluss zu, dass diese siRNS AP-2 $\gamma$ -spezifisch sind, jedoch einen Block der Translation vermitteln. Die erzielten

knock down Level genügen jedoch um die Auswirkungen eine AP-2 $\gamma$ -Verlustes studieren zu können.

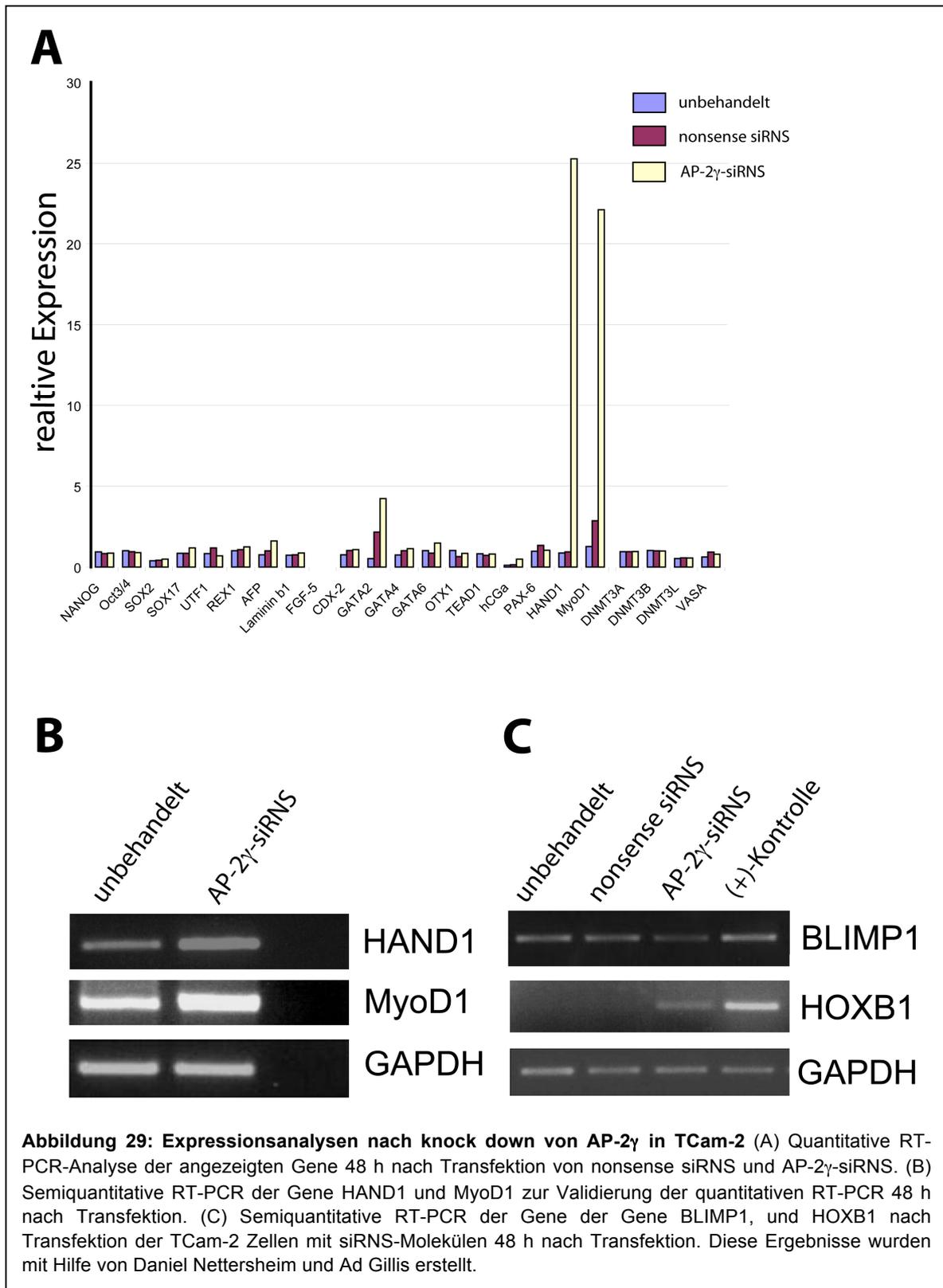
#### **4.3.2.2 Auswirkungen des AP-2 $\gamma$ -knock downs auf die TCam-2 Zelllinie**

Um die Auswirkungen des AP-2 $\gamma$ -knock downs auf das Transkriptom der TCam-2 Zelllinie zu untersuchen, wurde 48 h nach der Transfektion die RNS aus den Zellen isoliert und diese einer quantitativen RT-PCR- Analyse unterzogen. Dazu wurde ein, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Looijenga (ERASMUS MC Rotterdam) etabliertes Panel zur Analyse der Expression von 23 Genen genutzt, das sowohl pluripotenzassoziierte Gene (NANOG, OCT3/4, SOX2, SOX17, UTF1, REX1), mesodermale Marker (Brachyury, HAND1, MyoD1), endodermale Marker (AFP, Laminin b1, GATA4, GATA6), ectodermale Marker (FGF-5, OTX1, PAX-6), trophektodermale Marker (CDX2, GATA-2, TEAD-1, hCG) und Methyltransferasen (DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L) beinhaltet.

Die Auswertung dieser Ergebnisse bestätigte diese Analyse mittels cDNS-Microarray in Bezug auf die Expression von SOX2 und SOX17 und zeigt hier die Expression von SOX17, aber nur eine geringe Expression von SOX2 in unbehandelten TCam-2 Zellen (siehe Abb. 26, A). Zudem zeigte die Transfektion der nonsense siRNA keine nennenswerten Veränderungen in der Expression der analysierten Gene führt und somit den der unbehandelten TCam-2 Zellen entspricht (siehe Abb. 29, A).

Die Transfektion der AP-2 $\gamma$ -siRNS hingegen führt in der TCam-2 Zelllinie zu einer signifikanten Deregulation der Gene HAND1 und MyoD1. Die Expression von HAND1 steigt dabei um das 25fache und die von MyoD1 um das 22fache (siehe Abb. 28, A , B). Beide gelten als Marker für eine mesodermale Differenzierung, zudem wird MyoD1 eine regulatorische Rolle von myogenen miRNS zugewiesen. Jedoch ist keine Veränderung der Expression von Brachyury zu beobachten, wie sie in der Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen in primordiale Keimzellen zu beobachten war (siehe Abb. 29, A und Abb. 22).

Interessanterweise zeigt eine RT-PCR des BLIMP1-Transkriptes in AP-2 $\gamma$ -siRNS transfizierten TCam-2 - wie auch in den EB-Kulturen - keinerlei Auswirkungen auf den BLIMP1-Expressionslevel. Jedoch ist eine Hochregulation von HOXB1 zu erkennen, was darauf hindeutet, dass AP-2 $\gamma$  in der Kaskade zwischen BLIMP1 und HOXB1 liegt und HOXB1 vermutlich nicht einer direkten Regulation durch BLIMP1 unterliegt. Zudem konnte die Beobachtung, dass mesodermale Marker hochreguliert werden, auch in den AP-2 $\gamma$ <sup>-/-</sup>-EBs gemacht werden (siehe auch Abb. 22).



### 4.3.3 Auswirkungen des AP-2 $\gamma$ -Verlustes *in vitro* auf microRNS

Da der Verlust von AP-2 $\gamma$  sowohl in den EB-Kulturen als auch in der Seminom-Zelllinie TCam-2 zu einer stark erhöhten Expression von mesodermalen Genen führt (siehe Abb. 22 und 29, A, B), stellte sich auch die Frage, ob eine Deregulation von miRNS vorliegt. Diese könnte entweder durch einen direkten Einfluss von AP-2 $\gamma$  auf miRNS-Promotorregionen geschehen oder durch eine indirekte Regulation von miRNS durch ein Mediatormolekül, das von AP-2 $\gamma$  reguliert wird.

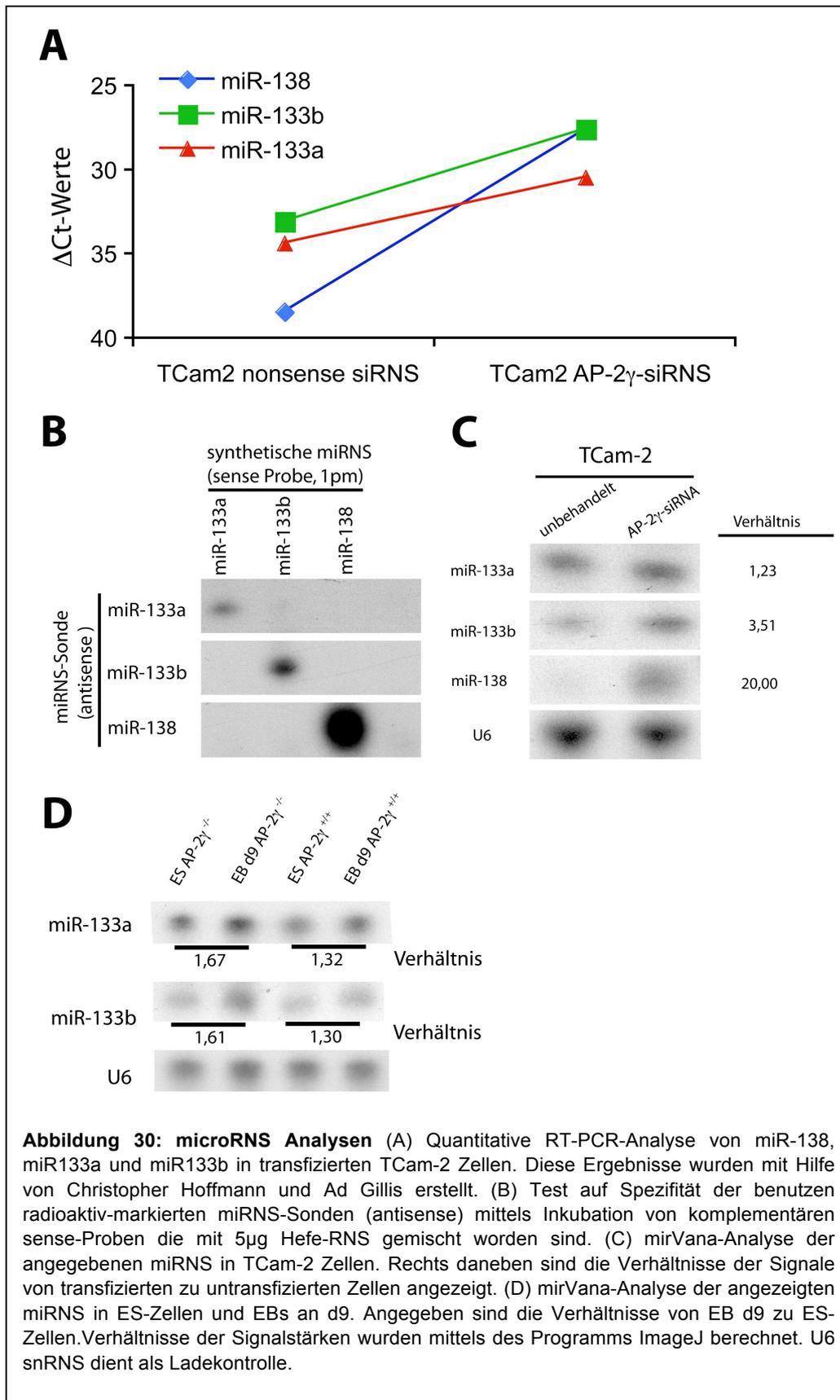
Mittels quantitativer RT-PCR wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Looijenga die Level von 155 miRNS gemessen. Dabei wurden für diese Analyse 48 h nach Transfektion aus siRNS-transfizierten TCam-2 Zellen total RNS isoliert und eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Bei dieser Analyse wurden 14 miRNS als signifikant dereguliert gefunden (7 herabreguliert, 7 hochreguliert). Unter den hochregulierten miRNS fanden sich die miR-133a, miR-133b und die miR-138 (siehe Abb. 30 A), die mit mesodermaler Entwicklung in Verbindung gebracht werden (Chen et al. 2006; Ivey et al. 2008; Morton et al. 2008).

