

**Die Regulation
des genetischen und epigenetischen
Netzwerkes während
der murinen Keimzell-Entwicklung
durch den Transkriptionsfaktor Tfap2c**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
(Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von
Jana Nastasia Schemmer geb. Anschlag
aus
Borken (Westf.)

Bonn, Januar 2014

Erklärung

Erklärung

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. Oliver Brüstle

Tag der Promotion: 12.05.2014

Erscheinungsjahr: 2014

Danksagung

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hubert Schorle, für die Möglichkeit diese Dissertation anfertigen zu können, durch die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, der nötigen Mittel, sowie der Möglichkeit an nationalen und internationalen Kongressen teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. Oliver Brüstle möchte ich für die Übernahme des Koreferats danken, sowie danke ich Herrn Prof. Dr. Norbert Koch und PD Dr. Jutta Kirfel für die Teilnahme an der Promotionskommission als Gutachter.

Ebenfalls großer Dank gilt Dr. Astrid Becker vom Institut für Molekulare Psychiatrie in Bonn für die Durchführung des cDNS-Expressionsarrays und Dr. Marcos Araújo Bravo vom Max Planck Institut für Molekulare Biomedizin in Münster für die bioinformatische Auswertung.

Ein besonderer Dank gilt den derzeitigen aber auch ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Pathologie, insbesondere Caroline Kubaczka, Natalie Haas, Gaby Beine und Daniel Nettersheim für das nette und freundschaftliche Arbeitsklima, die immerwährende Hilfsbereitschaft und die regen Diskussionen. Es war toll mit euch allen Arbeiten zu dürfen. Für die Unterstützung während meiner Zellkultur-Experimente danke ich Angela Eggert und Susi Steiner für ihre Hilfe bei einigen immunohistochemischen Färbungen.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Eltern, meinen Freunden und ganz besonders David. Sie alle haben mich immer wieder während meinen wissenschaftlichen Durststrecken aufgebaut und mir großen Rückhalt während meiner Studien- und Promotionszeit gegeben.

**“Shakespeare advises us that some men are born great,
some achieve greatness, and some have greatness thrust
upon them. So it is with germ cells.”**

Anne McLaren 1999

Zusammenfassung

Bei der Entwicklung der primordialen Keimzellen ist ein komplexes genetisches und epigenetisches Netzwerk beteiligt. Störungen dieses Netzwerkes können in Unfruchtbarkeit oder Tumorbildung resultieren.

Der Transkriptionsfaktor *Tfap2c*/ AP-2 γ konnte neben *Blimp1* und *Prdm14* als einer der Regulatoren der Keimzell-Entwicklung identifiziert werden. Während der murinen Keimzell-Entwicklung wird *Tfap2c* in den primordialen Keimzellen ab Tag E7.25 bis zum Erreichen der Keimzellen in den Genitalfalten an Tag E12.5 exprimiert. In konditionalen *Tfap2c*^{-/-}-Mutanten findet die Spezifizierung der Keimzellen statt, aber die spezifizierten Zellen zeigen eine Heraufregulation mesodermaler Marker und gehen ab Tag E8.0 verloren.

In dieser Arbeit wurden Zielgene von *Tfap2c* während der Keimzell-Entwicklung identifiziert. Dazu wurden mit Hilfe eines *in vitro* Differenzierungsprotokolls Keimzell-ähnliche Zellen aus *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT} embryonalen Stammzellen generiert, die einen Keimzell-spezifischen Reporter tragen. Hierdurch konnte eine Isolation der generierten Keimzell-ähnlichen Zellen vorgenommen werden, welche für globale Expressionsanalysen genutzt wurden. Es konnten 455 differenziell exprimierte Gene in den *Tfap2c*^{-/-} Keimzell-ähnlichen Zellen identifiziert werden, von denen 208 eine Herunterregulation und 247 eine Heraufregulation der Genexpression zeigten. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Tfap2c* nicht nur eine Aufhebung der Repression somatischer Marker (z.B. *Hhex*, *Neurod1*, *Hoxa5*) zur Folge hat, sondern weitere Aspekte des genetischen Netzwerkes der Keimzell-Biologie beeinflusst. *Tfap2c* reguliert in Keimzell-ähnlichen Zellen Zellzyklus-assoziierte Gene (z.B. *Ccnd1*, *Cdk6*, *p21*) und Pluripotenz-assoziierte Gene (z.B. *Fgf4*, *Klf4*, *Eras*), aber auch Gene die an epigenetischen Modifikationen (z.B. *Dnmt3l*, *Dnmt3b*, *Uhrf1*) beteiligt sind. Des Weiteren ist *Tfap2c* an dem Erhalt der Keimzell-Population durch Regulation der Expression von Keimzell- und Spermatogenese-Markern (z.B. *Stella*, *c-Kit*, *Dazl*, *Dmrt1*) beteiligt.

Durch Chromatin-Immunpräzipitation Analysen konnte die Bindung von *Tfap2c* an die regulatorischen Regionen der Gene *Sfrp1*, *Dmrt1*, *Nanos3*, *c-Kit*, *Cdk6*, *p21*, *Jam2*, *Fgf4*, *Klf4*, *Dnmt3b* und *Dnmt3l* in Keimzell-ähnlichen Zellen nachgewiesen werden.

Eine Deregulation von Epigenetik-, Pluripotenz- und Zellzyklus- assoziierten Genen kann mit der Entwicklung von Keimzelltumoren in Verbindung gebracht werden. Untersuchungen an *Tfap2c* heterozygoten Mäusen im genetischen 129S2/Sv

Zusammenfassung

Hintergrund zeigen, dass männliche Mäuse mit hoher Inzidenz Keimzelltumore ausbilden. Diese ähneln aufgrund ihrer Morphologie und Genexpression den humanen frühkindlichen Keimzelltumoren. Zusätzlich konnte bei Heterozygotie des Tfp2c Zielgenes *Nanos3* ebenfalls die Ausbildung von Keimzelltumoren beobachtet werden.

Diese Daten verdeutlichen, dass Tfp2c als wichtiger Regulator während der Keimzell-Entwicklung fungiert und gemeinsam mit den anderen zwei essenziellen Regulatoren Blimp1 und Prdm14 das genetische und epigenetische Netzwerk der Keimzell-Entwicklung reguliert.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	I
Danksagung	II
Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Murine Keimzell-Entwicklung.....	1
1.1.1 Induktion der Keimzell-Entwicklung	1
1.1.2 Spezifizierung der primordialen Keimzellen	3
1.1.3 Migration der Keimzellen.....	5
1.1.4 Sexuelle Differenzierung der Keimzellen in den Genitalanlagen.....	9
1.2 Keimzelltumore und Keimzelltumorentwicklung.....	10
1.2.1 Typ I Keimzelltumore	12
1.2.2 Typ II Keimzelltumore	13
1.3 Die Familie der Tfp2 Transkriptionsfaktoren	14
1.3.1 Der Transkriptionsfaktor Tfp2c.....	15
1.4 <i>In vitro</i> Zellsysteme zur Untersuchung der Keimzell-Entwicklung	17
1.5 Die Seminom-Zelllinie TCam-2.....	18
1.6 Zielsetzung dieser Dissertation	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Allgemeine Chemikalien	21
2.1.2 Verwendete Enzyme	22
2.1.3 Laborgeräte.....	22
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.5 Verwendete Kits.....	23
2.1.6 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze	24
2.1.7 Antikörper.....	25
2.1.8 Puffer und Lösungen.....	25
2.1.9 Plasmide	26
2.1.10 Oligonukleotide	27
2.1.11 Mauslinien.....	31

Inhaltsverzeichnis

2.1.12	Bakterienstamm	31
2.1.13	Zelllinien.....	31
2.2	Mikrobiologische Methoden.....	32
2.2.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterienkulturen	32
2.2.2	shRNS-Klonierung	32
2.2.3	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien	33
2.2.4	Isolation von Plasmid-DNS	34
2.2.5	Plasmid–Restriktionsverdau.....	34
2.2.6	Transfektion von Zellen.....	34
2.2.7	TA-Klonierung.....	35
2.3	Zellkultur-Methoden.....	35
2.3.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	35
2.3.2	Herstellung muriner, embryonaler Fibroblasten (EF-Zellen)	36
2.3.3	Generierung muriner, embryonaler Stammzelllinien	36
2.3.4	Dissoziation und Passagieren von ES-Zellen	37
2.3.5	Herstellung von <i>Blimp1mVenus/Tfap2c^{-/-}</i> embryonaler Stammzellen ...	37
2.3.6	Auftauen von ES- und EF-Zellen	37
2.3.7	Kultivierung der ES-Zellen in Serum-freiem Medium	38
2.3.8	Herstellung von 3D-Zellaggregaten (Embryoid bodies)	39
2.3.9	Separation der primordialen Keimzellen mittels Durchflusszytometrie..	41
2.3.10	Fixierung von ES-Zellen und Embryoid Bodies.....	41
2.3.11	Permeabilisierung von Zellen.....	41
2.3.12	Immunfluoreszenz auf ES-Zellen und EBs	41
2.3.13	Herstellung und Immunhistochemische Färbung von Zytospins	42
2.3.14	Zellzyklusanalyse.....	42
2.3.15	Tierhaltung.....	42
2.4	Methoden der Nukleinsäureanalytik	43
2.4.1	DNS-Isolation aus Schwanzbiopsien und Zellen.....	43
2.4.2	DNS-Isolation in 96 Loch-Mikrotiterplatten.....	43
2.4.3	RNS-Isolation aus Geweben und Zellen	43
2.4.4	DNS- und RNS-Quantifizierung	44
2.4.5	DNase Verdau	44
2.4.6	cDNS-Synthese	44
2.4.7	Polymerase–Kettenreaktion.....	44

Inhaltsverzeichnis

2.4.8	Genotypisierung muriner Allele	45
2.4.9	Agarose-Gelelektrophorese	46
2.4.10	Aufreinigung von DNS-Fragmenten	47
2.4.11	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	47
2.4.12	cDNS Microarray Analyse	47
2.4.13	Sonifizierung von DNS.....	48
2.4.14	Chromatin-Immunpräzipitation	48
2.4.15	Amplifizierung von ChIP-DNS-Fragmenten	49
2.4.16	Natrium-Bisulfit-Behandlung genomischer DNS	50
3	Ergebnisse.....	52
3.1	<i>In vitro</i> Analysen zur Aufklärung der funktionellen Rolle von Tfp2c während der Keimzell-Entwicklung	52
3.2	Differenzierung von Keimzell-ähnlichen Zellen <i>in vitro</i>	52
3.3	Der Transkriptionsfaktor Tfp2c bindet an regulatorische Regionen von <i>Dnmt3b</i> , <i>Dmrt1</i> und <i>Nanos3</i>	54
3.4	Etablierung einer embryonalen Stammzelllinie mit einer <i>Tfp2c</i> Deletion ...	56
3.5	<i>Tfp2c</i> ^{-/-} und <i>Tfp2c</i> ^{WT} ES-Zellen zeigen keine morphologischen Unterschiede in 2i-Medium.....	59
3.6	Etablierung einer <i>in vitro</i> Differenzierung in PGCLCs.....	61
3.7	Die Induktion von Epiblast-ähnlichen Zellen ist in <i>Tfp2c</i> ^{-/-} -Zellen nicht beeinflusst	61
3.8	Weniger PGCLCs bei der Differenzierung von <i>Tfp2c</i> ^{-/-} -Zellen.....	63
3.9	Untersuchung des globalen Expressionsmusters von <i>Tfp2c</i> ^{-/-} ES-Zellen und <i>in vitro</i> differenzierten PGCLCs	65
3.10	Analyse direkter Zielgene von Tfp2c in PGCLCs.....	75
3.11	Die Expression Keimzell-spezifischer Gene ist in <i>Tfp2c</i> ^{-/-} -PGCLCs reduziert.	77
3.12	<i>In Vitro</i> Untersuchungen charakteristischer Prozesse migrierender Keimzellen bei Tfp2c Verlust	78
3.13	Analyse des Zellzyklus in <i>Tfp2c</i> ^{-/-} -PGCLCs.....	79
3.14	Untersuchung der DNS-Methylierung in PGCLCs.....	82
3.15	Untersuchung der Transkriptionsregulation in <i>Tfp2c</i> ^{-/-} -PGCLCs.....	84
3.16	Transienter TFAP2C-Knockdown in TCam-2 Zellen.....	86
3.17	Stabiler TFAP2C-Knockdown in TCam-2 Zellen	88
4	Diskussion	91

Inhaltsverzeichnis

4.1	Aufrechterhaltung des Keimzell-Schicksals durch Tfp2c	92
4.2	Tfp2c reguliert das somatische Differenzierungsprogramm in Keimzellen	95
4.3	Heraufregulation epigenetischer Marker in <i>Tfp2c</i> ^{-/-} -PGCLCs	97
4.4	Tfp2c reguliert die Pluripotenz in Keimzellen	99
4.5	Rolle von Tfp2c bei der Transkriptions-Elongation	101
4.6	Der Verlust von <i>Tfp2c</i> in Keimzell-ähnlichen Zellen führt zur Deregulation des Zellzyklus	103
4.7	TCam-2-Zellen zeigen Deregulation Keimzell-spezifischer Marker nach TFAP2C-Knockdown	106
4.8	Tumorbildung in <i>Tfp2c</i> heterozygoten Mäusen	109
4.9	Tumorbildung in <i>Nanos3- und Dmrt1-</i> defizienten Mausmodellen	110
4.10	Modell zur Rolle von Tfp2c in der Keimzell-Entwicklung	111
5	Ausblick	113
6	Literaturverzeichnis	114
7	Lebenslauf	127
8	Anhang	131