Um die Ergebnisse der RT-PCR zu validieren, wurde eine radioaktive Detektion der miRNS mittels der mirVana Probe Construction Kits und der mirVana Detection Kits durchgeführt. Diese Analyse zeigte, dass die synthetisierten radioaktiv-markierten Sonden spezifisch für ihre Ziel-miRNS sind, da sie nur mit der entsprechenden komplementären RNS detektieren (siehe Abb. 30, B). Des Weiteren zeigte die mirVana-Analyse eine Hochregulation der miR-133a, miR-133b und der miR-138 in den AP-2 $\gamma$ -siRNS transfizierten TCam-2 Zellen. Dabei ist die miR-133a in den AP-2 $\gamma$ -siRNS transfizierten TCam-2 Zellen 1,23-fach, die miR-133b 3,51-fach und die miR-138 gar 20-fach erhöht (siehe Abb. 30, C). Somit konnten die qRT-PCR-Daten für diese miRNS mit dem miRVana-System bestätigt werden

Auch in dem System der Differenzierung embryonaler Stammzellen zu primordialen Keimzellen in EB-Kulturen wurde eine miRVana-Analyse durchgeführt. Hier erfolgte die radioaktive miRNS-Detektion in total-RNS aus ES-Zellen und EBs (d9), die aufgrund der geringen Zellzahlen nicht SSEA-1 vorsortiert worden sind. Hier ist die Expression der miR-133a in den AP-2 $\gamma$ <sup>-/-</sup> EBs 1,67-fach im Vergleich zu den korrespondierenden ES-Zellen erhöht. In den AP-2 $\gamma$ <sup>+/+</sup>-EBs jedoch nur 1,32-fach erhöht. Die miR-133b ist in den AP-2 $\gamma$ <sup>-/-</sup>-EBs 1,61-fach, in den AP-2 $\gamma$ <sup>+/+</sup>-EBs jedoch nur 1,3-fach, im Vergleich zu den ES-Zellen, erhöht. Zudem sind beide miRNS in den AP-2 $\gamma$ <sup>-/-</sup>-EBs höher exprimiert als in den AP-2 $\gamma$ <sup>+/+</sup>-EBs (siehe Abb. 30, C). Ebenfalls zu beobachten ist, dass bereits das Signal der miR-133a in den AP-2 $\gamma$ <sup>-/-</sup>-ES-Zellen stärker als in den AP-2 $\gamma$ <sup>+/+</sup>-ES-Zellen ist.

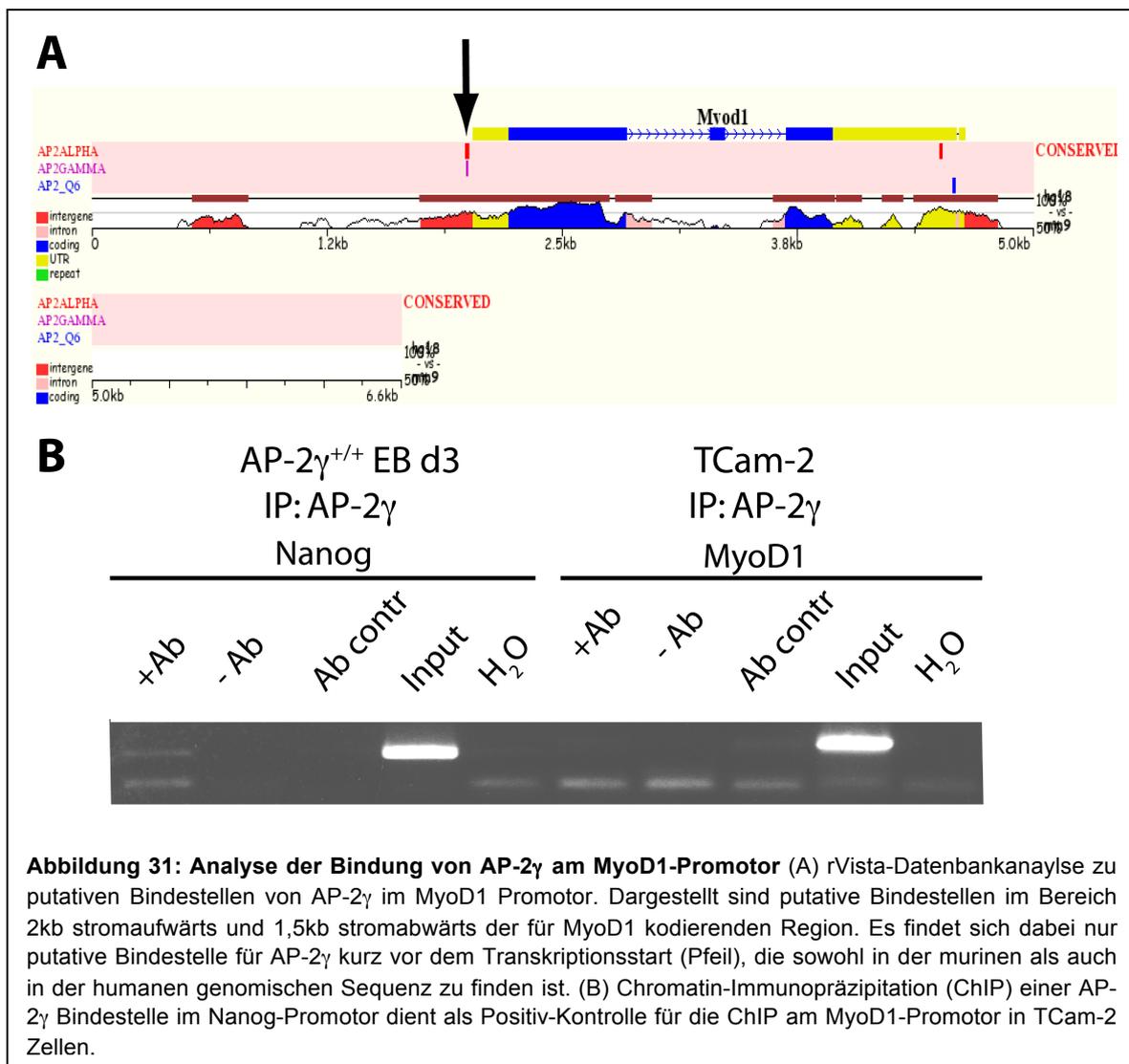
Die miR-138 konnte in dem ES-Zell-basierten System interessanterweise nicht nachgewiesen werden. Zusammenfassend führt der Verlust von AP-2 $\gamma$  sowohl in den TCam-2-Zellen als auch in dem ES-System zu einer Hochregulation von miRNS, die mit

mesodermaler Differenzierung in Verbindung gebracht werden. Diese Ergebnisse decken sich zudem mit denen der RT-PCR Analysen, in denen bereits eine Hochregulation von mesodermalen Markern in den TCam-2-Zellen und den EBs beobachtet werden konnte.



#### 4.3.4 ChIP-Experimente am MyoD1-Promotor in TCam-2 Zellen

Da gezeigt wurde, dass MyoD1 in der Lage ist die miR-133a und miR-133b zu transaktivieren (Chen et al. 2006) und die Transfektion AP-2 $\gamma$ -siRNS in TCam-2 zu einer erhöhten Expression von MyoD1 führt, lag die Vermutung nahe, dass AP-2 $\gamma$  im MyoD1-Promotor bindet und die Expression von MyoD1 reprimiert. Tatsächlich konnte eine rVista-Datenbankanalyse eine putative, zwischen Mensch und Maus konservierte, Bindestelle für AP-2 $\gamma$  50bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes im MyoD1-Promotor identifizieren (siehe Abb. 31 A). Um eine mögliche Bindung von AP-2 $\gamma$  an dieser Bindestelle zeigen zu



können, wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation durchgeführt. Als Positivkontrolle diente dabei eine Bindestelle von AP-2 $\gamma$  im murinen Nanog-Promotor (unveröffentlichte Daten Peter Kuckenbergl).

Jedoch konnte durch die an die ChIP anschließende PCR keine Amplifikation der untersuchten MyoD1-Promotorregion erfolgen (siehe Abb. 31 B ,+Ab-Spur), was die Bindung von AP-2 $\gamma$  in dieser Region ausschließt und somit andere regulatorische Mechanismen in

Betracht gezogen werden müssen. Diese könnten sowohl eine direkte reprimierende Wirkung von AP-2 $\gamma$  auf miRNS oder die Repression eines Gens, das wiederum diese miRNS aktiviert, sein.

## 5 Diskussion

Primordiale Keimzellen sind der Ursprung der Gameten (Spermatozyten und Oozyten) und werden in der Maus früh während der Embryogenese in der Basis der Allantois spezifiziert (E7.5). Die Spezifizierung der Keimzellen unterliegt einer stringenten genetischen Kontrolle, wobei keimzellspezifische Gene (z.B. Stella, Nanos, Dnd1, Prdm14) aktiviert und somatische Gene (z.B. Hoxb1) reprimiert werden. Aufgrund der molekularbiologischen Eigenschaften, wie der Expression pluripotenzassoziierter Gene (Oc3/4 und Nanog) und des epigenetischen Status (geringe DNS-Methylierung, verringerte Menge an repressiver Histonmodifizierung H3K9me2) primordialer Keimzellen, gelten diese als pluripotent und müssen vor der Differenzierung in andere Zelltypen geschützt werden. Experimentelle Daten zeigen dabei, dass das Protein Blimp1 sowohl an der Aktivierung der keimzellspezifischen Gene als auch bei der Repression somatischer Gene beteiligt ist und somit den undifferenzierten Status der primordialen Keimzellen aufrecht erhält (Ohinata et al. 2005; Saitou et al. 2005; Kurimoto et al. 2008).

Die konditionalen Nullmutanten des Transkriptionsfaktors AP-2 $\gamma$  einen frühen Verlust der primordialen Keimzellen kurz nach deren Spezifizierung aufweisen (Weber Eckert et al. in Revision), ist eine Rolle von AP-2 $\gamma$  in der Keimzellbiologie sehr wahrscheinlich. Dabei werden die primordialen Keimzellen auch in den konditionalen Nullmutanten spezifiziert, da in diesen die charakteristische Aktivität der alkalischen Phosphatase an E7.5 detektiert werden kann. Kurimoto *et al.* konnten die Expression von AP-2 $\gamma$  mittels cDNS-Microarray-Analysen in spezifizierten primordialen Keimzellen zeigen, zudem korreliert die Menge des AP-2 $\gamma$ -Transkriptes mit der Menge von Blimp1, so dass eine Regulation von AP-2 $\gamma$  durch Blimp1 in primordialen Keimzellen möglich wäre (Kurimoto et al. 2008).

In dieser Arbeit sollte zunächst der Nachweis des AP-2 $\gamma$ -Proteins in primordialen Keimzellen zum Zeitpunkt der Spezifizierung erfolgen und zudem untersucht werden, welche molekularbiologischen Konsequenzen der Verlust beider AP-2 $\gamma$ -Allele auf die primordialen Keimzellen hat.

### 5.1 AP-2 $\gamma$ wird in spezifizierten PGCs exprimiert

Um das AP-2 $\gamma$ -Protein in spezifizierten primordialen Keimzellen nachzuweisen, wurden zunächst ganze Implantationen des Stadiums E7.5 in Paraffin eingebettet und 3  $\mu$ m dicke Schnitte hergestellt. Anschließend wurde das AP-2 $\gamma$ -Protein mittels AP-2 $\gamma$ -spezifischer Antikörper und Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper nachgewiesen. Dabei konnte

das AP-2 $\gamma$ -Protein sowohl in den Riesenzellen, als auch in den Zellen des ekto-plazentalen Konus detektiert werden (siehe Abb. 10). Die Expression in den Trophektoderm-Derivaten deckt sich mit den Beobachtungen die von unserer Arbeitsgruppe in Zellen des Trophektoderms *in vivo* und *in vitro* gemacht werden konnten. Zudem weisen die AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten einen Plazenta-Phänotyp auf, wobei die Zellen im extraembryonalen Ektoderm und im ekto-plazentalen Konus eine stark verminderte Proliferation aufweisen und folglich die Labyrinth-schicht nicht korrekt ausgebildet wird und der Embryo als Folge einer Nährstoffunterversorgung abstirbt und anschließend an E9.5 resorbiert wird (Auman et al. 2002; Werling and Schorle 2002b).

Die Immunfluoreszenz-Analyse der Implantationen an E7.5 zeigte auch die Färbung einiger Zellen an der Basis der Allantois (siehe Abb. 10), wo zu diesem Zeitpunkt die spezifizierten primordiale Keimzellen lokalisiert sind. Um den Zelltyp dieser Zellen genauer zu bestimmen und somit zu verifizieren, dass die detektierten Zellen auch primordiale Keimzellen sind, wurden Allantoides von Embryonen an Tag E7.5 der murinen Embryogenese herauspräpariert, eine Einzelzellsuspension erstellt und die Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern abgelegt und fixiert. Anschließend erfolgte eine Doppelfärbung dieser Zellen für AP-2 $\gamma$  und Blimp1. Sollten die AP-2 $\gamma$ -positiven Zellen an der Basis der Allantois primordiale Keimzellen sein, so sollten sie in diesem Stadium der murinen Embryogenese die Kolo-kalisation von AP-2 $\gamma$  und Blimp1 aufweisen. Die Immunfluoreszenz-Analyse der Einzelzellsuspensionen zeigte tatsächlich eine kernständige Kolo-kalisation von AP-2 $\gamma$  und Blimp1 in einigen Zellen auf (siehe Abb. 11, C und D). Dabei zeigen alle AP-2 $\gamma$ -positiven Zellen (Abb. 11, A) auch ein kernständiges Blimp1-Signal (siehe Abb. 11, B und D). Zudem konnten hier keine Zellen detektiert werden, die nur eines der beiden Proteine aufweisen. Somit konnte hier gezeigt werden, dass AP-2 $\gamma$  in spezifizierten primordiale Keimzellen exprimiert wird. Zudem konnten hier die Beobachtungen von Kurimoto *et al.* bestätigt werden.

Im weiteren Verlauf der murinen Embryogenese beginnen die spezifizierten primordiale Keimzellen mit der Migration von der Allantois entlang des Urdarms in die Genitalanlagen, die sie zwischen E10.5 und E11.5 erreichen. Wie die Immunfluoreszenz-Analyse der Embryonen an E8.25 zeigt, kann das AP-2 $\gamma$ -Protein in Zellen detektiert werden, die ventral im posterioren Bereich des Embryos zu finden sind (siehe Abb. 12, A und C). Zu diesem Zeitpunkt befinden sich auch die migrierenden PGCs in dieser Region (Molyneaux et al. 2001; Molyneaux and Wylie 2004). Zudem kolo-kalisiert das AP-2 $\gamma$ -Signal mit dem von Stella (siehe Abb. 12, B und D), einem frühen Marker für primordiale Keimzellen (Saitou et al. 2002). Bisher wurde jedoch nur das Transkript von AP-2 $\gamma$  (Dissertation Susanne Weber, (Kurimoto et al. 2008)) detektiert werden, hier konnte zudem gezeigt werden, dass dieses auch translatiert wird. Zudem konnte durch die Immunfluoreszenz-Analysen (Abb. 10-12)

zum ersten Mal gezeigt werden, dass das AP-2 $\gamma$ -Protein im Embryo zum Zeitpunkt der Keimzell-Spezifikation und der frühen Migration exklusiv in den primordialen Keimzellen translatiert wird.

## 5.2 Der Verlust von AP-2 $\gamma$ im Embryo führt nicht zur Apoptose von PGCs

Nach Deletion von Oct3/4, c-Kit und Nanos3 kommt es zur Apoptose primordialer Keimzellen (Kehler et al. 2004; Runyan et al. 2006; Suzuki et al. 2008), somit könnte auch der Verlust der PGCs in den AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten durch Apoptose zu erklären sein. Um apoptotische Vorgänge in den PGCs von AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten zu untersuchen, wurden zwei experimentelle Ansätze verfolgt, die Apoptose visualisieren können.

Zum einen wurden Embryonen an Tag E8.0 einem TUNEL-Assay unterzogen, da während der Apoptose die DNS zwischen den Nukleosomen gespalten wird und Strangbrüche mit Einzelstrang-Überhängen (*nick end*) entstehen. Sollten in den AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten die Keimzellen durch Apoptose verloren gehen, so müssten apoptotische Zellen zum Zeitpunkt E8.0 an der Grenze zwischen Allantois und Urdarm detektiert werden können. Dabei sollte eine körnige Blaufärbung zu beobachten sein. Bei der Untersuchung von E8.0-Embryonen mittels TUNEL-Assay konnten jedoch keinerlei Unterschiede zwischen AP-2 $\gamma^{+/+}$  und AP-2 $\gamma^{-/-}$  Embryonen festgestellt werden (siehe Abb. 13). Bei beiden Genotypen ist zwar eine leicht bläuliche Färbung zu beobachten, im Vergleich zu der Positivkontrolle (DNaseI-behandelter Embryo) ist diese aber sehr schwach und somit vermutlich nur eine Hintergrundfärbung.

Auch der zweite experimentelle Ansatz die Apoptose zu visualisieren, nämlich die Färbung mittels LysoTracker, zeigt keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Nullmutanten an E8.0. Hierbei wird die lysosomale Aktivität von Zellen visualisiert, da apoptotische Zellen durch benachbarte Zellen phagozytiert werden und somit die lysosomale Aktivität dieser steigt, was in einer intensiven Färbung resultiert, die unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht werden kann. Man kann zwar einige Zellen ventral am posterioren Teil des Embryos und in der Allantois detektieren, die eine intensive Rotfärbung zeigen, jedoch sind auch hier keinerlei Unterschiede in der Anzahl der gefärbten Zellen zwischen beiden Genotypen zu beobachten (siehe Abb. 14, A-D, Pfeile). Hierbei handelt es sich vermutlich um Zellen, die andere, im Verlauf der Präparation in Apoptose eingetretene Zellen phagozytiert haben. Die intensive lysosomale Aktivität einiger Zellen im kraniofazialen Bereich zeigt (siehe Abb. 14, E-F), dass das experimentelle Prozedere korrekt abgelaufen ist, da hier während der Embryogenese die Apoptose bereits beschrieben worden ist (Schorle et al. 1996).

Somit zeigen die Ergebnisse beider experimenteller Ansätze zum Nachweis einer möglichen Apoptose der Keimzellen in AP-2 $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Embryonen, dass der Verlust der primordialen Keimzellen offensichtlich nicht durch Apoptose zu erklären ist und deshalb andere Mechanismen in Betracht gezogen werden müssen.

### 5.3 Die Keimzelltumorzelllinie TCam-2 stellt ein humanes PGC-Modell dar

Neben der Möglichkeit embryonale Stammzellen in primordiale Keimzellen zu differenzieren, wäre ein weiteres *in vitro* Modell für PGCs hilfreich. Es würde erlauben, Ergebnisse aus einem anderem *in vitro* System verifizieren zu können. Hierbei wären Zelllinien interessant, da diese den Vorteil haben, dass sie eine homogene Kultur darstellen und zudem besser zu kontrollieren sind als Systeme, die auf einer spontanen Differenzierung von ES-Zellen beruhen. Als mögliche *in vitro* Systeme für PGCs kämen Zelllinien aus Keimzelltumoren in Frage. Dabei wären, aufgrund der Genexpression und der Morphologie, Zelllinien von IGCNUs und Seminomen von großem Interesse. Zudem wäre es sehr interessant weitere Parallelen zwischen der humanen und der murinen Keimzellentwicklung herausarbeiten zu können. Da aber bisher keine IGCNU-Zelllinien verfügbar sind, rücken die Zelllinien TCam-2 und JKT-1 in den Fokus, weil beide aus Seminomen gewonnen worden sind (Mizuno et al. 1993; Kinugawa et al. 1998). Beide Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit analysiert. Bereits die vergleichende Analyse mittels cDNA-Microarray konnte zeigen, dass die TCam-2 Zelllinie im Expressionsmuster eher einem Seminom gleicht und die JKT-1-Zelllinie das eines embryonalen Karzinoms zeigt (siehe Abb. 26 A). Die TCam-2 Zelllinie exprimiert z.B. SOX17, ein Charakteristikum für Seminome und IGCNUs, während die JKT-1 Zelllinie SOX2 exprimiert, das von embryonalen Karzinomen und primordialen Keimzellen exprimiert wird (de Jong et al. 2008). SOX17 wird zwar ebenfalls in während der Spezifizierung der PGCs exprimiert, welche Rolle es aber in der Keimzellbiologie spielt ist jedoch noch nicht geklärt (Kurimoto et al. 2008). Des Weiteren ist in TCam-2 die Expression von AP-2 $\gamma$  und OCT3/4 zu detektieren, die in den JKT-1 Zellen nicht beobachtet werden (siehe Abb. 26 B). AP-2 $\gamma$ , wie auch OCT3/4, sind jedoch sowohl in humanen primordialen Keimzellen als auch in IGCNUs und Seminomen hoch exprimiert und gelten zudem als diagnostische Marker für die differentielle Diagnose von Keimzelltumoren (Looijenga et al. 2003; Hoei-Hansen et al. 2004; Hong et al. 2005; Pauls et al. 2005). Durch die Ergebnisse der RT-PCR für die Transkripte der Gene VASA, DAZL und BOULE kann sogar angezweifelt werden, dass die Zelllinie JKT-1 einen Keimzellursprung hat (siehe Abb. 26 C).

Als weiteren wichtigen Punkt konnte hier in TCam2 Zellen die Expression von BLIMP1 und zudem die Interaktion mit der Arginin-Methyltransferase PRMT5 nachgewiesen werden

(siehe Abb. 27). Zudem resultiert diese Interaktion auch in den TCam-2 Zellen in der symmetrischen Methylierung von Arginin 3 an Histon H2A/H4 (siehe Abb. 27 F und G,) die bereits in den primordialen Keimzellen der Maus beschrieben worden ist (Ancelin et al. 2006).

Da die TCam-2 Zelllinie somit viele Merkmale (Expressionsdaten, Interaktion zwischen BLIMP1 und PRMT5) der Seminome zeigt kann sie als humanes *in vitro* System für die Keimzellbiologie herangezogen werden.

#### **5.4 Der Verlust von AP-2 $\gamma$ führt zur Deregulation mesodermaler Marker *in vitro***

Da sowohl durch den TUNEL-Assay als auch durch die LysoTracker-Färbung die Apoptose als Ursache für den Keimzellverlust in AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten ausgeschlossen werden konnte, sollten andere Mechanismen untersucht werden. Aufgrund dessen, dass zum Zeitpunkt des Verlustes der primordialen Keimzellen in AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten (E8.0-8.5) die Population dieser *in vivo* sehr klein ist (ca. 100 Zellen) und diese Zellen in ihrem nativen Zustand *in vitro* nicht kultiviert und expandiert werden können, war es von großen Interesse geeignete *in vitro* Systeme für primordiale Keimzellen zu finden. Wie bereits erwähnt, kommen hier zwei Möglichkeiten in Frage, nämlich die spontane Differenzierung embryonaler Stammzellen in EBs zu primordialen Keimzellen und der Einsatz der Seminomzelllinie TCam-2.