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Keimzell-Entwicklung in Mäusen.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Keimzell-Spezifikation welche durch die beiden PR-Domain Proteine BLIMP1 und PRDM14 etabliert wird.....	4
Abbildung 3: Verlauf der Migration von Keimzellen während der Embryonal-entwicklung.....	6
Abbildung 4: Zusammenfassung der molekularbiologischen Prozesse während der Keimzell-Migration.....	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung der testikulären Tumorbildung.....	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der TFAP2 Proteinfamilie.....	14
Abbildung 7: Entwicklung von Keimzellen in <i>Tfap2c^{WT}</i> und <i>Tfap2c^{-/-}</i> Embryonen....	16
Abbildung 8: Methode zur Differenzierung von PGCLCs von Hayashi et al.	18
Abbildung 9: Schematische Darstellung der shRNS-Konstrukte.....	32
Abbildung 10: Differenzierung über fünf Tage von Keimzell-ähnlichen StellaGFP-positiven Zellen <i>in vitro</i>	53
Abbildung 11: Untersuchung Keimzell-spezifischer Marker in StellaGFP-positiven Zellen.....	54
Abbildung 12: Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) Analysen zur Identifizierung von direkten <i>Tfap2c</i> Zielgenen in Keimzell-ähnlichen Zellen.....	55
Abbildung 13: Schematische Darstellung zur Generation der <i>Blimp1mVenus/Tfap2c^{WT}</i> und <i>Blimp1mVenus/Tfap2c^{-/-}</i> ES-Zelllinien.....	57
Abbildung 14: Genotypisierung der <i>Tfap2c^{-/-}</i> und <i>Tfap2c^{WT}</i> ES-Zelllinien.....	58
Abbildung 15: Kultivierung von <i>Tfap2c^{-/-}</i> und <i>Tfap2c^{WT}</i> ES-Zellen in 2i- Medium....	60
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Differenzierung von PGCLCs über eine Epiblast-ähnliche Zwischenstufe (EpiLCs).....	61
Abbildung 17: Differenzierung von ES-Zellen in Epiblast-ähnliche Zellen.....	62
Abbildung 18: Differenzierung von EpiLCs in PGCLCs.....	63
Abbildung 19: <i>In vitro</i> Differenzierung von <i>Tfap2c^{-/-}</i> und <i>Tfap2c^{WT}</i> PGCLCs.....	64
Abbildung 20: Analyse der globalen Genexpression in ES-Zellen und PGCLCs....	66
Abbildung 21: Globale Genexpressionsanalyse in ES-Zellen.....	68
Abbildung 22: Differenziell exprimierte Gene in <i>Tfap2c^{-/-}</i> -PGCLCs.....	69
Abbildung 23: Gen-Ontology Analyse.....	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 24: Validierung der cDNS-Microarray Daten mittels qRT-PCR-Analyse.	73
Abbildung 25: Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) zur Identifizierung von direkten Tfpap2c Zielgenen in PGCLCs.....	75
Abbildung 26: ChIP-qPCR-Analysen in PGCLCs.....	76
Abbildung 27: Venn-Diagramm zum Vergleich der Zielgene von Tfpap2c in P19-Zellen und von deregulierten Genen in <i>Tfpap2c</i> ^{-/-} -PGCLCs.....	77
Abbildung 28: Vergleichende-Analyse der „Core-PGC“ Gene und deregulierter Gene in <i>Tfpap2c</i> ^{-/-} PGCLCs.....	78
Abbildung 29: Differenziell exprimierte Gene der Kategorie III (Zellzyklus).....	80
Abbildung 30: Analyse der Zellzyklus Phasen in PGCLCs mittels Bestimmung des DNS-Gehaltes.....	81
Abbildung 31: Analyse der Zellzyklus Phasen in Blimp1mVenus negativen Zellen mittels Bestimmung des DNS-Gehaltes.....	82
Abbildung 32: Differenziell exprimierte Gene der Kategorie V (Epigenetik).....	83
Abbildung 33: Analyse der DNS-Methylierung in PGCLCs.....	84
Abbildung 34: Untersuchung der RNS-Polymerase II abhängigen Transkription in <i>Tfpap2c</i> ^{-/-} -PGCLCs.....	85
Abbildung 35: Immunhistochemische-Färbungen von <i>Tfpap2c</i> ^{-/-} und <i>Tfpap2c</i> ^{WT} PGCLCs zur Analyse phosphorylierter Serin-Reste der CTD der RNS-Polymerase II.....	86
Abbildung 36: Transienter TFAP2C-Knockdown in TCam-2 Zellen.....	87
Abbildung 37: Stabiler TFAP2C-Knockdown in TCam-2 Zellen.....	89
Abbildung 38: Modell der Kontrolle der Transkriptions-Elongation durch Tfpap2c in Keimzellen.....	102
Abbildung 39: Modell zur Kontrolle des Zellzyklus durch Tfpap2c in Keimzellen....	105
Abbildung 40: Modell zur Rolle von Tfpap2c in der Keimzell-Entwicklung.....	112

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
°C	Grad Celcius
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
AP-2	Activator Protein-2
Bmp2/4/8b	Bone Morphogenetic Protein 2/4/8b
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Ccnd1	Cyclin D1
Cdk	Cyclin-abhängige Kinasen
Cdkn1a / p21	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor 1A
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CT	Cycle Treshold
CTD	Carboxy-terminale Domäne
Cxcl12	CXC-Motiv-Chemokin 12
Cxcr4/7	Chemokiner (C-X-C motif) Receptor 4/7
Dazl	Deleted in azoospermia-like
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Dmrt1	Doublesex and Mab-3 related Transcription factor 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
Dnd1	Dead End Homolog 1
Dnmt3a/b	DNA-Methyltransferase 3 alpha/beta
Dnmt3l	DNA-Methyltransferase 3-like
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSIF	DRB Sensitivity Inducing Factor
E	Embryonal Tag
E. coli	Escherichia coli
EB	Embryoid body
EC	Embryonal Carcinom
ECC	Embryonal Carcinoma Cells

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	Embryonic Germ Cells
Egf	Epidermal Growth Factor
Endkonz.	Endkonzentration
EpiLC	Epiblast like Cell = Epiblast ähnliche Zelle
Eras	ES Cell expressed Ras
ES	Embryonale Stammzelle
et al.	et altera = und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	fetales Kälberserum
Fgf4	Fibroblast Growth Factor 4
FoxD3	Forkhead Box D3
g	Gramm
h	Stunden
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Hox Gene	Homeobox Gene
IgG	Immunoglobulin G
Imm2lp	Inner Mitochondrial Membrane Peptidase-like 2
Jam2	Junction Adhesion Molecule 2
Kb	Kilobasenpaare
Klf4	Kruppel-like Factor 4
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
M	Molar
mg	Milligramm
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Nanos3	Nanos homolog 3
NELF	negative Elongation Factor
ng	Nanogramm

Abkürzungsverzeichnis

nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nt	Nukleotide
Oct3/4	Octamer-binding Protein 3/4
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGC	Primordial Germ Cell = primordiale Keimzelle
PGCLC	Primordial germ cells-like cell = primordiale ähnliche Keimzelle
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Prdm1/Blimp1	PR domain zinc finger protein 1 / B lymphocyte-induced maturation Protein 1
Prdm14	PR Domain zinc finger Protein 14
Prmt5	Protein Arginine Methyltransferase 5
P-TEFb	positive-Transcription Elongationfactor beta
qPCR	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
Rhox Gene	Reproductive Homeobox Gene
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Sekunden
Scf	Stem cell factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sfrp1/2	Secreted frizzled-related Protein 1/2
shRNS	Short hairpin Ribonucleic Acid
siRNS	Short interference Ribonucleic Acid
Sox2/17	SRY (sex determining region Y)-box containing Gene 2/17
Ssea1	Stage-specific Embryonic Antigen 1
Stella / Dppa3	Developmental pluripotency associated 3
TdGF1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1
TE	Tris-EDTA

Abkürzungsverzeichnis

Tet	Ten-eleven Translocation Protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSS	Transcription Start Site
U	Enzymeinheit (engl.: Unit)
Uhrf1	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger Domain 1
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Murine Keimzell-Entwicklung

Die Entstehung eines neuen Lebewesens beginnt mit der Verschmelzung der weiblichen und männlichen Gameten, deren Vorläufer die primordialen Keimzellen sind (Primordial Germ Cells = PGCs).

In der Maus findet ab dem Embryonaltag (E) 6.25 die Entwicklung der PGCs im Epiblasten statt. Die murine Keimzell-Entwicklung lässt sich in vier verschiedene Abschnitte unterteilen. Zu Beginn findet die Induktion der Keimzell-Kompetenz statt, danach erfolgt die Spezifizierung, die Migration und zum Schluss die Differenzierung in die weiblichen und männlichen Gameten in den Genitalanlagen.

1.1.1 Induktion der Keimzell-Entwicklung

Der erste Abschnitt der Keimzell-Entwicklung ist die Induktion der Keimzell-Kompetenz, bei der innerhalb des proximal-posterioren Epiblasten zwischen Tag E5.5 – E6.25 einige Zellen entlang der embryonalen/extra-embryonalen Zellgrenze, extrazelluläre Signale erhalten (Barrios et al., 2013). Diese Signale führen dazu, dass die Zellen dem somatischen Zellschicksal entgehen und in PGCs differenzieren. Diese für die Keimzell-Kompetenz essenziellen knochenmorphogenetischen Signalproteine (Bone Morphogenetic Protein; BMP) BMP2, BMP4 und BMP8b gehören der Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren (Transforming Growth Factor beta; TGF- β) an. *Bmp4* und *Bmp8b* werden vom extra-embryonalem Ektoderm exprimiert (Lawson et al. 1999; Ying et al. 2000) und *Bmp2* vom viszeralem Endoderm (Ying und Zhao, 2001). Es wurde gezeigt, dass *Bmp4* defiziente Tiere keine PGCs ausbilden (Lawson et al., 1999).

Einleitung

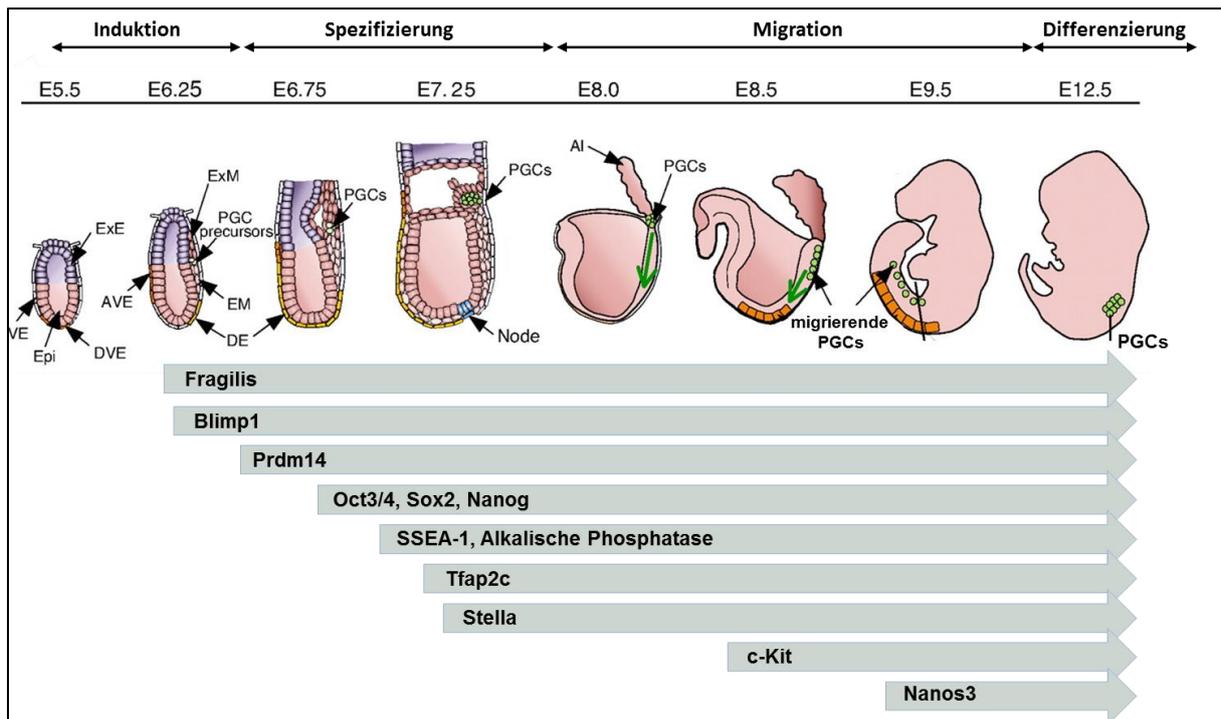


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Keimzell-Entwicklung in der Maus (modifiziert aus Saitou et al, 2012). Primordiale Keimzellen (PGCs) werden an Tag E6.25 im proximal-posterioren Epiblasten spezifiziert und wandern anschließend bis zum Tag E12.5 entlang des Urdarms in Richtung der Genitalanlagen. Der Zeitpunkt des Expressionsbeginns wichtiger Keimzell-Marker ist durch graue Balken dargestellt. AI = Allantois; AVE = Anteriore viszerale Endoderm; DE = Distales Endoderm; DVE = Distales viszerale Endoderm; EM = Embryonales Mesoderm; Epi = Epiblast; ExE = Extraembryonales Ektoderm; ExM = Extraembryonales Mesoderm; PGC = Primordiale Keimzelle; VE = Viszerales Endoderm.

Bei *Bmp8b* Nullmutanten mit einem gemischten genetischen Hintergrund (129/Sv-Black Swiss) zeigen etwa die Hälfte der untersuchten Tiere einen Keimzellverlust, wohingegen im genetischen C57BL/6 Hintergrund der Verlust der PGCs alle Tiere betrifft (Ying et al., 2000). Bei *Bmp2* heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) Mausembryonen im genetischen C57BL/6 Hintergrund zeigt sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der PGCs (Ying und Zhao, 2001). Ebenso kommt es bei einer Deletion der Mediatoren des BMP-Signalweges, den Smad1/4/5-Proteinen, zu einer Reduktion der Keimzellen (Chang & Matzuk 2001; Tremblay et al. 2001; Chu et al. 2004). Als Antwort auf die Stimulation mit BMP-Signalproteinen kommt es in Zellen des posterioren, proximalen Epiblasten zur Expression von Interferon-induziertem Transmembranprotein 3 (Fragilis/ Ifitm3) (Saitou et al., 2002). Zudem werden in diesen Zellen zu diesem Zeitpunkt Homeobox (Hox)-Gene wie *Evx1*, *Hoxa1*, *Hoxb1* exprimiert (Saitou et al., 2005).

1.1.2 Spezifizierung der primordialen Keimzellen

Die Fragilis-positiven Zellen im posterioren, proximalen Epiblasten und die angrenzenden somatischen Zellen weisen an Tag E6.25 noch ein ähnliches Genexpressionsprofil auf, welches mit einem mesodermalen Zellschicksal assoziiert ist. Die Keimzell-Spezifikation erfolgt in einer Subpopulation dieser Zellen, welche der somatischen Differenzierung entgehen, indem das somatische Differenzierungsprogramm reprimiert wird. Um den Tag E6.25 wird in diesen Zellen, ebenfalls durch BMP-Signale, die Expression von *Blimp1* (B Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1 oder Prdm1) induziert. Blimp1 ist ein transkriptioneller Repressor, welcher in den Fragilis-positiven Zellen das somatische Differenzierungsprogramm reprimiert, insbesondere Gene wie *Hoxa1* und *Hoxb1*, die mit der mesodermalen Differenzierung assoziiert sind. Infolgedessen kommt es zur Induktion der Keimzell-Spezifizierung (Saitou et al. 2002; Ohinata et al. 2005; Yamaji et al. 2008; Yabuta et al. 2006) (Abbildung 1).

Blimp1 gehört der Familie der PR-Domäne-Zinkfinger-Proteine an und kann mittels der PR-Domäne Histon-Modifikationen vornehmen. Zudem wurde gezeigt, dass Blimp1 in Keimzellen mit der Protein-Arginin-Methyl-Transferase 5 (Prmt5) interagiert und der Blimp1/Prmt5 Komplex eine symmetrische Dimethylierung des Arginin 3 der Histone H2A und H4 (H2A/H4R3me2) etabliert (Ancelin et al., 2006; Zhao et al., 2009).

Des Weiteren reprimiert Blimp1 die Expression von DNS-Methyltransferasen (Dnmt3a/b) und Zellzyklus-assoziierten Genen, welche bei der G1-S Phasen Transition beteiligt sind, wie *Ccnd1*, *Ccne1* (Abbildung 2). Neben einer repressiven Rolle von Blimp1 bei der Keimzell-Spezifizierung werden einige Gene, die in frühen Stadien der Keimzell-Spezifizierung exprimiert werden, durch Blimp1 induziert. Hierzu zählen Gene wie *Prdm14*, *Tfap2c*, *Nanos3* und *c-Kit* (Kurimoto et al., 2008a). In Blimp1-defizienten Mausembryonen konnte ein kompletter Verlust der Keimzellen beobachtet werden, wobei die Keimzellen anfänglich spezifiziert werden, diese aber weder migrieren noch proliferieren und das Keimzellschicksal nicht aufrechterhalten können. Dies resultiert aus der mangelnden Repression somatischer Gene. Während Blimp1 insbesondere für die Repression der somatischen Differenzierung und die damit verbundene Aufrechterhaltung des Zellschicksals der PGCs essenziell ist, ist ein weiteres PR-Domäne-Zinkfinger-Protein Prdm14 für die Reaktivierung von Pluripotenz-Faktoren in den Keimzellen verantwortlich (Ancelin et al. 2006; Yamaji et

Einleitung

al. 2008). Die *Prdm14* Expression wird ab dem Tag E6.5 in den PGCs ebenfalls durch BMP-Signale induziert. Im *Prdm14*^{-/-} Embryonen konnte ein kompletter Verlust der Keimzellen am Tag E12.5 beschrieben werden (Yamaji et al., 2008). Außerdem wurde gezeigt, dass *Prdm14* ebenfalls durch Repression von DNS-Methyltransferasen und einiger somatischer Gene (*Hoxb1*, *Brachyury*) die Keimzell-Spezifikation fördert (Grabole et al., 2013).

Kürzlich publizierte *in vitro* Studien der Keimzell-Spezifizierung zeigen, dass ektopische Expression von *Prdm14*, das Keimzell-Schicksal induzieren kann. Hingegen war eine ektopische Expression von *Blimp1* alleine, bei diesen *in vitro* Experimenten nicht in der Lage, die Keimzell-Differenzierung zu induzieren (Nakaki et al., 2013).

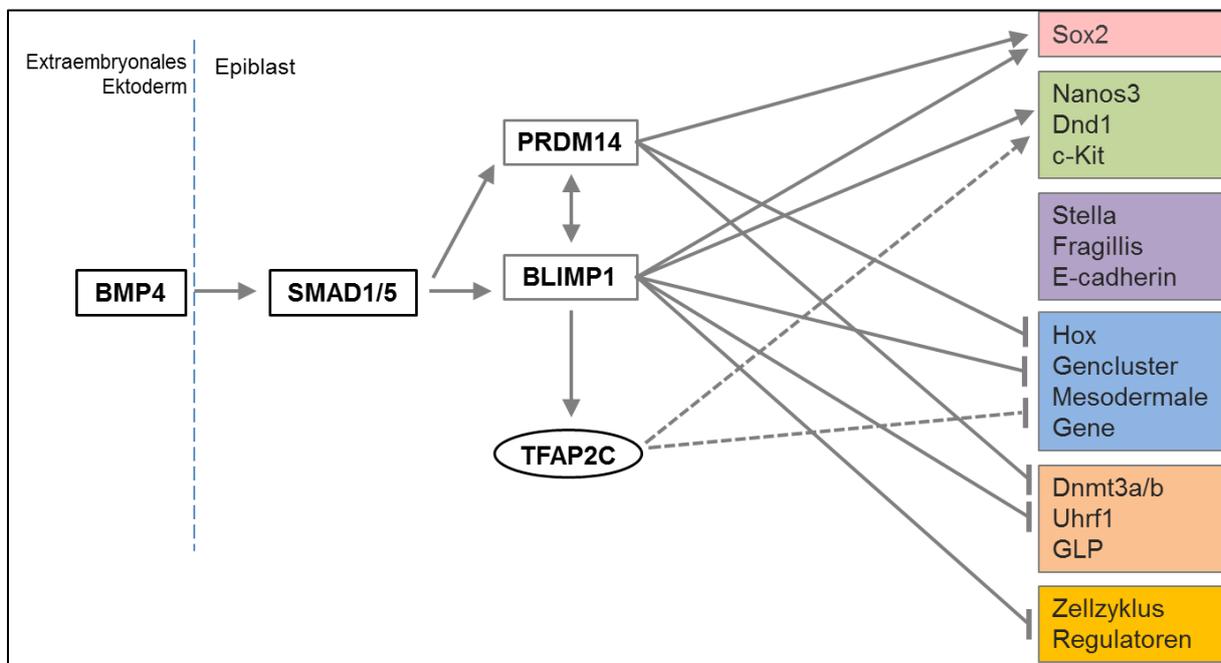


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Keimzell-Spezifikation, welche durch die beiden PR-Domain Proteine Blimp1 und Prdm14 etabliert wird (modifiziert aus Saitou & Yamaji 2010). Schwarze Pfeile zeigen genetische Signalwege die durch Prdm14 oder Blimp1 aktiviert werden und Balken die Repression eines Signalweges. Die gepunkteten Linien weisen darauf hin, dass die Aktivierung bzw. Repression durch den Transkriptionsfaktor Tfp2c bis zu diesem Zeitpunkt auf *in vitro* Experimenten und Hypothesen beruhen.

Zusammen mit Blimp1 und Prdm14 ist der Transkriptionsfaktor Tfp2c (Tcfap2c oder AP-2 γ) der dritte essenzielle Faktor während der Keimzell-Entwicklung (Abbildung 2). Der Promotorbereich von *Tfp2c* wird direkt von Blimp1 gebunden, was die Expression von *Tfp2c* induziert (Weber et al. 2010; Magnúsdóttir et al. 2013).

Einleitung

An Tag E7.25 haben sich ca. 40 PGCs gebildet, welche Keimzell-spezifische Gene wie das DNS bindende Protein *Stella* (oder Developmental Pluripotency Associated 3; *Dppa3*) (Saitou et al., 2002), die Alkalische Phosphatase (Ginsburg et al., 1990), den Oberflächenmarker SSEA-1 (Fox et al., 1981), das RNS-Bindeprotein *Dnd1* (Dead End Homolog 1) (Youngren et al., 2005) und das Keimzell-spezifische Gen *Nanos3* (Tsuda et al., 2003) exprimieren (Abbildung 1). In *Nanos3*^{-/-} Mausembryonen konnte im Gegensatz zu *Prdm14*^{-/-} und *Blimp1*^{-/-} Embryonen ein früher Keimzell-Verlust durch Apoptose nachgewiesen werden, welcher sowohl durch Bax-abhängige als auch durch Bax-unabhängige Mechanismen erfolgt (Suzuki et al., 2008).

1.1.3 Migration der Keimzellen

Kurz nach der Spezifizierung beginnen die PGCs mit der Migration. Diese kann in drei Phasen unterteilt werden. Während der ersten Migrationsphase zwischen dem Tag E7.5 – E9.0 wandern die PGCs ausgehend von der Allantois entlang des sich entwickelnden Urdarms (De Felici, 2009) (Abbildung 3). In der zweiten Phase (E9.5 – E10.5) verlassen die Keimzellen den Urdarm und migrieren in Richtung der Genitalanlagen, während sie chemokinen Signalen folgen, die von den umliegenden somatischen Zellen exprimiert werden. Zu diesen Signalen gehören unter anderem BMPs, welche die Expression des Stem Cell Factors (SCF) in Zellen entlang des Urdarms und in den Genitalanlagen regulieren (Dudley et al., 2010). SCF ist der Ligand der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit, welche auf der Oberfläche von migrierenden Keimzellen exprimiert wird (Runyan et al. 2006; Gu et al. 2009). Bei einer Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors, wodurch eine intrazelluläre Signalkaskade (PI3K/Akt Signalweg) aktiviert wird, die zu einer gerichteten Migration der Keimzellen durch Neuordnung der Aktin-Filamente führt (Farini et al., 2007). Während der Migration konnten in SCF Nullmutanten weniger PGCs und eine erhöhte Apoptoserate in der Allantois beobachtet werden (Runyan et al. 2006; Gu et al. 2009).

Keimzellen die nicht normal migrieren und entlang der Körpermittellinie verbleiben, werden mittels intrinsischer Apoptose-Signalwege eliminiert. Dieser Prozess ist von großer Bedeutung, da vermutet wird, dass eine Keimzelle, welche der Apoptose entlang der Körpermittellinie entkommen ist, der Ursprung für extragonadale

Einleitung

Keimzelltumore des Typs I (Kapitel 1.2.1) ist (Runyan et al., 2006; Schneider et al., 2001; Ueno et al., 2004).