##### **5.4.1 Unterschiede in der Expression zwischen AP-2 $\gamma^{+/+}$ und AP-2 $\gamma^{-/-}$ EBs weisen auf eine mesodermale Differenzierung primordialer Keimzellen hin**

Die Eigenschaft, dass ES-Zellen unter geeigneten Kulturbedingungen in primordiale Keimzellen differenzieren können, ist durch mehrere experimentelle Arbeiten beschrieben worden (Hubner et al. 2003; Toyooka et al. 2003; Geijsen et al. 2004; Nayernia et al. 2006; Kerkis et al. 2007; Wei et al. 2008). Dabei macht man sich die pluripotenten Eigenschaften der embryonalen Stammzellen zunutze. In dieser Arbeit wurde die Differenzierung embryonaler Stammzellen in PGCs innerhalb von Embryonic Bodies durchgeführt (Toyooka et al. 2003; Geijsen et al. 2004; Kerkis et al. 2007). Diese haben den Vorteil, dass durch die dreidimensionale Struktur Nischen entstehen, die offensichtlich die Bildung von PGCs begünstigen und somit effizienter sind als zweidimensionale Kultursysteme (Wei et al. 2008). Zur Differenzierung von ES-Zellen in PGCs wurden ES-Zelllinien verwendet, die entweder zwei Wildtyp-Allele oder zwei Null-Allele von AP-2 $\gamma$  haben. Die ES-Zellen beider Genotypen unterscheiden sich dabei nicht in Morphologie und Wachstumsverhalten, was darauf

hindeutet, dass AP-2 $\gamma$  in ES-Zellen keine essentielle Rolle hat (siehe Abb. 15, 20, 22). Vergleicht man die Expressionsprofile der ES-Zellen, so stellt man fest, dass diese bereits viele Keimzellmarker exprimieren. Somit ist in beiden Genotypen die Expression von frühen Markern wie Stella, Prdm14, Nanos3 und sogar eine schwache Expression von Blimp1 zu detektieren. Weiterhin ist eine Expression von postmigratorischen Keimzellmarkern wie Mvh und Dazl zu beobachten (siehe Abb. 22). Dabei ist die Expression der meisten Marker zwischen AP-2 $\gamma^{+/+}$  und AP-2 $\gamma^{-/-}$ -ES-Zellen vergleichbar und nur die Marker Stella, Nanos3 und Prdm14 werden unterschiedlich stark exprimiert (siehe Abb. 22). Die Expression von Keimzellmarkern in embryonalen Stammzellen ist kein Novum und bereits von mehreren Arbeitsgruppen beobachtet worden (Hubner et al. 2003; Geijsen et al. 2004; Keller 2005; Nayernia et al. 2006; Kerkis et al. 2007; Silva et al. 2009), sodass beide ES-Linien für die Differenzierung in PGC geeignet zu sein scheinen. Diese Beobachtungen unterstreichen zudem die Ähnlichkeiten, die zwischen embryonalen Stammzellen und PGCs bestehen, und werden dadurch unterstützt, dass primordiale Keimzellen in Kultur sehr schnell zu pluripotenten, sogenannten Embryonalen Keimzellen (EG) differenzieren, die eine ES-Zell-ähnliche Zellpopulation darstellen (Matsui et al. 1992; Resnick et al. 1992; Labosky et al. 1994a).

Während der EB-Kultur konnten zwei mikroskopische Unterschiede zwischen den AP-2 $\gamma^{+/+}$  und den AP-2 $\gamma^{-/-}$ -EBs beobachtet werden. Zum einen werden ab d8 nur in den AP-2 $\gamma^{+/+}$ -EBs kleine Stella-positive Zellaggregate sichtbar (siehe Abb. 16 und 18). Diese Aggregate sind bei der Differenzierung embryonaler Stammzellen in PGCs sowohl in zweidimensionalen, als auch in dreidimensionalen Kulturbedingungen zu beobachten und bestehen aus Keimzellen, die Charakteristika postmigratorischer Keimzellen aufweisen (Hubner et al. 2003; Geijsen et al. 2004). Somit kann man davon ausgehen, dass zumindest in AP-2 $\gamma^{+/+}$ -EBs PGCs differenziert werden. Zum anderen ist zwischen AP-2 $\gamma^{+/+}$  und den AP-2 $\gamma^{-/-}$ -EBs ab Tag 7 der Kultivierung zu beobachten, dass die EB-Kulturen aus AP-2 $\gamma^{-/-}$ -ES-Zellen mehr kontraktile EBs (3% bei AP-2 $\gamma^{+/+}$  und 15% bei AP-2 $\gamma^{-/-}$ ), wobei diese Diskrepanz bis zum Ende der Kultivierung bestehen bleibt (16% bei AP-2 $\gamma^{+/+}$  und 62% bei AP-2 $\gamma^{-/-}$  an d9, siehe auch Abb. 17). Diese kontraktilen EBs sind generell bei einer spontanen Differenzierung von ES-Zellen in EBs zu beobachten und sind ein Hinweis auf eine Differenzierung in Kardiomyozyten (Wobus et al. 1991), die einen mesodermalen und somit einen somatischen Ursprung haben (Viragh and Challice 1973).

Um eine Aussage über mögliche molekulare Mechanismen zur Rolle von AP-2 $\gamma$  in, aus ES-Zellen differenzierten, primordialen Keimzellen treffen zu können, mussten diese von den übrigen Zellen separiert werden. Dies erfolgte mithilfe des Proteoglycans SSEA-1, das sowohl auf ES-Zellen als auch auf primordialen Keimzellen exponiert wird (siehe Abb. 20, (Marani et al. 1986; Geijsen et al. 2004). Jedoch kann hier sowohl durch das

Expressionsmuster von SSEA-1 *in vivo* als auch durch die relativ hohen prozentualen Anteile der SSEA-1-positiven Zellen in den EBs beider Genotypen (siehe Abb. 21) davon ausgegangen werden, dass nicht alle diese Zellen auch *in vitro* differenzierte primordiale Keimzellen darstellen. Viele der SSEA-1-positiven Zellen sind zwar auch positiv für Stella (siehe Abb. 23), jedoch sind nicht alle Stella-positive Zellen auch AP-2 $\gamma$ -positiv (siehe Abb. 24).

Dennoch ist dieses Oberflächenmolekül im Vergleich zu c-Kit besser geeignet *in vitro* differenzierte Keimzellen von den übrigen Zellmaterial zu unterscheiden, da generell eine kleinere Zellpopulation extrahiert werden kann (siehe Abb. 19 und 21).

Die anschließende semiquantitative RT-PCR Analyse zeigte, dass in beiden Genotypen die Spezifizierung der Keimzellen zwischen d5 und d7 der Kultur abläuft, wie es auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet worden ist (Wei et al. 2008; Silva et al. 2009). Dabei ist an d5 sowohl in den AP-2 $\gamma^{+/+}$  als auch in den AP-2 $\gamma^{-/-}$  EBs ein Anstieg der Blimp1-Expression festzustellen und erreicht an d7 ein Plateau. Die Keimzellmarker wie Stella, Nanos3 und Oct3/4 sind zu dem Zeitpunkt d5 in beiden Genotypen gleich stark exprimiert (siehe Abb. 22). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Spezifizierung der Keimzellen und die Expression von Blimp1 nicht von AP-2 $\gamma$  abhängt und somit sowohl in den AP-2 $\gamma^{+/+}$  als auch in den AP-2 $\gamma^{-/-}$ -EBs PGCs spezifiziert werden. Dies korreliert zudem mit den Beobachtungen, die *in vivo* gemacht werden konnten: In den AP-2 $\gamma^{-/-}$ -Embryonen an Tag 7.5 wurden alkalische Phosphatase-positive Zellen (Keimzellen) in den Allantoides und zum Zeitpunkt E8.25 an der Basis der Allantoides gefunden (siehe Abb.6 und Dissertation Susanne Weber). Im weiteren Verlauf der EB-Kultur konnte beobachtet werden, dass die meisten Keimzellmarker in den AP-2 $\gamma^{-/-}$ -EBs nicht mehr exprimiert werden, auch ist eine erhöhte Expression des mesodermalen Markers Brachyury und als Konsequenz für die vermehrte mesodermale Differenzierung eine erhöhte und längere Expression von Nkx2.5, einem Marker für Kardiomyozyten-Vorläufer, in den AP-2 $\gamma^{-/-}$ -EBs zu beobachten. Dies erklärt auch den signifikant höheren Anteil an kontraktile EBs in den Nullmutanten EBs. Des Weiteren zeigen die SSEA-1-positiven Zellen der AP-2 $\gamma^{-/-}$ -EBs ab d5 eine Expression von Hoxb1, das mit somatischer Differenzierung in Verbindung gebracht wird (Ohinata et al. 2005; Kurimoto et al. 2008).

Die Ergebnisse der RT-PCRs werden zudem durch die Immunfluoreszenz-Analysen der EBs bestätigt. Hier sind in den AP-2 $\gamma^{-/-}$ -EBs im Vergleich zu den AP-2 $\gamma^{+/+}$ -EBs nur wenige Stella/SSEA-1-positive Zellen zu beobachten (siehe Abb. 23).

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse der Differenzierung von ES-Zellen in primordiale Keimzellen den Schluss zu, dass eine Differenzierung und Spezifizierung von PGCs in den EBs beider Genotypen stattfindet, jedoch die AP-2 $\gamma^{-/-}$ -PGCs danach ihre Keimzeleigenschaften verlieren und ein mesodermales (somatisches)

Differenzierungsprogramm aktiviert wird und die PGC damit verloren gehen. Dies würde auch die Abwesenheit von, ins Medium abgegebenen PGC-Aggregaten in den AP-2 $\gamma$ <sup>-/-</sup>-EBs an d9 erklären und die stark erhöhte Anzahl an kontraktilen EBs.

#### **5.4.2 Der knock down von AP-2 $\gamma$ in TCam2 führt ebenfalls zu einer Hochregulation mesodermaler Marker**

Um die Auswirkungen eines Verlustes von AP-2 $\gamma$  auf das humane *in vitro* System untersuchen zu können, wurden die TCam2 Zellen mit einer AP-2 $\gamma$ -spezifischen siRNS transient transfiziert. Dabei ist 48 Stunden nach der Transfektion eine Reduzierung der AP-2 $\gamma$ -Proteinmenge um 80-90% zu beobachten (siehe Abb. 28). Die anschließenden Analysen in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Leendert Loijenga haben gezeigt, dass durch den knock down die Expression der untersuchten trophektodermalen, ectodermalen und endodermalen Marker nicht beeinträchtigt und die Expression dieser mit den Kontrollen vergleichbar ist. Nur die Expression der mesodermalen Marker HAND1 und MyoD1 ist stark dereguliert. Dabei steigt die Expression dieser Marker in den mit AP-2 $\gamma$ -siRNS transfizierten TCam2 Zellen um mehr als das 20-fache an (25-fach bei HAND1, 22-fach bei MyoD1, siehe auch Abb. 29 A und B) und zeigt somit Parallelen zu der Differenzierung embryonaler Stammzellen in PGCs. Auch hier ist eine Deregulation mesodermaler Marker in den AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten zu beobachten. Zudem ist in den TCam-2 Zellen 48 Stunden nach Transfektion die Transkriptmenge von BLIMP1 nicht signifikant verändert, jedoch ist eine Hochregulation von HOXB1 zu detektieren (siehe Abb. 29, C). Diese Beobachtung konnte ebenfalls bei der Differenzierung der ES-Zellen gemacht werden und bestätigt die Hypothese, dass AP-2 $\gamma$  in der Hierarchie BLIMP1 nachgeschaltet ist und innerhalb der BLIMP1-vermittelten genetischen Regulation die Aufgabe hat, die mesodermale Differenzierung der primordialen Keimzellen zu reprimieren. Somit zeigen die Ergebnisse der Versuche in den TCam-2 Zellen Parallelen zu denen, die während der Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen in PGCs gemacht werden konnten. Allerdings sind in den verschiedenen Systemen unterschiedliche mesodermale Marker dereguliert. Findet man in den EBs Brachyury dereguliert, so ist in den TCam-2 Zellen die Brachyury-Expression unverändert, hingegen die Expression der mesodermalen Marker HAND1 und MyoD1 stark erhöht.