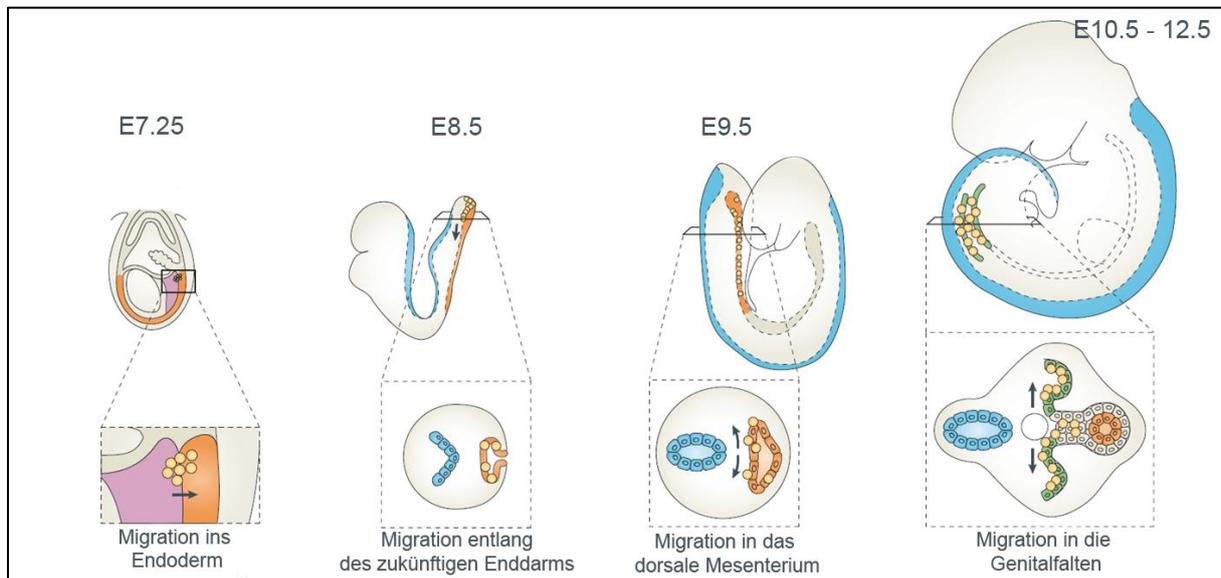


Abbildung 3: Verlauf der Migration von Keimzellen während der Embryonalentwicklung (modifiziert aus (Richardson und Lehmann, 2010)). Am Tag E7.25 migrieren die Keimzellen (gelb) vom Primitivstreifen (lila) ins Endoderm (orange). Anschließend erfolgt bis zum Tag E9.5 die Migration entlang des sich entwickelnden Urdarms bis zum Eintritt der Keimzellen in das dorsale Mesenterium. Am Ende der Migrationsphase kolonisieren die Keimzellen die Genitalfalten (grün).

Die intrinsischen Apoptose-Signalwege, welche die pro-apoptotischen Proteine Bax, Bak, Bad, Bim und Caspase3 umfassen, werden als Folge der Abwesenheit des c-Kit-Liganden aktiviert. Dieser wird an Tag E10.5 nur noch im Bereich der Genitalfalten, also lateral der Körpermittellinie exprimiert und unterdrückt dort die Aktivierung der Apoptose-Signalwege. In Bax Nullmutanten konnte ein signifikanter Anstieg ektopischer Keimzellen detektiert werden (Runyan et al., 2006).

Als weitere Signalgeber bei der Keimzell-Migration wurden der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 4 (Cxcr4) und sein Ligand der Stromal-derived Factor 1 (Sdf1 oder Cxcl12 (C-X-C Motif Ligand 12)) beschrieben (Molyneaux et al. 2003). Ding et al. konnten zudem Cholesterol als Signalmolekül für das Überleben und die Migration der Keimzellen *in vitro* identifizieren. Es wird angenommen, dass Cholesterol entweder die Wachstumsfaktor-Rezeptoren innerhalb der Keimzellen positioniert oder die Freisetzung der für die Keimzell-Migration wichtigen Wachstumsfaktoren kontrolliert (Ding et al., 2008).

In der dritten Phase der Migration (E10.5 – E12.5) findet die Kolonisierung der Gonaden statt (Abbildung 3). Hierbei spielen ebenfalls Cxcr4 und sein Ligand Cxcl12

Einleitung

eine Rolle. Molyneaux et al. konnten zeigen, dass in Embryonen mit einer homozygoten Mutation im *Cxcr4*-Gen eine drastische Reduktion der Keimzellen bei der Besiedelung der Genitalanalagen stattfindet (Molyneaux et al. 2003).

Zu Beginn der Migration können ungefähr 40 Keimzellen detektiert werden, während es an Tag E9.5 schon 250 Zellen sind und an Tag E10.5 1000 Zellen. Gegen Ende der Migrationsphase befinden sich ca. 25000 Keimzellen in den Gonaden (E13.5) (Tam und Snow, 1981). Während der ersten migratorischen Phase zwischen Tag E7.5 und E9.5 finden in den Keimzellen drei wichtige Prozesse statt, welche die Epigenetik, den Zellzyklus und die Kontrolle der Transkription beeinflussen. Es kann neben einer genomweiten DNS-Demethylierung auch eine umfangreiche Änderung von Histon-Modifikationen in den Keimzellen beobachtet werden, während in den umliegenden somatischen Zellen der epigenetische Status beibehalten wird.

Zu Beginn der Migration wird in den Keimzellen die Expression der Histon-Methyltransferasen G9a und GLP reduziert, welches in einem Verlust der repressiven Histon-Modifikationen H3K9me1 und H3K9me2 resultiert. Zur Kontrolle der Transkription nach Verlust dieser repressiven Histon-Modifikationen, wird in den Keimzellen die RNS-Polymerase II abhängige Transkription inhibiert (Seki et al., 2007). Ab dem Tag E8.25 nimmt die H3K27-Trimethylierung zu, welche gegen Ende der Migrationsphase die Repression der Genexpression übernimmt (Saitou et al., 2012) (Abbildung 4).

Die Transkription verläuft in drei Phasen, der Initiation, der Elongation und der Termination und wird in allen Phasen unterschiedlich reguliert. Die RNS-Polymerase II ist dabei der Regulator zum Zeitpunkt der Elongation (Saunders et al. 2006). Während der Elongation kommt es zur Hyperphosphorylierung der Carboxyterminalen-Domäne (CTD) der RNS-Polymerase II an den Serin-Resten 2, 5 und 7. Dies resultiert in Konformationsänderungen der RNS-Polymerase II und in der Bindung anderer Elongationskomplexfaktoren (Saunders et al. 2006). Die Phosphorylierung von Serin 5 (Ser5) und Serin 7 (Ser7) der CTD erfolgt durch die Cyclin-abhängige Kinase 7 (Cdk7) und den positive Transcription Elongation Factor b (P-TEFb) (dieser setzt sich zusammen aus Cdk9 und den Cyclinen T1/T2) und führt zur Initiation des Elongationsprozesses. Dagegen vermittelt die Phosphorylierung von Serin 2 (Ser2) durch die Cyclin-abhängigen Kinasen Cdk8, Cdk12 und Cdk13 die anschließende Elongation (Ghamari et al. 2013; Heidemann et al. 2013, Jeronimo et al. 2013). Die beiden Faktoren DRB Sensitivity Inducing Factor (DSIF) und negative

Einleitung

Elongation Factor (NELF) blockieren den Elongationsprozess. Durch P-TEFb können diese phosphoryliert und dadurch inaktiviert werden (Fuda et al., 2009).

Interessanterweise konnten in PGCs an Tag E8.75 nur geringe Level einer Phosphorylierung der Ser2- und Ser5-Reste nachgewiesen werden, welches für eine verminderte Transkriptions-Elongation spricht (Seki et al., 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Blimp1 an die Promotoren von 2364 Genen bindet, welche ebenfalls durch eine Untereinheit von NELF gebunden werden (Magnúsdóttir et al., 2013). Blimp1 könnte auf diese Weise die Phosphorylierung von NELF und die damit verbundene Inaktivierung dieses Faktors verhindern. Dies würde zur Blockierung der Transkriptions-Elongation führen und als Folge zur Repression der Genexpression.

Die globale DNS-Demethylierung in migrierenden Keimzellen wird zum einen durch die Repression der *de novo* DNS-Methyltransferasen Dnmt3a/b und dem PHD- und RING-Finger-Domäne Protein Uhrf1 etabliert und zum anderen durch den Verlust von 5-Methylcytosin (5mC) (Hajkova et al., 2002; Yamaguchi et al., 2013). In Säugerzellen wird 5mC durch Oxidation mit Hilfe der Ten-eleven Translocation (Tet1 – 3) Proteine in 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) konvertiert (Wu and Zhang, 2011). Zu Beginn der Keimzell-Migration (E7.5 – E9.5) findet ein 5mC-Verlust in einer Tet-unabhängigen Reaktion statt (Abbildung 4). Ab dem Tag E10.5 ändert sich dieser Mechanismus, da nun eine Induktion der Tet1 und Tet2 Expression in den PGCs stattfindet. Es kommt zur aktiven Demethylierung durch die Tet-Proteine (5mC wird in 5hmC konvertiert). In den Genitalanlagen erfolgt dann in den PGCs eine passive Demethylierung durch Replikations-abhängigen Verlust von 5hmC (Yamaguchi et al., 2013).

Des Weiteren findet in migrierenden PGCs zwischen dem Tag E7.5 bis E9.5 ein Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus statt (Seki et al. 2007; Hayashi et al. 2011).

Einleitung

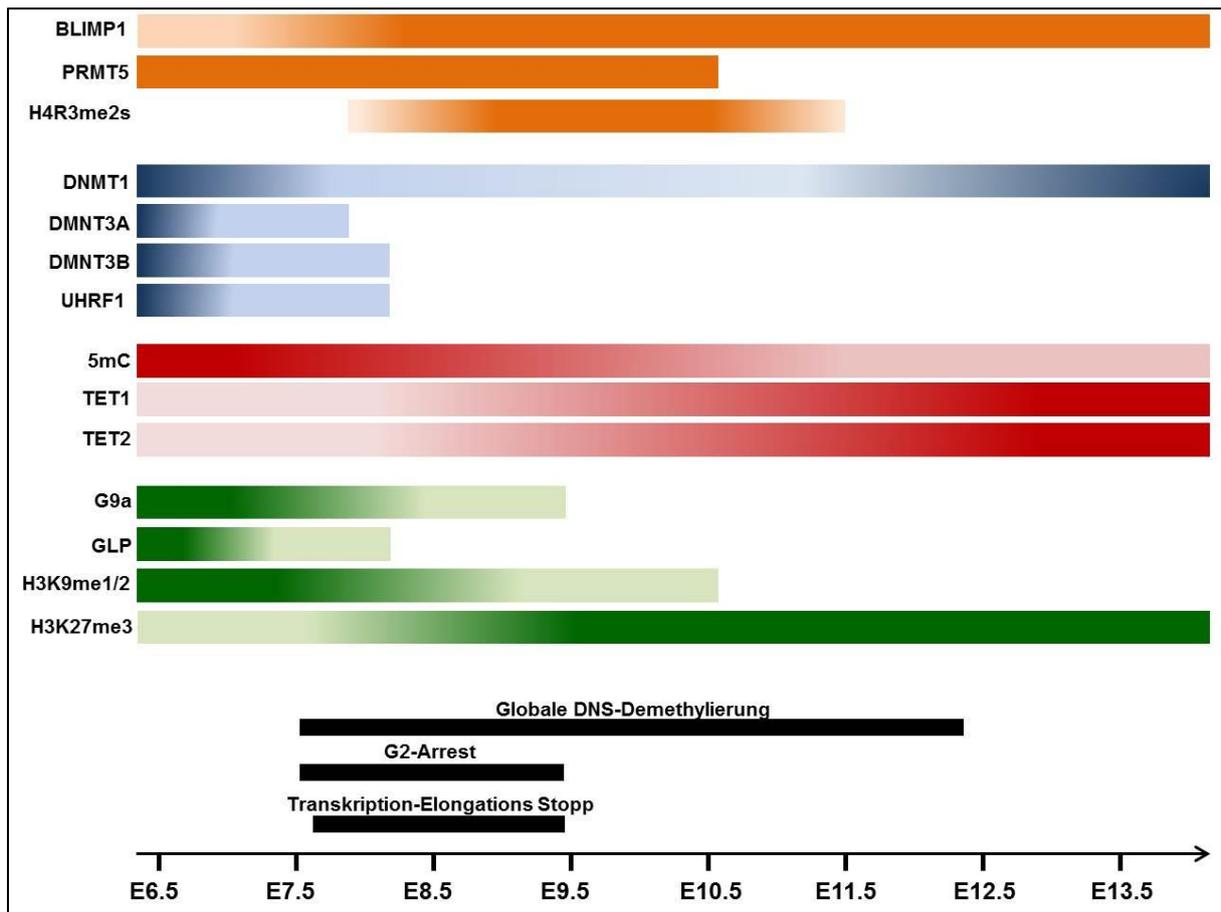


Abbildung 4: Zusammenfassung der molekularbiologischen Prozesse während der Keimzell-Migration (modifiziert nach Saitou et al, 2012). Die Expression von Blimp1, Prmt5 und Stella während der Keimzell-Migration (orangene Balken). Blimp1/Prmt5 etablieren die symmetrische H4R3 Trimethylierung (orangener Balken). Zu Beginn der Migration findet durch Reduktion der Methyltransferasen (blaue Balken) eine globale DNS-Demethylierung statt. Durch Heraufregulation der Tet-Proteine findet eine Oxidation von 5mC zu 5hmC statt (rote Balken). Dies führt zum Verlust von 5mC (roter Balken). G9a und GLP (grüne Balken) werden während der Migration herunterreguliert, was zu Verlust von H3K9me1/2 führt. Ab Tag E8.25 nimmt die H3K27-Trimethylierung (grüner Balken) zu. Zu der globalen DNS-Demethylierung findet während der Migration in den Keimzellen ein Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase und ein Abbruch der Transkriptions-Elongation statt (schwarze Balken).