Eine Erklärung hierfür könnte die Tatsache sein, dass die embryonalen Stammzellen ein großes Differenzierungspotential haben und sich ein breites Spektrum an Zelltypen innerhalb dieser EBs bildet, aus denen mittels SSEA-1 primordiale Keimzellen angereichert werden müssen. Die Seminomzelllinie TCam-2 hingegen stellt ein homogenes und stabiles System dar, das vermutlich kein oder nur ein sehr geringes Differenzierungspotenzial hat. Zudem

haben die TCam-2 Zellen zwar viele Eigenschaften einer humanen primordialen Keimzelle oder Gonozyte, sind jedoch entartete Keimzellen. Die Differenzierung der ES-Zellen ist in der Lage native primordiale Keimzellen zu generieren, diese liegen jedoch in einer sehr geringen Anzahl vor. Zudem stellt diese Differenzierung ein unkontrolliertes System dar. Die TCam-2 Zelllinie hat hingegen den Vorteil, dass diese eine homogene Zellpopulation darstellt, der Nachteil besteht aber darin, dass sie zwar viele dennoch nicht alle molekularbiologischen Eigenschaften einer humanen primordialen Keimzelle bzw. eines Gonozyten besitzt und zudem die chromosomale Aberrationen des Seminoms (z.B. Amplifikation des NANOG-Gens) aufweist. Beide Systeme sind folglich artifiziell und geben die *in vivo* Situation nur bedingt wieder.

Dennoch ist in beiden *in vitro* Systemen die Deregulation mesodermaler Marker durch den Verlust von AP-2 $\gamma$  zu beobachten. Somit scheint hier eine konservierte Rolle von AP-2 $\gamma$  in der Keimzellbiologie vorzuliegen, dabei scheint AP-2 $\gamma$  für die Spezifizierung der PGCs nicht essentiell zu sein und die entscheidende Rolle von AP-2 $\gamma$  scheint das Aufrechterhalten der PGC-Population zu sein, indem es das mesodermale Differenzierungsprogramm in den PGCs reprimiert.

#### **5.4.3 Auswirkungen des AP-2 $\gamma$ -Verlustes auf mesodermassozierte microRNS**

Da miRNS ein Netzwerk zur posttranskriptionellen Regulation innerhalb einer Zelle bilden und Einfluss auf das Zellschicksal nehmen können (Houbaviv et al. 2003; Hayashita et al. 2005; Chen et al. 2006; Chang et al. 2008; Ivey et al. 2008), wurde innerhalb einer Kolaboration mit Prof. Leendert Loijenga eine Analyse von 155 miRNS in TCam-2 nach AP-2 $\gamma$  knock down durchgeführt. Dabei wurden miRNS (miR-133a, miR-133b und miR138) hochreguliert gefunden (siehe Abb. 30 A), die mit mesodermaler Differenzierung in Verbindung gebracht werden (Chen et al. 2006; Ivey et al. 2008; Morton et al. 2008). Die Ergebnisse, die mittels quantitativer RT-PCR erzeugt wurden, konnten zudem durch Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden bestätigt werden. Zusätzlich konnte auch, während der Differenzierung der ES-Zellen in PGCs, eine Hochregulation der miR-133a und der miR-133b gefunden werden (siehe Abb. 30 D). Hier fiel der Unterschied zwischen den Genotypen jedoch nicht so gravierend aus, wie in dem TCam-2 System beobachtet werden konnte, zudem konnte die miR-138 im murinen System nicht detektiert werden (siehe Abb. 30 A, C, D).

Dennoch ist die Beobachtung, dass ein Verlust von AP-2 $\gamma$  mit der Hochregulation mesodermassoziierter microRNS einhergeht, sehr interessant und stützt die Hypothese, dass die Rolle von AP-2 $\gamma$  in PGCs darin besteht die Differenzierung in somatische

(mesodermale) Zellen zu reprimieren. Ob dies jedoch direkt durch eine Regulation von mesodermalen Markern oder gar durch die Regulation von miRNAs, die mesodermale Differenzierung induzieren können, ist nicht bekannt. Jedoch könnten hier beide Wirkungsmechanismen in Frage kommen.

Da in den TCam-2 Zellen nach AP-2 $\gamma$  knock down, sowohl eine Hochregulation von MyoD1 als auch der miR-133a detektiert werden konnte (siehe Abb. 29 A+B, 30 A+C), und eine Regulation dieser miRNAs während der Muskelentwicklung durch MyoD1 berichtet worden ist (Chen et al. 2006; Ivey et al. 2008), stellte sich die Frage, ob AP-2 $\gamma$  am Promotor von MyoD1 binden und vielleicht die MyoD1 Expression reprimieren kann. Durch eine rVista-Datenbank-Analyse konnte zwar im Promotor von MyoD1 eine, zwischen Maus und Mensch konservierte, putative AP-2 $\gamma$ -Bindestelle lokalisiert werden, jedoch konnte mittels einer CHIP-Analyse eine tatsächliche Bindung von AP-2 $\gamma$  im MyoD1-Promotor nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 31).

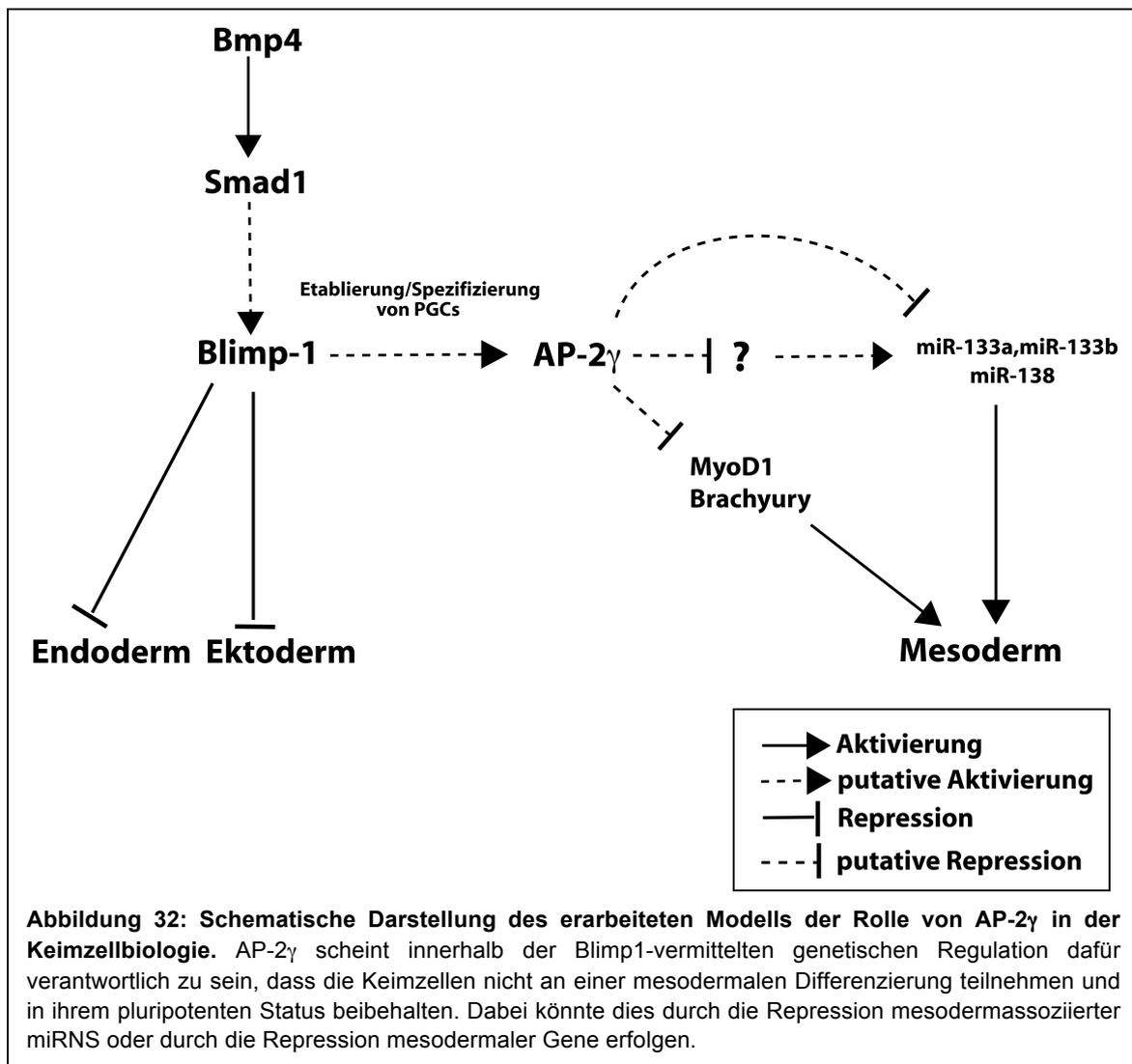
Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider *in vitro* Systeme könnten dadurch zu erklären sein, dass die Untersuchung im murinen System aufgrund der niedrigen Sensitivität dieser Methode und der geringen Menge an verfügbarem Zellmaterial die RNS ganzer EBs zum Anfangs- und Endzeitpunkt des Prozederes für die Hybridisierungen benutzt worden. Somit könnte eine transiente Expression der miR-138 während der Differenzierung nicht detektiert werden. Die Unterschiede zwischen den AP-2 $\gamma^{+/+}$  und AP-2 $\gamma^{-/-}$  EBs, in Bezug auf die Menge der miR-133a und der miR-133b, könnten zudem durch die vielen verschiedenen Zelltypen in den EBs, die hier eine Art Hintergrund-Signal darstellen, verfälscht worden sein.

## 5.5 Modell der Rolle von AP-2 $\gamma$ in der Keimzellbiologie

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse weisen auf eine Rolle von AP-2 $\gamma$  in primordialen Keimzellen hin. In beiden benutzten *in vitro* Systemen führte die Abwesenheit von AP-2 $\gamma$  zu einer Hochregulation mesodermaler Marker und einiger miRNAs, die mit mesodermaler Differenzierung in Verbindung gebracht werden. Zudem konnte in beiden Systemen keine Veränderung in der Menge von Blimp1, eines Schlüsselmoleküls in der Spezifizierung und Erhaltung der Keimzellpopulation, gefunden werden. Da in cDNA-Microarray-Studien die Expression von AP-2 $\gamma$  mit der von Blimp1 korreliert und zudem die Expression von AP-2 $\gamma$  im zeitlichen Verlauf nach der von Blimp1 detektiert worden ist, kann angenommen werden, dass AP-2 $\gamma$  Blimp1 nachgeschaltet ist (Kurimoto et al. 2008). Dabei scheint in der komplexen, Blimp1-vermittelten, genetischen Regulation AP-2 $\gamma$  dafür verantwortlich zu sein, dass die pluripotenten Keimzellen nicht eine mesodermale Differenzierung durchlaufen und somit verloren gehen (siehe Abb. 32). Inwiefern die gefundene Deregelation

mesodermassoziiertes miRNS einen Einfluss hat muss jedoch noch untersucht werden. Dabei könnte AP-2 $\gamma$  die miRNS direkt negativ regulieren, oder einen Aktivator dieser miRNS negativ beeinflussen. MyoD1 konnte jedoch als AP-2 $\gamma$  Ziel ausgeschlossen werden.