1.1.4 Sexuelle Differenzierung der Keimzellen in den Genitalanlagen

Kurz nach Erreichen der Genitalfalten werden frühe Keimzell-spezifische Marker wie die Alkalische Phosphatase, *SSEA-1*, *Nanos3* und die Pluripotenz-Marker *Nanog*, *Sox2* und *Oct3/4* herunterreguliert (Yabuta et al., 2006), wohingegen späte Keimzell-Marker hochreguliert werden. Hierzu zählen das Germ Cell Nuclear Antigen 1 (*Gcna1*) (Enders and May, 1994), Deleted in Azoospermia like Protein (*Dazl*) (Saunders et al., 2003) und das Maus Vasa Homolog (*Mvh*) (Toyooka et al., 2000). Zu diesem Zeitpunkt unterscheiden sich männliche und weibliche Keimzellen in Bezug auf ihre Morphologie nicht. Die sexuelle Differenzierung beginnt erst nach der Kolonisierung der Gonaden. Ab dem Tag E12.5 wird in den weiblichen Keimzellen das durch Retinsäure aktivierte Gen *Stra8* (stimulated by retinoic acid gene 8)

Einleitung

exprimiert und der Eintritt in die Meiose initiiert (Koubova et al., 2006; Oulad-abdelghani et al., 1996). Retinsäure wird zu diesem Zeitpunkt im Mesonephros produziert und gelangt vermutlich über den anterior gelegenen Urnierengang in die Gonaden (Feng et al., 2013). Die männlichen Keimzellen treten zunächst in einen G0/G1 Zellzyklus-Arrest und beginnen nach der Geburt mit mitotischer und anschließend mit meiotischer Teilung (Western et al., 2008). In weiblichen Keimzellen werden im Verlauf der Entwicklung weitere Meiosemarker wie *Sycp3* und *Dmc1* exprimiert (Heyting et al. 1988; Pittman et al. 1998).

In den männlichen Keimzellen wird die Retinsäure durch den Retinsäure-Antagonist Cytochrom p450 (Cyp26B1) abgebaut und eine Induktion der *Stra8* Expression verhindert (Koubova et al., 2006). Zudem wird die *Stra8* Expression in den männlichen Keimzellen durch Doublesex und Mab-3 Transkriptionsfaktor 1 (Dmrt1) inhibiert. Auf diese Weise wird der Eintritt in die Meiose verhindert und eine korrekte Differenzierung und Proliferation der Spermatogonien gewährleistet (Matson et al., 2010). Als weiterer Faktor wurde das RNS-Bindeprotein Nanos2 beschrieben, welches ebenfalls die Meiose unterdrückt und so das männliche Keimzell-Schicksal aufrechterhält (Suzuki et al., 2008).

Bei Ankunft der Keimzellen in den Genitalanlagen kommt es zu einer epigenetischen Reprogrammierung, bei der das biparentale Imprintingmuster gelöscht wird. Anschließend wird das Genom entsprechend des Geschlechtes des Embryos remethyliert. Außerdem erfolgt die Reaktivierung des X-Chromosoms, welches aus Gründen der Gendosis nach der Spezifizierung (E6.5) in weiblichen somatischen Zellen und Keimzellen inaktiviert wird (Ewen and Koopman, 2010). In den Genitalanlagen kommt es dann in den weiblichen Keimzellen zu einer Reaktivierung des inaktivierten X-Chromosoms zwischen dem Tag E11.5 und E13.5. Dies gewährleistet eine korrekte Expression X-chromosomaler Gene (Surani, 2001). Anschließend erfolgt in den weiblichen Keimzellen eine erneute X-Chromosom Inaktivierung, wobei zufällig entweder das väterliche oder das mütterliche X-Chromosom ausgeschaltet wird (Bowles and Koopman, 2010).

1.2 Keimzelltumore und Keimzelltumorentwicklung

Keimzelltumore sind eine heterogene Gruppe von Neoplasien beim Menschen, die in den westlichen Industrienationen Europas und Nordamerikas die häufigsten

Einleitung

Malignome von Männern im Alter zwischen 20 und 40 Jahren darstellen und eine ansteigende Inzidenz aufweisen (Oosterhuis & Looijenga 2005; Huyghe et al. 2003). Als Risikofaktoren wurden Kryptorchismus, testikuläre Atrophie (Verkümmerung) und familiäre Prädisposition beschrieben (Oosterhuis & Looijenga 2005). Zudem konnten Umwelteinflüsse wie Pestizide und Insektizide, sowie ein erhöhter Östrogenlevel während der Schwangerschaft, mit dem Auftreten von Keimzelltumoren in Verbindung gebracht werden (Depue et al. 1983; Giwercman & Giwercman 2011). Keimzelltumore können sowohl in den weiblichen als auch männlichen Gonaden und extragonadal entlang der Körpermittelachse auftreten, was dem Migrationsweg der PGCs während der Embryonalentwicklung entspricht. Im klassischen Modell der Keimzelltumorentwicklung können unterschiedliche Tumortypen entsprechend ihres Expressionsmusters oder anhand ihres genetischen Imprintingmusters einem Differenzierungsstatus der Keimzellen zugeordnet werden (Schneider et al., 2001).

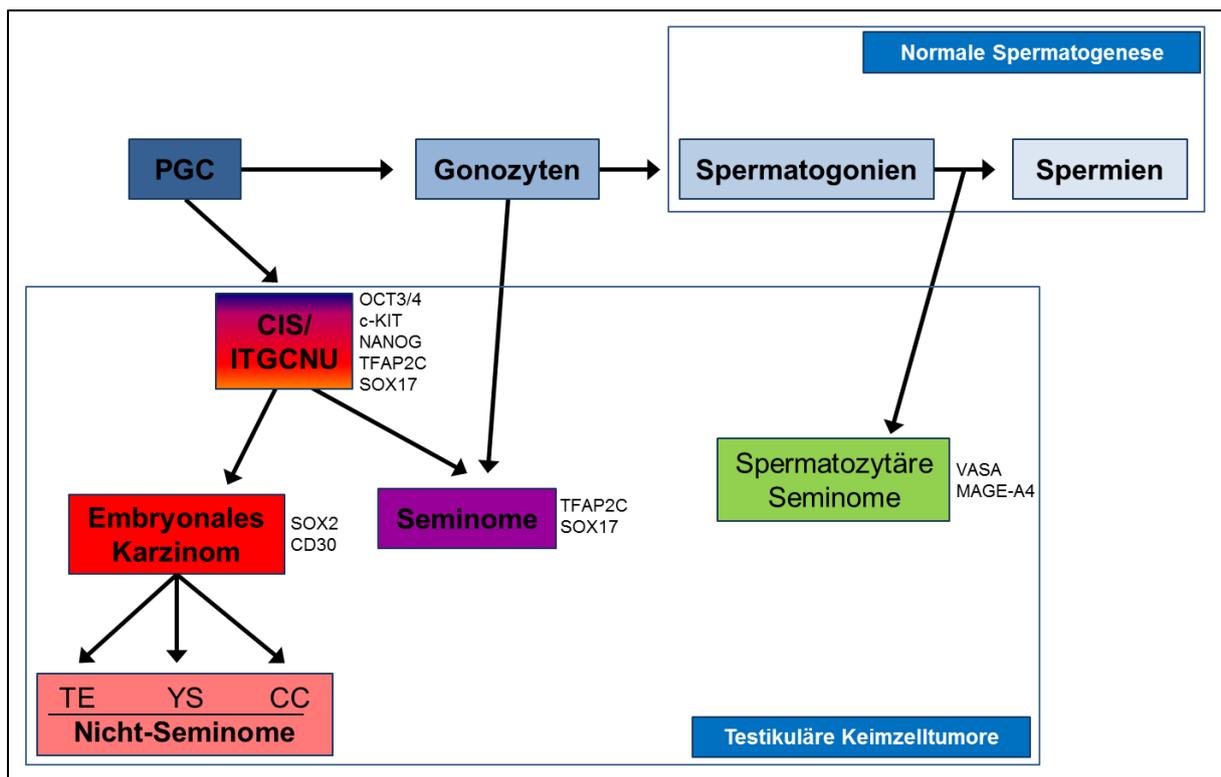


Abbildung 5: Schematische Darstellung testikulärer Keimzelltumor-Bildung (modifiziert aus Rajender, Avery, & Agarwal, 2011). Die Keimzelltumovorläuferläsion CIS/ITGCNU geht auf eine entartete primordiale Keimzelle (PGC) zurück. Diese kann in ein Seminom oder embryonales Karzinom/ Nicht-Seminom differenzieren. Die Vorläuferzellen der spermatozytären Seminome sind Spermatozyten. TE = Teratome, YS = Dottersacktumore, CC = Chorionkarzinom.

Einleitung

Als Ursprung der Seminome und embryonalen Karzinome (Nicht-Seminome) wird das Carcinoma-in-situ (CIS) oder ITGCNU (intratubular germ cell neoplasia unclassified) angesehen, welches erstmals von Skakkebaek (1972) beschrieben wurde (Abbildung 5). Das CIS wird auf eine Entwicklungsstörung in den Keimzellen während der embryonalen Entwicklung zurückgeführt. Gonozyten, die nicht in Spermatogonien differenzieren, persistieren im Hoden. Mit Beginn der Pubertät steigt der Testosteronspiegel an und führt aufgrund von Proliferationsinduktion zu einem CIS. Dabei exprimieren CIS-Zellen Gene, die mit PGCs assoziiert werden können, wie *TFAP2C*, *C-KIT*, *NANOG* und *OCT3/4* (Hoei-Hansen et al. 2004; Pauls et al. 2005; Rajpert-De Meyts & Skakkebaek 1994).

Zudem gibt es eine Hypothese zur Entstehung des CIS/ITGCNU basierend auf Amplifikationen spezifischer Regionen des kurzen Arms des Chromosoms 12 (Rosenberg et al., 2000). In diesem Genlokus liegen Pluripotenz-assoziierte Gene (*NANOG* und *GDF3*), Zellzyklus-assoziierte Gene (*CCND2* und *CDK4*) und das Onkoprotein *K-RAS*. Eine Deregulation in diesen Genen kann zur Entstehung eines CIS/ITGCNU beitragen (Looijenga & Oosterhuis 1999).

Die embryonalen Karzinome können in Teratome, Dottersacktumore oder Chorionkarzinome differenzieren und gelten als malignes Gegenstück zu pluripotenten, embryonalen Stammzellen (Abbildung 5).

Nach der WHO (World Health Organisation) können die Keimzelltumore in fünf Typen (Typ I - V) unterteilt werden (zusammengefasst in Oosterhuis & Looijenga 2005). In den nächsten Kapiteln werden die Typen I und II kurz vorgestellt.

1.2.1 Typ I Keimzelltumore

Typ I Keimzelltumore können sowohl gonadal als auch extragonadal auftreten und umfassen die Teratome und Dottersacktumore bei Säuglingen, Kindern und präpubertären Jugendlichen. Sie machen 3,5% aller Tumore bei Kindern unter 15 Jahren aus, was einer Inzidenz von 0,5 pro 100.000 Kindern entspricht (Kaatsch, 2004).

Die Teratome enthalten meist Gewebe aus allen drei Keimblättern (Ektoderm, Entoderm und Mesoderm) und können entsprechend ihres Differenzierungsgrades in reife und unreife Teratome eingeteilt werden. Während reife Teratome meistens bei Kleinkindern auftreten, können bei jungen Erwachsenen oft Mischformen aus unreifen und reifen Teratomen nachgewiesen werden. Da die Teratome ein

biparentales, nur teilweise aufgehobenes genomisches Imprintingmuster besitzen, werden frühe migratorische Keimzellen als Ursprungszellen der Typ I Tumore angesehen (Bussey et al. 2001; Schneider et al. 2001). Bei den Dottersacktumoren handelt es sich um maligne und metastasierende Tumore.

Für den Keimzelltumortyp I gibt es einige Mausmodelle. Der Inzuchtstamm 129/Sv entwickelt mit einer Wahrscheinlichkeit von 5 - 10% spontan testikuläre Teratome (Stevens 1967; siehe Review Carouge & Nadeau 2005). Hierbei werden vermehrt unilaterale Tumore gefunden und nur wenige der Fälle zeigen bilaterale Tumorformation (Dieckmann und Pichlmeier, 2004). Während der murinen Embryonalentwicklung konnte der Ursprung der testikulären Tumorentstehung zwischen dem Tag E11.5 und E13.5 nachgewiesen werden. Es wurden synzytiale Gonozyten detektiert, die vermutlich aufgrund von Störungen im Zellzyklus, des mitotischen Arrests oder einer Deregulation von Genen entstanden sind und als Embryonale Karzinomzellen (Embryonal Carcinoma Cells; ECC) bezeichnet werden. Diese wurden von Pierce et al. beschrieben und ähneln morphologisch undifferenzierten Keimzellen (Pierce et al., 1967).

1.2.2 Typ II Keimzelltumore

Die Typ II Keimzelltumore beinhalten die klassischen Seminome (im Ovar: Dysgerminome, im Gehirn: Germinome) und die Nicht-Seminome/ embryonalen Karzinome, die sich beide aus einem CIS/ITGCNU entwickeln (Oosterhuis und Looijenga, 2005).

Seminome ähneln sowohl morphologisch als auch in ihrem Expressionsprofil PGCs, da sie Keimzellmarker wie *c-KIT*, *TFAP2C*, *BLIMP1* und die Pluripotenz-Marker *OCT3/4* und *NANOG* exprimieren. Des Weiteren zeigen sie ein komplett gelöscht Imprintingmuster, welches ebenfalls in post-migratorischen Keimzellen zu finden ist (Netto et al., 2008). Die embryonalen Karzinome können weiter in Teratome, Dottersacktumore oder Chorionkarzinome differenzieren. Das embryonale Karzinom kann aufgrund der Expression von *SOX2* und *CD30* von den Seminomen unterschieden werden, da diese *SOX17* exprimieren (de Jong et al., 2008) (Abbildung 5).

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde ein Mausmodell für diesen Keimzelltumortyp beschrieben. Dabei handelt es sich um ein Transplantationsmodell, bei dem eine humane Seminomzelllinie (TCam-2) in die Tubuli Seminiferi von immunsupprimierten

Einleitung

Nacktmäusen injiziert wurde und diese anschließend in CIS/Seminom-ähnliche Zellen differenzierten (Nettersheim et al., 2012).

1.3 Die Familie der Tfab2 Transkriptionsfaktoren

Die Familie der Tfab2 oder AP-2 (Aktivator Protein 2) Transkriptionsfaktoren binden sequenzspezifisch an die DNS und regulieren auf diese Weise die Expression von Genen.

Es wurden fünf konservierte *Tfab2* Gene im Menschen und der Maus identifiziert: *Tfab2a/AP-2 α* (Williams et al., 1988), *Tfab2b/AP-2 β* (Moser et al., 1995), *Tfab2c/AP-2 γ* (Oulad-Abdelghani et al., 1996), *Tfab2d/AP-2 δ* (Zhao et al., 2003) und *Tfab2e/AP-2 ϵ* (Feng und Williams, 2003).

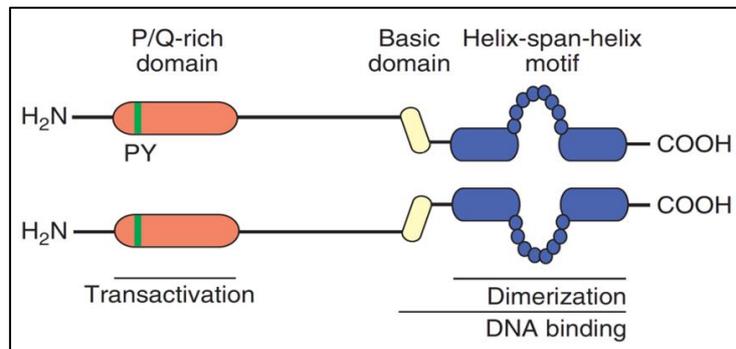


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der Tfab2 Proteinfamilie (aus Eckert et al., 2005). N-Terminus besitzen die Tfab2 Proteine eine Prolin- und Glutamin-reiche Region mit einem PY-Motiv, welche für die Transaktivierung zuständig ist. C-Terminus befindet sich ein Helix-Span-Helix Motiv und eine basische Domäne, welche die Dimerisierung und DNS-Bindung gewährleisten.

Alle Mitglieder der Tfab2 Familie besitzen eine ähnliche Domänenstruktur. Hierzu zählt die für eine Dimerisierung zuständige carboxyterminale Domäne, die sich aus einem Helix-Span-Helix Motiv zusammensetzt. Zusammen mit der hochkonservierten basischen Region dienen diese Domänen der DNS-Bindung. Am N-Terminus besitzen Tfab2a, Tfab2b, Tfab2c und Tfab2e eine konservierte Transaktivierungsdomäne, bestehend aus einem PY-Motiv, welches einen hohen Anteil der Aminosäuren Prolin und Glutamin aufweist (Williams & Tjian 1991). Tfab2d besitzt kein PY-Motiv, was daraufhin deutet, dass Tfab2d eine geringere Bindeaffinität zu konservierten Tfab2-Bindestellen aufweist (Zhao et al., 2003).

Durch Homo- und Heterodimerisierung der Tfab2-Proteine kann an hochkonservierten GC-reichen Sequenzabschnitten eine Bindung an die DNS

erfolgen. Mohibullah et al. beschreiben die Konsensussequenzen 5'-GCCN_{3/4}GGC-3' und 5'-GCCN_{3/4}GGG-3' als konservierte Bindestellen für Tfp2 Proteine (Mohibullah et al., 1999) und eine weitere Studie zeigt eine Bindung von Tfp2 an die Konsensussequenz 5'-CCCCAGGC-3' im SV40 Enhancer Element (Mitchell et al., 1987). Dies macht deutlich, dass Tfp2 Transkriptionsfaktoren an verschiedene GC-reiche Sequenzregionen binden können. Als Bindepartner für Tfp2 Proteine konnten unter anderem p53, Cited2/4, APC, p300/CBP, SP1 und das Rb-Protein identifiziert werden (Eckert et al. 2005).

Eine Expression der *Tfp2* Familienmitglieder *Tfp2a*, *Tfp2b* und *Tfp2c* konnte in Neuralleistenzellen, im peripheren Nervensystem, im Kopf- und Gliedmaßenmesenchym, in verschiedenen Epithelien und im extra-embryonalen Trophektoderm während der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden (Chazaud et al. 1996; Schorle et al. 1996; Moser et al. 1997). Die weiteren zwei Familienmitglieder weisen ein anderes Expressionsmuster auf. *Tfp2d* wird im Zentralnervensystem, in der Retina und während der Herzentwicklung exprimiert, wohingegen *Tfp2e* im Mittelhirn, Hinterhirn und im olfaktorischen System exprimiert wird (Wang et al. 2004; Zhao et al. 2003).

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Tfp2-Proteine eine wesentliche Rolle bei der Karzinogenese spielen, indem sie Gene wie *p21Waf1/Cip1* (Li et al., 2006; Williams et al., 2009a), *TGF- α* (Wang, 1997), Estrogenrezeptor (McPherson und Weigel, 1999), *BCL-2* (Wajapeyee et al., 2006), *c-Kit* (Huang et al., 1998), *Ubiquitin C*, *HDAC3*, *Integrin α 5/7*, *Integrin β 3/5*, *EGR1*, und *Fgf3* (Suyama et al., 2002), *c-Myc* (Gaubatz et al., 1995) und *ERBB-2* (Gee et al., 1999) binden und regulieren.

1.3.1 Der Transkriptionsfaktor Tfp2c

Der Transkriptionsfaktor Tfp2c wurde bei dem Versuch Retinsäure-induzierbare Gene in der murinen embryonalen Karzinomzelllinie P19 zu identifizieren von Oulad-Abdelghani et al. (1996) erstmals beschrieben.

Tfp2c wird bereits während der Präimplantationsphase der Entwicklung in Zellen der Morula exprimiert. Nach der Implantation wird *Tfp2c* im Blastozystenstadium in der Inneren Zellmasse und im Trophektoderm exprimiert (Auman et al., 2002). Später (E11.5) kann eine *Tfp2c* Expression in extra-embryonalen Geweben, wie dem Spongiotrophoblasten, den Trophoblastriesenzellen, sowie in einigen Zellen der

Einleitung

Labyrinthschicht nachgewiesen werden (Kuckenberget al., 2010; Winger et al., 2006). Anhand von Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass bei Deletion von *Tfap2c* (*Tfap2c*^{-/-}) die Embryonen eine Desorganisation des Primitivstreifens und ein retardiertes Größenwachstum im Vergleich zu den Kontrolltieren aufweisen. Zudem besitzen sie weniger Trophoblastriesenzellen in der Labyrinthschicht und als Folge davon sterben die Embryonen ab (Werling und Schorle, 2002a).

Während der Embryonalentwicklung konnte eine *Tfap2c* mRNA Expression an Tag E11.5 in einigen Zellen der Genitalfalte detektiert werden. Chazaud et al. postulierten 1996, dass *Tfap2c* möglicherweise am Ende der Migration in Keimzellen exprimiert wird, wenn diese die Genitalfalte erreichen (Chazaud et al., 1996).

Mit Hilfe einer konditionalen *Tfap2c* Mausmutante, bei der beide *Tfap2c*-Allele durch Verpaarung mit einer entsprechenden Cre-Mauslinie (Cre/loxP System) deletiert wurden, konnten weitere Studien durchgeführt werden, bei denen die frühembryonale Letalität umgegangen werden konnte (Werling und Schorle, 2002b). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass bei einem spezifischen Verlust von *Tfap2c* in der Keimbahn sowohl die männlichen als auch die weiblichen adulten Tiere steril sind. Der Grund hierfür liegt im Verlust der Keimzellen an Tag E8.0 (Weber et al., 2010). Entgegen der Annahme von Chazaud et al konnte gezeigt werden, dass *Tfap2c* schon in prä-migratorischen Keimzellen exprimiert wird (E7.25) und die Expression über die Migration hinaus bis Tag E12.5 aufrechterhalten wird (Weber et al., 2010).

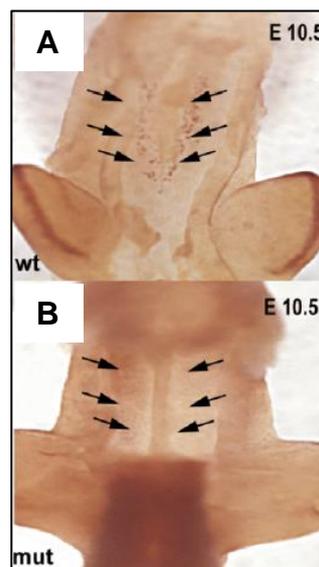


Abbildung 7: Entwicklung von Keimzellen in Wildtyp (WT) und *Tfap2c*^{-/-} Embryonen (Weber et al. 2010). Immunhistochemische Färbung der Genitalanlagen von WT [A] und *Tfap2c*^{-/-} [B] Embryonen. Alkalische-Phosphatase positive Zellen zeigen die Entwicklung von Keimzellen an (Pfeile).

1.4 *In vitro* Zellsysteme zur Untersuchung der Keimzell-Entwicklung

Die Untersuchung von molekularbiologischen Prozessen während der Keimzell-Entwicklung ist zur weiteren Klärung der Entstehung von Keimzelltumoren essenziell. Allerdings erschwert die geringe Anzahl der PGCs an frühen Entwicklungszeitpunkten (40 - 100 Zellen) die Analyse. Des Weiteren konnten Keimzellen bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht erfolgreich in Kultur gehalten und expandiert werden, ohne dass sie in Apoptose gehen oder in pluripotente embryonale Keimzellen (Embryonic Germ Cells = EGCs) differenzieren, welche embryonalen Stammzellen ähneln und nicht primordialen Keimzellen (Matsui et al., 1992).

Deshalb wurden in den letzten Jahren zahlreiche Versuche unternommen, geeignete *in vitro* Zellsysteme zur Generierung von Keimzellen zu etablieren. Durch die Kultur von ES-Zellen in LIF (Leukemia Inhibitor Factor) -freiem Medium und durch Ausplattieren der ES-Zellen als *Monolayer* (d.h. die Zellen wurden in einer einschichtigen Kultur angelegt), bilden sich Aggregate in denen spontan post-migratorische Keimzellen ausgebildet werden (Hübner et al., 2003).

Als weitere Methode wurde die Differenzierung von ES-Zellen zu Keimzellen in Embryoid Bodies (EBs) beschrieben. Dabei handelt es sich um dreidimensionale Strukturen, in denen die Zellen in alle drei Keimblätter differenzieren und dabei die Entwicklung innerhalb eines Embryos nachahmen (Geijsen et al., 2004). Um die Generierung von Keimzell-ähnlichen Zellen zu begünstigen, wurden den EB-Kulturmedien Faktoren wie BMP4 oder Retinsäure zugegeben (Geijsen et al., 2004; Toyooka et al., 2003; Young et al., 2010).

Zur Identifizierung der sich entwickelnden Keimzellen wurden ES-Zelllinien generiert, die einen Reporter tragen, wie z.B. Mvh(Vasa)-lacZ oder GFP, Stra8-EGFP oder Oct4-GFP (Geijsen et al., 2004; Nayernia et al., 2006; Toyooka et al., 2003). Später wurden ES-Zelllinien etabliert, welche einen Reporter für einen frühen spezifischen Keimzellmarker (StellaGFP und Blimp1mVenus) besitzen und eine stringenter Identifizierung der Keimzellen ermöglichen (Ohinata et al., 2008; Payer et al., 2006).

Aufgrund der Problematik bei der Verwendung von fetalem Kälberserum im EB-Kultursystem, aufgrund der chargenbedingten Unterschiede und nicht klar definierbaren Inhaltstoffen, ist es notwendig, Protokolle zu etablieren, die eine Keimzell-Differenzierung unter genau definierten Bedingungen ermöglichen und mehr der Keimzell-Entwicklung *in vivo* entsprechen.