In dem hier erarbeiteten Modell ist AP-2 $\gamma$  dafür verantwortlich eine Stammzellpopulation (in diesem Fall PGCs) aufrechterhalten wird. Diese Hypothese wird durch die Beobachtungen im Trophektoderm und in Brustdrüsen gestützt. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass AP-2 $\gamma$  für die Etablierung und die Erhaltung von Trophektoderm-Stammzellen verantwortlich ist (siehe Dissertation Sandra Buhl). Zudem ist in einem Transgenmodell gezeigt worden, dass durch die Überexpression von AP-2 $\gamma$  die Differenzierung von Zellen zu sekretorischen Einheiten in der Brustdrüse reprimiert wird (Jager et al. 2003). Somit könnte AP-2 $\gamma$  generell eine Rolle bei der Aufrechterhaltung von Stammzellpopulation spielen und sie dabei vor Differenzierung schützen.



## 5.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnten wichtige Erkenntnisse zur Rolle von AP-2 $\gamma$  in primordialen Keimzellen gewonnen werden. Dazu wurden zwei *in vitro* Systeme für primordiale Keimzellen benutzt. Einerseits konnte die spontane Differenzierung embryonaler Stammzellen in PGCs etabliert werden, andererseits konnte gezeigt werden, dass die Seminomzelllinie TCam-2 ebenfalls als PGC-Modell genutzt werden kann. Dennoch sind beide *in vitro* Systeme artifizuell und die gewonnenen Erkenntnisse müssen noch *in vivo* bestätigt werden.

Dazu müssten Transkriptomanalysen primordialer Keimzellen in AP-2 $\gamma^{+/+}$  und AP-2 $\gamma^{-/-}$  Embryonen in einem Zeitraum zwischen E7.0 und E8.5 auf Einzelzellniveau erstellt werden. Da aber in diesem Zeitfenster die Population der PGCs sich zwischen 40 und 100 Zellen bewegt, ist eine geeignete Reportermauslinie unumgänglich.

Diese muss eine sehr stringente Reporterexpression in den Keimzellen ab dem Stadium der Spezifizierung aufweisen. In diesem Fall kommen hier zur Zeit zwei bereits veröffentlichte Mauslinien in Fragen, nämlich die Prdm14-Venus (Yamaji et al. 2008) oder die Stella-GFP (Ohinata et al. 2008) Mauslinie. Beide zeigen eine stringente Expression von der Reporterogene in den primordialen Keimzellen und wären ideal zu gezielter Isolation der kleinen PGC-Population. Dazu müssten z.B. diese in die AP-2 $\gamma^{loxP/loxP}$ -Mauslinie eingekreuzt werden und anschließend mit der Sox2Cre-Linie verpaart werden, damit man AP-2 $\gamma$ -Nullmutanten erhalten kann. Sollte die Halbwertszeit des Reporterproteins zudem lang genug sein (ca. 16 h), so wäre man in der Lage AP-2 $\gamma^{-/-}$ -Keimzellen im Embryo zu verfolgen und sogenannte Lineage-Tracing Experimente durchzuführen. Diese Experimente würden erlauben das genaue Schicksal der AP2 $\gamma^{-/-}$ -Keimzellen zu untersuchen. Voraussetzung hierfür wäre aber, dass weder Stella noch Prdm14 von AP-2 $\gamma$  reguliert werden, denn ein Verlust von AP-2 $\gamma$  würde nicht in der Expression des Reportergens resultieren.

Eine weitere Möglichkeit wäre das Generieren einer AP-2 $\gamma$ -Reportermaus, die ein Reporterogen unter der Kontrolle des AP-2 $\gamma$ -Promotors exprimiert. Die Expression des Reportergens würde dann alle Zellen markieren, die AP-2 $\gamma$  exprimieren sollten und würde einen möglichen Effekt des AP-2 $\gamma$ -Verlustes auf andere Reportergen-Promotoren umgehen.

Um einen Einblick in die genetische Regulation durch AP-2 $\gamma$  zu bekommen sind hier experimentelle Ansätze gefragt, die es erlauben das gesamte Transkriptom oder das mirRnom einer Zelle zu analysieren, dazu wären cDNS-Microarrays und miR-Arrays durchzuführen. Auch eine Untersuchung der Bindung von AP-2 $\gamma$  in Promotorbereichen (ChIP on Chip) könnte weitere Einblicke in das regulatorische Netzwerk von AP-2 $\gamma$  erlauben. Diese

experimentellen Ansätze könnten in Kombination den genauen Wirkungsmechanismus von AP-2 $\gamma$  aufzuschlüsseln, denn liegt eine Bindung von AP-2 $\gamma$  in einem Promotor vor und ist zudem das dazugehörige Gen in AP-2-Nullmutanten im Vergleich zu AP-2-Wildtypen dereguliert ist eine Regulation durch AP-2 $\gamma$  wahrscheinlich.

Von Interesse wäre auch zu untersuchen, welche Signalkaskaden für die Aktivierung von AP-2 $\gamma$  verantwortlich sind. Insbesondere wäre hier ein Augenmerk auf Signalkaskaden zu legen, die wie die WNT-Signalkaskade oder die Signalkaskade der TGF- $\beta$ -Familie (BMPs), die für die Selbsterneuerung von Stammzellpopulationen verantwortlich sind.

## 6 Literaturverzeichnis

- Almstrup, K., Hoei-Hansen, C.E., Wirkner, U., Blake, J., Schwager, C., Ansorge, W., Nielsen, J.E., Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., and Leffers, H. 2004. Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res* **64**(14): 4736-4743.
- Ancelin, K., Lange, U.C., Hajkova, P., Schneider, R., Bannister, A.J., Kouzarides, T., and Surani, M.A. 2006. Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nat Cell Biol* **8**(6): 623-630.
- Anderson, E.L., Baltus, A.E., Roepers-Gajadien, H.L., Hassold, T.J., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M., and Page, D.C. 2008. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(39): 14976-14980.
- Anderson, R.A., Fulton, N., Cowan, G., Coutts, S., and Saunders, P.T. 2007. Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. *BMC Dev Biol* **7**: 136.
- Andre, C., d'Auriol, L., Lacombe, C., Gisselbrecht, S., and Galibert, F. 1989. c-kit mRNA expression in human and murine hematopoietic cell lines. *Oncogene* **4**(8): 1047-1049.
- Ara, T., Nakamura, Y., Egawa, T., Sugiyama, T., Abe, K., Kishimoto, T., Matsui, Y., and Nagasawa, T. 2003. Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5319-5323.
- Asada, Y., Varnum, D.S., Frankel, W.N., and Nadeau, J.H. 1994. A mutation in the Ter gene causing increased susceptibility to testicular teratomas maps to mouse chromosome 18. *Nat Genet* **6**(4): 363-368.
- Atkin, N.B. and Baker, M.C. 1982. Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumours? *Lancet* **2**(8311): 1349.
- . 1983. i(12p): specific chromosomal marker in seminoma and malignant teratoma of the testis? *Cancer Genet Cytogenet* **10**(2): 199-204.
- 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**(11): 2733-2747.
- Baltus, A.E., Menke, D.B., Hu, Y.C., Goodheart, M.L., Carpenter, A.E., de Rooij, D.G., and Page, D.C. 2006. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet* **38**(12): 1430-1434.

- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**(2): 281-297.
- Beckett, E.A., McGeough, C.A., Sanders, K.M., and Ward, S.M. 2003. Pacing of interstitial cells of Cajal in the murine gastric antrum: neurally mediated and direct stimulation. *J Physiol* **553**(Pt 2): 545-559.
- Bernex, F., De Sepulveda, P., Kress, C., Elbaz, C., Delouis, C., and Panthier, J.J. 1996. Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in *WlacZ/+* and *WlacZ/WlacZ* mouse embryos. *Development* **122**(10): 3023-3033.
- Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., and Hannon, G.J. 2003. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* **35**(3): 215-217.
- Besmer, P., Manova, K., Duttlinger, R., Huang, E.J., Packer, A., Gyssler, C., and Bachvarova, R.F. 1993. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl*: 125-137.
- Botquin, V., Hess, H., Fuhrmann, G., Anastassiadis, C., Gross, M.K., Vriend, G., and Scholer, H.R. 1998. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev* **12**(13): 2073-2090.
- Bussey, K.J., Lawce, H.J., Himoe, E., Shu, X.O., Heerema, N.A., Perlman, E.J., Olson, S.B., and Magenis, R.E. 2001. SNRPN methylation patterns in germ cell tumors as a reflection of primordial germ cell development. *Genes Chromosomes Cancer* **32**(4): 342-352.
- Chang, H. and Matzuk, M.M. 2001. Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mech Dev* **104**(1-2): 61-67.
- Chang, T.C., Yu, D., Lee, Y.S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A., and Mendell, J.T. 2008. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* **40**(1): 43-50.
- 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. *Mech Dev* **54**(1): 83-94.
- Chen, J.F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., and Wang, D.Z. 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* **38**(2): 228-233.
- Chiquoine, A.D. and Rothenberg, E.J. 1957. A note on alkaline phosphatase activity of germ cells in *Amblystoma* and chick embryos. *Anat Rec* **127**(1): 31-35.
- de Jong, J., Stoop, H., Gillis, A.J., van Gurp, R.J., van de Geijn, G.J., Boer, M., Hersmus, R., Saunders, P.T., Anderson, R.A., Oosterhuis, J.W., and Looijenga, L.H. 2008.

- Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications. *J Pathol* **215**(1): 21-30.
- De Miguel, M.P., Cheng, L., Holland, E.C., Federspiel, M.J., and Donovan, P.J. 2002. Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10458-10463.
- de Sousa Lopes, S.M., Hayashi, K., and Surani, M.A. 2007. Proximal visceral endoderm and extraembryonic ectoderm regulate the formation of primordial germ cell precursors. *BMC Dev Biol* **7**: 140.
- Dymecki, S.M. 1996. Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 6191-6196.
- Eckert, D., Biermann, K., Nettersheim, D., Gillis, A.J., Steger, K., Jack, H.M., Muller, A.M., Looijenga, L.H., and Schorle, H. 2008a. Expression of BLIMP1/PRMT5 and concurrent histone H2A/H4 arginine 3 dimethylation in fetal germ cells, CIS/IGCNU and germ cell tumors. *BMC Dev Biol* **8**: 106.
- Eckert, D., Buhl, S., Weber, S., Jager, R., and Schorle, H. 2005. The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol* **6**(13): 246.
- Eckert, D., Nettersheim, D., Heukamp, L.C., Kitazawa, S., Biermann, K., and Schorle, H. 2008b. TCam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture. *Cell Tissue Res* **331**(2): 529-538.
- Farini, D., La Sala, G., Tedesco, M., and De Felici, M. 2007. Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit ligand on mouse primordial germ cells. *Dev Biol* **306**(2): 572-583.
- 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. *Mol Cell Neurosci* **24**(2): 460-475.
- Fox, N., Damjanov, I., Martinez-Hernandez, A., Knowles, B.B., and Solter, D. 1981. Immunohistochemical localization of the early embryonic antigen (SSEA-1) in postimplantation mouse embryos and fetal and adult tissues. *Dev Biol* **83**(2): 391-398.
- Fumasoni, I., Meani, N., Rambaldi, D., Scafetta, G., Alcalay, M., and Ciccarelli, F.D. 2007. Family expansion and gene rearrangements contributed to the functional specialization of PRDM genes in vertebrates. *BMC Evol Biol* **7**: 187.
- Geijsen, N., Horoschak, M., Kim, K., Gribnau, J., Eggan, K., and Daley, G.Q. 2004. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* **427**(6970): 148-154.
- Gobel, U., Schneider, D.T., Calaminus, G., Haas, R.J., Schmidt, P., and Harms, D. 2000.