Einleitung

Ein solches Protokoll wurde 2011 von Hayashi et al. publiziert. Es beruht darauf, dass *in vivo* die Keimzellen aus Zellen des Epiblasten hervorgehen. Die Differenzierung der ES-Zellen, welche unter definierten Bedingungen kultiviert werden, in Keimzell-ähnliche Zellen (Primordial Germ Cell like Cell = PGCLC), erfolgt über eine Epiblastzellen-ähnliche (Epiblast like Cells = EpiLC) Zwischenstufe (Hayashi et al, 2011). Dieses Protokoll ermöglicht Untersuchungen der molekularbiologischen Prozesse während der Keimzell-Entwicklung, da so bis zu 38% Keimzell-ähnliche Zellen generiert werden können. Dies ist ausreichend, um weitere Analysen durchführen zu können.

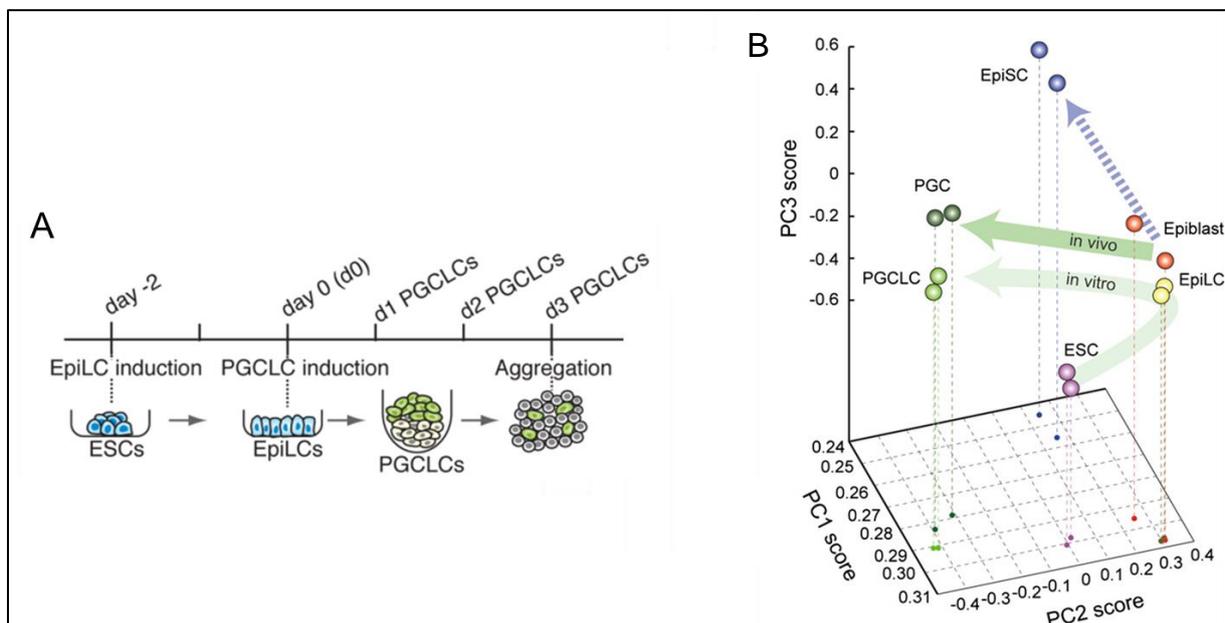


Abbildung 8: Methode zur Differenzierung von PGCLCs von Hayashi et al. 2011. [A] Schematische Darstellung der experimentellen Durchführung zur Generierung von PGCLCs. ES-Zellen (ESCs) werden zwei Tage in Epiblast-ähnliche Zellen (EpiLCs) differenziert, welche dann für weitere vier Tage in PGCLCs differenziert werden. [B] Hauptkomponenten-Analyse (PCA) bei der die Ergebnisse globaler Transkriptionsanalysen verschiedener Ziellinien (ESC = ES-Zellen; EpiLCs; PGCLCs; Tag E5.75 *in vivo* Epiblast-Zellen; Tag E9.5 *in vivo* PGCs) in definierten Parametern verglichen wurden. Die PCA der *in vitro* generierten PGCLCs aus EpiLCs zeigen parallelen zu der PCA der *in vivo* Epiblast-Zellen und PGCs. Die erste Hauptkomponente erfasst dabei 61% der Gesamtvarianz.

1.5 Die Seminom-Zelllinie TCam-2

Als weiteres Modell zur Untersuchung der molekularbiologischen Prozesse während der Keimzell-Entwicklung wurde die Zelllinie TCam-2 als Seminom- und CIS-ähnliche Zelllinie beschrieben (Eckert et al. 2008a), welche aus dem Seminom eines 35-jährigen Mannes etabliert wurde (Mizuno et al., 1993).

Einleitung

Eine Charakterisierung dieser Zelllinie zeigte, dass diese Zellen Pluripotenzfaktoren wie *NANOG* und *OCT3/4*, sowie die Keimzellmarker *VASA*, *DAZL*, *TFAP2C*, *cKIT* und *BOULE* exprimieren. Dagegen sind sie negativ für *SOX2* (Eckert et al. 2008a). Außerdem exprimieren die Zellen *BLIMP1* und *PRMT5* und zeigen ebenfalls die für Keimzellen charakteristischen Histon-Modifikationen H2A/H4R3me2 (Eckert et al. 2008b).

In einem siRNS basierten Experiment in TCam-2-Zellen, konnte gezeigt werden, dass bei einem Knockdown von *BLIMP1* die *TFAP2C* Expression reduziert ist, ein Verlust der Histon-Modifikationen H2AH4R3me2 und eine Expressionsinduktion des somatischen Markers *HOXB1* stattfindet (Weber et al., 2010). Bei einem siRNS basierten *TFAP2C* Knockdown Experiment in TCam-2-Zellen konnte die Induktion weiterer somatischer Marker wie *HOXA1*, *HAND1* und *MYOD1* nachgewiesen werden (Weber et al., 2010; Nettersheim et al, 2011). Dies zeigt, dass ähnlich wie während der Keimzell-Entwicklung, *Blimp1* und *Tfap2c* die somatische Differenzierung in CIS und Seminomen inhibieren.

Aufgrund der Expression typischer Keimzellmarker und der für Keimzellen charakteristischen Histon-Modifikationen (H2A/ H4R3me2) sind TCam-2 Zellen ein passendes *in vitro*-Zellsystem, um entwicklungsbiologische Studien zur Untersuchung der Keimzell- Entwicklung durchzuführen (Eckert et al. 2008b; Schäfer et al. 2011).

1.6 Zielsetzung dieser Dissertation

In dieser Arbeit sollte die Auswirkung des Verlusts von *Tfap2c* in Keimzellen während der murinen Embryonalentwicklung untersucht werden. Vorgehende Untersuchungen haben gezeigt, dass in Mäusen die eine homozygote *Tfap2c* Mutation in der Keimbahn aufweisen, die Keimzellen spezifiziert werden, diese aber im Verlauf der Migration verloren gehen. Es stellte sich daher die Frage, welche Gene während dieser Phase in den Keimzellen von *Tfap2c* reguliert werden. Aufgrund der geringen Anzahl von Keimzellen zu Beginn der Migration in den Mausembryonen und wegen methodischer Probleme, musste ein Protokoll etabliert werden zur Generierung von Keimzell-ähnlichen Zellen *in vitro*. Zur Beantwortung der Frage, in wie weit ein Verlust von *Tfap2c* die globale Genexpression in Keimzellen beeinflusst, sollten globale Expressionsstudien mittels cDNS-Microarray mit den Keimzell-ähnlichen Zellen durchgeführt werden und anschließend funktionelle Bereiche, welche durch *Tfap2c* reguliert werden, genauer untersucht werden.

Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Firmensitz
Agar	Merck	D-Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich	D-München
Ampicillin	Roth	D-Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva	D-Heidelberg
Calciumchlorid	Merck	D-Darmstadt
Citratpuffer pH6	Medac	D-Wedel
Detektionssystem	ImmunoLogic	N-Duiven
Dynabeads® Protein G	Life Technologies	D-Darmstadt
Eisessig	Merck	D-Darmstadt
Ethanol	Merck	D-Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	D-München
Formaldehyd 37%	Merck	D-Darmstadt
FuGENE HD	Merck	D-Darmstadt
Glukose	Merck	D-Darmstadt
Glycin	Roth	D-Karlsruhe
Hefeextrakt	Merck	D-Darmstadt
Hoechst H3342	Invitrogen	D-Karlsruhe
Isopropanol	Merck	D-Darmstadt
Kaliumacetat	Calbiochem	USA-La Jolla
Kanamycin	Roth	D-Karlsruhe
Natriumacetat	Merck	D-Darmstadt
Natriumchlorid	Merck	D-Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck	D-Darmstadt
Paraformaldehyde	Merck	D-Darmstadt
Pepton	Roth	D-Karlsruhe
Peroxidase-Blocking Puffer	Medac	D-Wedel
Pertex	Meditate	D-Burgdorf
Propidiumiodid	BD Biosciences	USA-San Jose
Rinderalbumin (BSA)	Roth	D-Karlsruhe
Titriplex-II	AppliChem GmbH	D-Darmstadt

Material und Methoden

Tri Reagenz	Sigma-Aldrich	D-München
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane	Merck	D-Darmstadt
TritonX-100	Merck	D-Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	D-München

2.1.2 Verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller	Firmensitz
Mini Complete Protease Inhibitor	Roche	D-Mannheim
DNase I	Fermentas	D-St. Leon-Rot
DreamTaq Polymerase	Fermentas	D-St. Leon-Rot
Fast Digest Restriktionsendonukleasen	Fermentas	D-St. Leon-Rot
Platinum Taq DNA Polymerase High fidelity	Invitrogen	D-Karlsruhe
Proteinase K	Merck Millipore	D-Darmstadt
Reverse Transkriptase	Fermentas	D-St. Leon-Rot
RNaseA	Boehringer	D-Mannheim
T4-DNA Ligase	Fermentas	D-St. Leon-Rot

2.1.3 Laborgeräte

Geräte	Hersteller	Firmensitz
Autostainer 480 S	Medac	D-Wedel
Bio Concentrator 5301	Eppendorf	D-Hamburg
Bio Photometer	Eppendorf	D-Hamburg
Bioruptor	Diagenode	B-Lüttich
Bunsen-Brenner	Schütt-Biotech	D-Göttingen
Cytospin 3 Shandon	Thermo Scientific	D-Karlsruhe
Elektrophorese-Kammer 40-1214	PeqLab	D-Erlangen
FACS Aria III	BD Biosciences	USA-San Jose
FACS Canto	BD Biosciences	USA-San Jose
Fluoreszenz Mikroskop DM IRB	Leica	D-Wetzlar
Geldokumentation	Intas	D-Göttingen
Hula-Mixer	Invitrogen	D- Karlsruhe
Inkubator für Bakterienkultur	Memmert	D-Schwabach
Inkubator für Zellkultur Cytoperm 2	Thermo Scientific	D-Karlsruhe
PCT Thermal Cycler 2720	Applied Biosystem	USA-Foster City
Photometer Nanodrop	PeqLab	D-Erlangen

Material und Methoden

Pipetten	Eppendorf	D-Hamburg
Real-Time PCR System ViiA7	Applied Biosystem	USA-Foster City
Steril Bank Hera safe	Kendro	D-Hanau
Thermal Cycler Peltier PTC-200	MJ Research	CAN-St. Bruno
Thermomixer compact	Eppendorf	D-Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries	USA-New York
Wasserbad	Memmert	D-Schwabach
Zentrifuge (Kühl) 5417R	Eppendorf AG	D-Hamburg
Zentrifuge (Kühl) Biofuge fresco	Kendro	D-Hanau
Zentrifuge Multifuge 1 s	Kendro	D-Hanau

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Firmensitz
96 Lochplatte (U-Bottom, low cell binding)	Nunc, Thermo Fisher	J-Tokyo
Blaukappenröhrchen (15 /50 ml)	Greiner	A-Kremsmünster
Einfrier-Gefäße	Greiner	A-Kremsmünster
Filter 40µm	BD-Falcon	USA-Bedford
Glas-Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co KG	D-Wertheim
1,5 ml Reaktionsgefäße	Axygen	USA-Union City
Pipettenspitzen	Greiner	A-Kremsmünster
Pipettenspitzen (RNase frei)	Nerbe Plus	D-Winsen
Polystyrene Reservoirs	VWR	D-Darmstadt
Reaktionsgefäße 1,5ml	Sarstedt	D-Nümbrecht
Serologische Pipetten	Greiner	A-Kremsmünster
Loch-Mikrotiter Platten	TPP	CH-Trasadingen

2.1.5 Verwendete Kits

Kit	Hersteller	Firmensitz
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	Fermentas	D-St. Leon-Rot
EZ DNA Methylation-Direct Kit	Zymo Research	USA-Irvine, CA
NucleoBond Xtra Maxi Plus	Macherey-Nagel	D-Düren
QIAquick PCR purification Kit	Qiagen	D-Hilden
Whole Genome Amplification Kit 4	Sigma-Aldrich	D- München
Revert Aid Premium Kit	Fermentas	D-St. Leon-Rot
RNeasy Mini Kit	Qiagen	D-Hilden