- Germ-cell tumors in childhood and adolescence. GPOH MAKEI and the MAHO study groups. *Ann Oncol* **11**(3): 263-271.
- Godin, I., Deed, R., Cooke, J., Zsebo, K., Dexter, M., and Wylie, C.C. 1991. Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. *Nature* **352**(6338): 807-809.
- Godin, I., Wylie, C., and Heasman, J. 1990. Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* **108**(2): 357-363.
- Harris, K.S., Zhang, Z., McManus, M.T., Harfe, B.D., and Sun, X. 2006. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2208-2213.
- Hayashi, K., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Kaneda, M., Tang, F., Hajkova, P., Lao, K., O'Carroll, D., Das, P.P., Tarakhovsky, A., Miska, E.A., and Surani, M.A. 2008. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS ONE* **3**(3): e1738.
- Hayashi, S., Lewis, P., Pevny, L., and McMahon, A.P. 2002. Efficient gene modulation in mouse epiblast using a Sox2Cre transgenic mouse strain. *Mech Dev* **119 Suppl 1**: S97-S101.
- Hayashi, S., Tenzen, T., and McMahon, A.P. 2003. Maternal inheritance of Cre activity in a Sox2Cre deleter strain. *Genesis* **37**(2): 51-53.
- Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y., and Takahashi, T. 2005. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* **65**(21): 9628-9632.
- He, L. and Hannon, G.J. 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* **5**(7): 522-531.
- Hilger-Eversheim, K., Moser, M., Schorle, H., and Buettner, R. 2000. Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* **260**(1-2): 1-12.
- Hirata, T., Kasugai, T., Morii, E., Hirota, S., Nomura, S., Fujisawa, H., and Kitamura, Y. 1995. Characterization of c-kit-positive neurons in the dorsal root ganglion of mouse. *Brain Res Dev Brain Res* **85**(2): 201-211.
- Hirata, T., Morii, E., Morimoto, M., Kasugai, T., Tsujimura, T., Hirota, S., Kanakura, Y., Nomura, S., and Kitamura, Y. 1993. Stem cell factor induces outgrowth of c-kit-positive neurites and supports the survival of c-kit-positive neurons in dorsal root ganglia of mouse embryos. *Development* **119**(1): 49-56.
- Hoei-Hansen, C.E., Nielsen, J.E., Almstrup, K., Sonne, S.B., Graem, N., Skakkebaek, N.E.,

- Leffers, H., and Rajpert-De Meyts, E. 2004. Transcription factor AP-2gamma is a developmentally regulated marker of testicular carcinoma in situ and germ cell tumors. *Clin Cancer Res* **10**(24): 8521-8530.
- Hong, S.M., Frierson, H.F., Jr., and Moskaluk, C.A. 2005. AP-2gamma protein expression in intratubular germ cell neoplasia of testis. *Am J Clin Pathol* **124**(6): 873-877.
- Houbaviy, H.B., Murray, M.F., and Sharp, P.A. 2003. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* **5**(2): 351-358.
- Hubner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L.K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strauss, J.F., 3rd, Boiani, M., and Scholer, H.R. 2003. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* **300**(5623): 1251-1256.
- Ivey, K.N., Muth, A., Arnold, J., King, F.W., Yeh, R.F., Fish, J.E., Hsiao, E.C., Schwartz, R.J., Conklin, B.R., Bernstein, H.S., and Srivastava, D. 2008. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **2**(3): 219-229.
- 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**(12): 921-929.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M., and Rajewsky, K. 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* **19**(4): 489-501.
- Kasahara, H., Bartunkova, S., Schinke, M., Tanaka, M., and Izumo, S. 1998. Cardiac and extracardiac expression of Csx/Nkx2.5 homeodomain protein. *Circ Res* **82**(9): 936-946.
- Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J.A., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Orom, U.A., Lund, A.H., Perrakis, A., Raz, E., and Agami, R. 2007. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* **131**(7): 1273-1286.
- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomeli, H., Nagy, A., McLaughlin, K.J., Scholer, H.R., and Tomilin, A. 2004. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep* **5**(11): 1078-1083.
- Keller, G. 2005. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* **19**(10): 1129-1155.
- Kerkis, A., Fonseca, S.A., Serafim, R.C., Lavagnoli, T.M., Abdelmassih, S., Abdelmassih, R., and Kerkis, I. 2007. In vitro differentiation of male mouse embryonic stem cells into both presumptive sperm cells and oocytes. *Cloning Stem Cells* **9**(4): 535-548.
- Kimber, S.J., Brown, D.G., Pahlsson, P., and Nilsson, B. 1993. Carbohydrate antigen expression in murine embryonic stem cells and embryos. II. Sialylated antigens and glycolipid analysis. *Histochem J* **25**(9): 628-641.

- Kimura, T., Suzuki, A., Fujita, Y., Yomogida, K., Lomeli, H., Asada, N., Ikeuchi, M., Nagy, A., Mak, T.W., and Nakano, T. 2003. Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production. *Development* **130**(8): 1691-1700.
- Kimura, T., Tomooka, M., Yamano, N., Murayama, K., Matoba, S., Umehara, H., Kanai, Y., and Nakano, T. 2008. AKT signaling promotes derivation of embryonic germ cells from primordial germ cells. *Development* **135**(5): 869-879.
- Kinugawa, K., Hyodo, F., Matsuki, T., Jo, Y., Furukawa, Y., Ueki, A., and Tanaka, H. 1998. Establishment and characterization of a new human testicular seminoma cell line, JKT-1. *Int J Urol* **5**(3): 282-287.
- Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D., and Page, D.C. 2006. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(8): 2474-2479.
- Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Shigeta, M., Yamanaka, K., and Saitou, M. 2008. Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev* **22**(12): 1617-1635.
- Labosky, P.A., Barlow, D.P., and Hogan, B.L. 1994a. Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells. *Ciba Found Symp* **182**: 157-168; discussion 168-178.
- . 1994b. Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development* **120**(11): 3197-3204.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lakso, M., Pichel, J.G., Gorman, J.R., Sauer, B., Okamoto, Y., Lee, E., Alt, F.W., and Westphal, H. 1996. Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 5860-5865.
- Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V., Korving, J.P., and Hogan, B.L. 1999. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* **13**(4): 424-436.
- Leahy, A., Xiong, J.W., Kuhnert, F., and Stuhlmann, H. 1999. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool* **284**(1): 67-81.
- Lee, J., Li, Z., Brower-Sinning, R., and John, B. 2007. Regulatory circuit of human microRNA biogenesis. *PLoS Comput Biol* **3**(4): e67.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4*

- encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**(5): 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V.N. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**(6956): 415-419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **23**(20): 4051-4060.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**(7): 787-798.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**(7027): 769-773.
- Looijenga, L.H., Gillis, A.J., Stoop, H.J., Hersmus, R., and Oosterhuis, J.W. 2007. Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors: insight into their cell of origin and pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **1120**: 187-214.
- Looijenga, L.H., Olie, R.A., van der Gaag, I., van Sluijs, F.J., Matoska, J., Ploem-Zaaijer, J., Knepfle, C., and Oosterhuis, J.W. 1994. Seminomas of the canine testis. Counterpart of spermatocytic seminoma of men? *Lab Invest* **71**(4): 490-496.
- Looijenga, L.H., Stoop, H., de Leeuw, H.P., de Gouveia Brazao, C.A., Gillis, A.J., van Roozendaal, K.E., van Zoelen, E.J., Weber, R.F., Wolffenbuttel, K.P., van Dekken, H., Honecker, F., Bokemeyer, C., Perlman, E.J., Schneider, D.T., Kononen, J., Sauter, G., and Oosterhuis, J.W. 2003. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* **63**(9): 2244-2250.
- MacLean, G., Li, H., Metzger, D., Chambon, P., and Petkovich, M. 2007. Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology* **148**(10): 4560-4567.
- Marani, E., van Oers, J.W., Tetteroo, P.A., Poelmann, R.E., van der Veecken, J., and Deenen, M.G. 1986. Stage specific embryonic carbohydrate surface antigens of primordial germ cells in mouse embryos: FAL (S.S.E.A.-1) and globoside (S.S.E.A.-3). *Acta Morphol Neerl Scand* **24**(2): 103-110.
- Matsui, Y., Toksoz, D., Nishikawa, S., Williams, D., Zsebo, K., and Hogan, B.L. 1991. Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* **353**(6346): 750-752.
- Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B.L. 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* **70**(5): 841-847.
- McLaren, A. 1984. Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol* **38**: 7-23.

- Mitchell, P.J., Timmons, P.M., Hebert, J.M., Rigby, P.W., and Tjian, R. 1991. Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev* **5**(1): 105-119.
- 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**(6): 847-861.
- Mizuno, Y., Gotoh, A., Kamidono, S., and Kitazawa, S. 1993. [Establishment and characterization of a new human testicular germ cell tumor cell line (TCam-2)]. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* **84**(7): 1211-1218.
- Moe-Behrens, G.H., Klinger, F.G., Eskild, W., Grotmol, T., Haugen, T.B., and De Felici, M. 2003. Akt/PTEN signaling mediates estrogen-dependent proliferation of primordial germ cells in vitro. *Mol Endocrinol* **17**(12): 2630-2638.
- 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 Res* **27**(13): 2760-2769.
- Molyneaux, K. and Wylie, C. 2004. Primordial germ cell migration. *Int J Dev Biol* **48**(5-6): 537-544.
- Molyneaux, K.A., Stallock, J., Schaible, K., and Wylie, C. 2001. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol* **240**(2): 488-498.
- Molyneaux, K.A., Zinszner, H., Kunwar, P.S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M.J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C., and Lehmann, R. 2003. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* **130**(18): 4279-4286.
- Morton, S.U., Scherz, P.J., Cordes, K.R., Ivey, K.N., Stainier, D.Y., and Srivastava, D. 2008. microRNA-138 modulates cardiac patterning during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(46): 17830-17835.
- 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* **121**(9): 2779-2788.
- Moser, M., Pscherer, A., Roth, C., Becker, J., Mucher, G., Zerres, K., Dixkens, C., Weis, J., Guay-Woodford, L., Buettner, R., and Fassler, R. 1997a. Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta. *Genes Dev* **11**(15): 1938-1948.
- Moser, M., Ruschoff, J., and Buettner, R. 1997b. Comparative analysis of AP-2 alpha and AP-2 beta gene expression during murine embryogenesis. *Dev Dyn* **208**(1): 115-124.
- Mostofi, F.K., Sesterhenn, I.A., and Davis, C.J., Jr. 1987. Immunopathology of germ cell tumors of the testis. *Semin Diagn Pathol* **4**(4): 320-341.

- Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K., Urashima, T., Toyoda, H., Okanoue, T., and Shimotohno, K. 2006. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* **25**(17): 2537-2545.
- Murchison, E.P., Partridge, J.F., Tam, O.H., Cheloufi, S., and Hannon, G.J. 2005. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(34): 12135-12140.
- Nakamura, A. and Seydoux, G. 2008. Less is more: specification of the germline by transcriptional repression. *Development* **135**(23): 3817-3827.
- Nayernia, K., Nolte, J., Michelmann, H.W., Lee, J.H., Rathsack, K., Drusenheimer, N., Dev, A., Wulf, G., Ehrmann, I.E., Elliott, D.J., Okpanyi, V., Zechner, U., Haaf, T., Meinhardt, A., and Engel, W. 2006. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell* **11**(1): 125-132.
- Noguchi, T. and Noguchi, M. 1985. A recessive mutation (ter) causing germ cell deficiency and a high incidence of congenital testicular teratomas in 129/Sv-ter mice. *J Natl Cancer Inst* **75**(2): 385-392.
- O'Rourke, J.R., Georges, S.A., Seay, H.R., Tapscott, S.J., McManus, M.T., Goldhamer, D.J., Swanson, M.S., and Harfe, B.D. 2007. Essential role for Dicer during skeletal muscle development. *Dev Biol* **311**(2): 359-368.
- Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S.C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovskiy, A., Saitou, M., and Surani, M.A. 2005. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* **436**(7048): 207-213.
- Ohinata, Y., Sano, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., and Saitou, M. 2008. A comprehensive, non-invasive visualization of primordial germ cell development in mice by the Prdm1-mVenus and Dppa3-ECFP double transgenic reporter. *Reproduction* **136**(4): 503-514.
- Okamura, D., Tokitake, Y., Niwa, H., and Matsui, Y. 2008. Requirement of Oct3/4 function for germ cell specification. *Dev Biol* **317**(2): 576-584.
- Oosterhuis, J.W. and Looijenga, L.H. 2005. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* **5**(3): 210-222.
- Orban, P.C., Chui, D., and Marth, J.D. 1992. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(15): 6861-6865.
- Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Chazaud, C., Dolle, P., 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. *Exp Cell Res* **225**(2): 338-347.
- Ozdzenski, W. 1969. Fate of primordial germ cells in the transplanted hind gut of mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* **22**(3): 505-510.

- Pauls, K., Jager, R., Weber, S., Wardelmann, E., Koch, A., Buttner, R., and Schorle, H. 2005. Transcription factor AP-2gamma, a novel marker of gonocytes and seminomatous germ cell tumors. *Int J Cancer* **115**(3): 470-477.
- Pauls, K., Schorle, H., Jeske, W., Brehm, R., Steger, K., Wernert, N., Buttner, R., and Zhou, H. 2006. Spatial expression of germ cell markers during maturation of human fetal male gonads: an immunohistochemical study. *Hum Reprod* **21**(2): 397-404.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., and Filipowicz, W. 2007. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* **17**(3): 118-126.
- Rajewsky, N. and Socci, N.D. 2004. Computational identification of microRNA targets. *Dev Biol* **267**(2): 529-535.
- Rajpert-De Meyts, E. and Skakkebaek, N.E. 1994. Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. *Int J Androl* **17**(2): 85-92.
- Rescorla, F.J. 1999. Pediatric germ cell tumors. *Semin Surg Oncol* **16**(2): 144-158.
- Resnick, J.L., Bixler, L.S., Cheng, L., and Donovan, P.J. 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* **359**(6395): 550-551.
- Runyan, C., Schaible, K., Molyneaux, K., Wang, Z., Levin, L., and Wylie, C. 2006. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development* **133**(24): 4861-4869.
- Saga, Y. 2008. Mouse germ cell development during embryogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **18**(4): 337-341.
- Saitou, M., Barton, S.C., and Surani, M.A. 2002. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* **418**(6895): 293-300.
- Saitou, M., Payer, B., O'Carroll, D., Ohinata, Y., and Surani, M.A. 2005. Blimp1 and the emergence of the germ line during development in the mouse. *Cell Cycle* **4**(12): 1736-1740.
- Sakurai, T., Kato, H., Moriwaki, K., Noguchi, T., and Noguchi, M. 1994. The ter primordial germ cell deficiency mutation maps near Grl-1 on mouse chromosome 18. *Mamm Genome* **5**(6): 333-336.
- Schaefer, A., O'Carroll, D., Tan, C.L., Hillman, D., Sugimori, M., Llinas, R., and Greengard, P. 2007. Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J Exp Med* **204**(7): 1553-1558.
- Schneider, D.T., Schuster, A.E., Fritsch, M.K., Hu, J., Olson, T., Lauer, S., Gobel, U., and Perlman, E.J. 2001. Multipoint imprinting analysis indicates a common precursor cell for gonadal and nongonadal pediatric germ cell tumors. *Cancer Res* **61**(19): 7268-7276.
- Schorle, H., Meier, P., Buchert, M., Jaenisch, R., and Mitchell, P.J. 1996. Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* **381**(6579):

- 235-238.
- Seki, Y., Yamaji, M., Yabuta, Y., Sano, M., Shigeta, M., Matsui, Y., Saga, Y., Tachibana, M., Shinkai, Y., and Saitou, M. 2007. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development* **134**(14): 2627-2638.
- Selbach, M., Schwanhauser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**(7209): 58-63.
- Seligman, J. and Page, D.C. 1998. The Dazh gene is expressed in male and female embryonic gonads before germ cell sex differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **245**(3): 878-882.
- Sievers, S., Alemazkour, K., Zahn, S., Perlman, E.J., Gillis, A.J., Looijenga, L.H., Gobel, U., and Schneider, D.T. 2005. IGF2/H19 imprinting analysis of human germ cell tumors (GCTs) using the methylation-sensitive single-nucleotide primer extension method reflects the origin of GCTs in different stages of primordial germ cell development. *Genes Chromosomes Cancer* **44**(3): 256-264.
- Silva, C., Wood, J.R., Salvador, L., Zhang, Z., Kostetskii, I., Williams, C.J., and Strauss, J.F., 3rd. 2009. Expression profile of male germ cell-associated genes in mouse embryonic stem cell cultures treated with all-trans retinoic acid and testosterone. *Mol Reprod Dev* **76**(1): 11-21.
- Stallock, J., Molyneaux, K., Schaible, K., Knudson, C.M., and Wylie, C. 2003. The pro-apoptotic gene Bax is required for the death of ectopic primordial germ cells during their migration in the mouse embryo. *Development* **130**(26): 6589-6597.
- Stevens, L.C. and Hummel, K.P. 1957. A description of spontaneous congenital testicular teratomas in strain 129 mice. *J Natl Cancer Inst* **18**(5): 719-747.
- Suzuki, H., Tsuda, M., Kiso, M., and Saga, Y. 2008. Nanos3 maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both Bax-dependent and -independent apoptotic pathways. *Dev Biol* **318**(1): 133-142.
- Tam, P.P. and Snow, M.H. 1981. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* **64**: 133-147.
- Tan, C.C., Sindhu, K.V., Li, S., Nishio, H., Stoller, J.Z., Oishi, K., Puttreddy, S., Lee, T.J., Epstein, J.A., Walsh, M.J., and Gelb, B.D. 2008. Transcription factor Ap2delta associates with Ash2l and ALR, a trithorax family histone methyltransferase, to activate Hoxc8 transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(21): 7472-7477.
- Tomilin, A.N., Kostyleva, E.I., Drosdovskii, M.A., Seralini, J.E., and Vorob'ev, V.I. 1996. [An immunohistochemical study of the expression of transcription factor Oct3/4 in mouse spermatogenesis]. *Tsitologiya* **38**(12): 1274-1279.

- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4354.
- Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Akasu, R., and Noce, T. 2003. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11457-11462.
- Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Takahashi, Y., Matsui, Y., Satoh, M., and Noce, T. 2000. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mech Dev* **93**(1-2): 139-149.
- Tremblay, K.D., Dunn, N.R., and Robertson, E.J. 2001. Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development* **128**(18): 3609-3621.
- Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., and Saga, Y. 2003. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* **301**(5637): 1239-1241.
- Ueno, H., Turnbull, B.B., and Weissman, I.L. 2009. Two-step oligoclonal development of male germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(1): 175-180.
- Ulbright, T.M. 1993. Germ cell neoplasms of the testis. *Am J Surg Pathol* **17**(11): 1075-1091.
- Viragh, S. and Challice, C.E. 1973. Origin and differentiation of cardiac muscle cells in the mouse. *J Ultrastruct Res* **42**(1): 1-24.
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R.L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C.C., and Croce, C.M. 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2257-2261.
- von Eyben, F.E. 2004. Chromosomes, genes, and development of testicular germ cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet* **151**(2): 93-138.
- Wang, H.V., Vaupel, K., Buettner, R., Bosserhoff, A.K., and Moser, M. 2004. Identification and embryonic expression of a new AP-2 transcription factor, AP-2 epsilon. *Dev Dyn* **231**(1): 128-135.
- Wang, Y., Baskerville, S., Shenoy, A., Babiarz, J.E., Baehner, L., and Blelloch, R. 2008. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet* **40**(12): 1478-1483.
- Wei, W., Qing, T., Ye, X., Liu, H., Zhang, D., Yang, W., and Deng, H. 2008. Primordial germ cell specification from embryonic stem cells. *PLoS ONE* **3**(12): e4013.
- Werling, U. and Schorle, H. 2002a. Conditional inactivation of transcription factor AP-2gamma by using the Cre/loxP recombination system. *Genesis* **32**(2): 127-129.
- . 2002b. Transcription factor gene AP-2 gamma essential for early murine development. *Mol*

- Cell Biol* **22**(9): 3149-3156.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**(5): 855-862.
- Williams, T. and Tjian, R. 1991a. Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev* **5**(4): 670-682.
- 1991b. Characterization of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins. *Science* **251**(4997): 1067-1071.
- Wobus, A.M., Wallukat, G., and Hescheler, J. 1991. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>2+</sup> channel blockers. *Differentiation* **48**(3): 173-182.
- Yamaguchi, S., Kimura, H., Tada, M., Nakatsuji, N., and Tada, T. 2005. Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns* **5**(5): 639-646.
- Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., and Saitou, M. 2008. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet* **40**(8): 1016-1022.
- Yamazaki, M., Tsujimura, T., Morii, E., Isozaki, K., Onoue, H., Nomura, S., and Kitamura, Y. 1994. C-kit gene is expressed by skin mast cells in embryos but not in puppies of *Wsh/Wsh* mice: age-dependent abolishment of c-kit gene expression. *Blood* **83**(12): 3509-3516.
- Ying, Y., Liu, X.M., Marble, A., Lawson, K.A., and Zhao, G.Q. 2000. Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* **14**(7): 1053-1063.
- Yoshimizu, T., Obinata, M., and Matsui, Y. 2001. Stage-specific tissue and cell interactions play key roles in mouse germ cell specification. *Development* **128**(4): 481-490.
- Yoshinaga, K., Muramatsu, H., and Muramatsu, T. 1991. Immunohistochemical localization of the carbohydrate antigen 4C9 in the mouse embryo: a reliable marker of mouse primordial germ cells. *Differentiation* **48**(2): 75-82.
- Youngren, K.K., Coveney, D., Peng, X., Bhattacharya, C., Schmidt, L.S., Nickerson, M.L., Lamb, B.T., Deng, J.M., Behringer, R.R., Capel, B., Rubin, E.M., Nadeau, J.H., and Matin, A. 2005. The *Ter* mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. *Nature* **435**(7040): 360-364.
- Zeeman, A.M., Stoop, H., Boter, M., Gillis, A.J., Castrillon, D.H., Oosterhuis, J.W., and Looijenga, L.H. 2002. VASA is a specific marker for both normal and malignant human germ cells. *Lab Invest* **82**(2): 159-166.
- 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**(6579): 238-241.
- Zhao, F., Lufkin, T., and Gelb, B.D. 2003. Expression of Tfap2d, the gene encoding the transcription factor Ap-2 delta, during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns* **3**(2): 213-217.
- 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. *J Biol Chem* **276**(44): 40755-40760.
- Zhao, Q., Rank, G., Tan, Y.T., Li, H., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Cerruti, L., Curtis, D.J., Patel, D.J., Allis, C.D., Cunningham, J.M., and Jane, S.M. 2009. PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* **16**(3): 304-311.
- Zucker, R.M., Hunter, E.S., 3rd, and Rogers, J.M. 1999. Apoptosis and morphology in mouse embryos by confocal laser scanning microscopy. *Methods* **18**(4): 473-480.