Material und Methoden

TA-Cloning Kit	Invitrogen	D-Karlsruhe
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research	USA-Irvine, CA

2.1.6 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

Medien und Zusätze	Hersteller	Firmensitz
Accutase	PAA Laboratories	A-Pasching
Activin A (human/murin)	Peptotech	USA-
B27- Supplement	Gibco/Life Technologies	D-Darmstadt
bFGF (murin)	Peptotech	USA-
BMP4	Stemgent	USA-Cambridge
BMP8b	R&D Systems	USA-Minneapolis
Dimethylsulfoxide	Applichem	D-Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco/Life Technologies	D-Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium / F12+GlutaMAX	Gibco/Life Technologies	D-Darmstadt
EGF	R&D Systems	USA-Minneapolis
Essenzielle Aminosäuren	PAA Laboratories	A-Pasching
Fötale Kälber Serum (FCS)	PAA Laboratories	A-Pasching
Gelatine	Sigma-Aldrich	D-München
G-MEM BHK-21	Gibco/Life Technologies	D-Darmstadt
GSK3- Inhibitor (CHIR99021)	Stemgent	USA-Cambridge
humanes Fibronectin	Merck Millipore	D-Darmstadt
Knockout Serum Replacement (KSR)	Gibco/Life Technologies	D-Darmstadt
Laminin	Sigma-Aldrich	D- München
L-Glutamin	PAA Laboratories	A-Pasching
MEK1/2-Inhibitor (PD0325901)	Stemgent	USA-Cambridge
Mineralöl	Sigma-Aldrich	D-München
N2- Supplement	Gibco/Life Technologies	D-Darmstadt
Neurobasal Medium	Gibco/Life Technologies	D-Darmstadt
Nicht-Essenzielle Aminosäuren	PAA Laboratories	A-Pasching
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco/Life Technologies	D-Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories	A-Pasching
Poly-L-Ornithine	Sigma-Aldrich	D- München
RPMI	Gibco/Life Technologies	D-Darmstadt
Sodium Pyruvat	Sigma Aldrich	D-München

Material und Methoden

Stem cell Factor (SCF)	Stemgent	USA-Cambridge
Trypsin(1x, 10x)	PAA Laboratories	A-Pasching
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	D- München

2.1.7 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Firmensitz
Anti- Kaninchen Alexa fluor 488 (eingesetzt 1:1000)	Life Technologies	D-Darmstadt
Anti- Kaninchen Alexa fluor 594 (eingesetzt 1:1000)	Life Technologies	D-Darmstadt
Anti- Kaninchen biotinyliert (eingesetzt 1:500)	DAKO	D-Hamburg
Anti- Maus Alexa fluor 488 (eingesetzt 1:1000)	Life Technologies	D-Darmstadt
Anti- Maus Alexa fluor 594 (eingesetzt 1:1000)	Life Technologies	D-Darmstadt
Anti- Ratte biotinyliert (eingesetzt 1:200)	DAKO	D-Hamburg
IgG Rabbit	Merck Millipore	D-Darmstadt
SSEA-1 (eingesetzt 1:100 - 1:250)	R&D Systems	USA-Minneapolis
Stella ab-19878 (eingesetzt 1:100)	Abcam	UK-Cambridge
TFAP2C 6E4 (eingesetzt 1:300 - 1:500)	Santa-Cruz	USA-Santa Cruz
TFAP2C H77 (eingesetzt 1:250)	Santa-Cruz	USA-Santa Cruz
Ser2 und Ser5 (eingesetzt 1:25)	-	erhalten von M. Geyer (Caesar - Institut der Max Planck Gesellschaft)

2.1.8 Puffer und Lösungen

Puffer, Lösung	Hersteller
4% Paraformaldehyde (PFA)	4 g PFA in 100 ml PBS, filtriert
5x LB Medium	50 g Pepton 25 g NaCl 25 g Hefeextrakt ad 1 l H ₂ O
Annealing-Puffer (10x)	100 mM NaCl 50 mM HEPES pH 7.4 25 μ l 20% SDS
ChIP Dilutionpuffer	120 μ l 0,5 M EDTA pH8,0 833 μ l 1 M Tris pH8,1 550 μ l TritonX-100 1667 μ l 5 M NaCl ad 50 ml H ₂ O
ChIP Elutionspuffer	2,5 ml 20% SDS 500 μ l 0,5 M EDTA pH8,0

Material und Methoden

	1 ml 1 M Tris pH8,1 500 µl 5 M NaCl ad 50 ml H ₂ O
ChIP Lysis- und Sonifizierungspuffer	250 µl 20% SDS 1 ml 0,5 M EDTA pH8,0 5 ml 1 M Tris pH8,1 ad 50 ml H ₂ O
ChIP Waschpuffer	100 µl 0,5 M EDTA pH8,0 500 µl 1 M Tris pH8,1 50 µl Tween 20 (Verdünnung 1:10) ad 50 ml H ₂ O
DNS – Ladepuffer	49% Glycerol 49% H ₂ O 2% 50x TAE Spatelspitze Bromphenolblau Spatelspitze Xylencyanol
DNS – Lysispuffer	50 mM Tris pH8.5 100 mM EDTA 1% SDS 100 mM NaCl 100 µg/ml Proteinase K
Hoechst H3342 Färbelösung 100x	50 mg H3342 in 50 ml PBS
LB – Agar	10 g Pepton 5 g NaCl 5 g Hefe-Extrakt 16 g Agar ad 1 l H ₂ O
Plasmid Präparationspuffer 1	50 mM Glucose 25 mM Tris pH8 10 mM EDTA RNase A (100 µg/ml)
Plasmid Präparationspuffer 2	0.2 M NaOH 1% SDS
Plasmid Präparationspuffer 3	2 M Kaliumacetat pH4.8
TAE- Puffer (50x)	242 g Tris 18.6 g Titriplex-II 57.1 ml Eisessig ad 1l H ₂ O
Tris-Puffer	10mM Tris in H ₂ O, filtered

2.1.9 Plasmide

Plasmid	Hersteller	Firmensitz
pCR2.1	Invitrogen	D-Karlsruhe
pSUPER.retro.puro	OligoEngine	USA-Seattle

Material und Methoden

2.1.10 Oligonukleotide

2.1.10.1 Murine qRT-PCR Primer

Primer	Sequenz	Annealing-Temp.	Amplikon
bActin-F bActin-R	5'- TGTTACCAACTGGGACGACA -3' 5'- GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA -3'	60°C	165 bp
Blimp1-F Blimp1-R	5'-GCCAACCAGGAAC TTCTTGTGT -3' 5'- AGGATAAACCCACCCGAGGGT -3'	60°C	327 bp
Car8-F Car8-R	5'- CAGTGGTCCTCCTGACAAGAC -3' 5'- ACCCCTCACTGCTGGATGT -3'	60°C	128 bp
Ccnd1-F Ccnd1-R	5'- TCTTTCCAGAGTCATCAAGTGTG -3' 5'- TCCTCCTCAGTGGCCTTG -3'	60°C	126 bp
Cdk6-F Cck6-R	5'- GTGGTCAGGTTGTTTGTATGTGT -3' 5'- GGGCTCTGGAAC TTATCCAAG -3'	60°C	120 bp
c-Kit-F c-Kit-R	5'- GACGCTGACCCCTTGAAA -3' 5'- GACTTGGGTTTCTGCTCAGG -3'	60°C	228 bp
Dazl-F Dazl-R	5'- TGCTGGAGAGCAGAGGAGTT -3' 5'- TGAACATTCATTGGGCAAAA -3'	60°C	106 bp
Dmrt1-F Dmrt1-R	5'- CTGATGGCCGAGAACAGC -3' 5'- TTCTCCATATGCCCTCTGCT -3'	60°C	125 bp
Dnmt3b-F Dnmt3b-R	5'- TGC GTCGTT CAGACAGTAGG -3' 5'- GCCCTTGTTGTTGGTGACTT -3'	60°C	197 bp
Dnmt3l-F Dnmt3l-R	5'- TCTCACGGAGTGGACTGCT -3' 5'- ACTGGCTGTCTCTTCCATGC -3'	60°C	127 bp
Fgf4-F Fgf4-R	5'- GCAAGCTCTTCGGTGTGC -3' 5'- CGTAGGATTCGTAGGCGTTG -3'	60°C	90 bp
Gapdh-F Gapdh-R	5'- GGTGCTGAGTATGTCGTGGA -3' 5'- TTGGCTCCACCCTTCAAGT -3'	60°C	80 bp
Hhex-F hhex-R	5'- CTACACGCACGCCCTACTC -3' 5'- CAGAGGTCGCTGGAGGAA -3'	60°C	76 bp
Klf4-F Klf4-R	5'- GCGAGTCTGACATGGCTGT -3' 5'- GAGTTCCTCACGCCAACG -3'	60°C	128 bp
Meg3-F Meg3-R	5'- TTTGCTGTTGTGCTCAGGTT -3' 5'- ATCCTGGGGTCCTCAGTCTT -3'	60°C	108 bp
Nanog-F Nanog-R	5'- GGTGGCAGAAAACCAAGTG -3' 5'- GCAATGGATGCTGGGATACT -3'	60°C	117 bp
Nanos3-F Nanos3-R	5'- GCCAGGGCTACACTTCTGTC -3' 5'- CTTCTGCCACTTTTGGAAC -3'	60°C	155 bp
Nefl-F Nefl-R	5'- CCCTCTGAAGGAGAAGCAGA -3' 5'- TCTTTTGTGTCTTCAGACTCATCC -3'	60°C	110 bp
Nxf3-F Nxf3-R	5'- GAGA ACTGGTTCAAGGTCACAA -3' 5'- GAAACTGCACCGAGTGAA -3'	60°C	109 bp
p21-F p21-R	5'- TCTGAGCGGCCTGAAGATT -3' 5'- TGCGCTTGGAGTGATAGAAA -3'	60°C	97 bp
Prdm14-F Prdm14-R	5'- GCCTGAACAAGCACATGAGA -3' 5'- AGGAAGCCTTTCCACAAAT -3'	60°C	244 bp
Rhox5-F Rhox5-R	5'- GATGGGGACAAGGATAGTGG -3' 5'- CAGTGCCCTCAGCAACTG -3'	60°C	76 bp

Material und Methoden

Rian-F	5'- GTTGTGCCCTCCCTGGAT -3'	60°C	119 bp
Rian-R	5'- AATCATCTTGGTGGAAGAATGC -3'		
Stella-F	5'- CTTTGTGTGCTCGGTGCTGAAA -3'	60°C	100 bp
Stella-R	5'- TCCCCTTCAAACCTCATTTC -3'		
Tfap2c-F	5'- AAGCGGTGGCTGACTATTTAA -3'	60°C	203 bp
Tfap2c-R	5'- CAGGCTGAAATGAGACAAACAG -3'		
Tex13-F	5'- AGGTGCAGAGAGAGCGAGAC -3'	60°C	115 bp
Tex13-R	5'- CTTGCTTGTACCTGGTGCTG -3'		

2.1.10.2 Murine RT-PCR Primer

Primer	Sequenz	Annealing-Temp.	PCR-Zyklen	Amplikon
beta Act-F	5'- GGTCAGAAGGACTCCTATGT -3'	55°C	30	428 bp
beta Act-R	5'- ATGAGGTAGTCTGTCAGGTC -3'			
Blimp1-F	5'-CACACAGGAGAGAAGCCACA -3'	60°C	30	320 bp
Blimp1-R	5'- TCGAAGGTGGGTCTTGAGAT-3'			
c-Kit-F	5'- AAGATGAACCCTCAGCCTCA -3'	60°C	30	87 bp
c-Kit-R	5'- CGTCTCCTGGCGTTCATAAT-3			
Dnmt3b-F	5'- TGCCTCGTTCAGACAGTAGG -3'	60	30	197 bp
Dnmt3b-R	5'- GCCCTTGTGTTGGTGACTT -3'			
Fgf5-F	5'- TTGCGACCCAGGAGCTTAAT-3'	60°C	33	200 bp
Fgf5-R	5'- CTACGCCTCTTTATTGCAGC-3			
Gapdh-F	5'- GGTGCTGAGTATGTCGTGGA- 3'	58°C	30	80 bp
Gapdh-R	5'- TTGGCTCCACCCTTCAAGT- 3'			
Klf4-F	5'- GCGAGTCTGACATGGCTGT -3'	60°C	30	128 bp
Klf4-R	5'- GAGTTCCTCACGCCAACG -3'			
Nanog-F	5'- GGTGGCAGAAAAACCAGTG- 3'	60°C	33	117 bp
Nanog-R	5'- GCAATGGATGCTGGGATACT- 3'			
Nanos3-F	5'- TCCCGTGCCATCTATCAG -3'	58°C	30	500 bp
Nanos3-R	5'- GGATGTTGAGGCAACACC -3'			
Oct4-F	5'- GATGCTGTGAGCCAAGGCAAG-3'	58°C	30	228 bp
Oct4-R	5'- GGCCTCCTGATCAACAGCATCAC-3'			
Prdm14-F	5'- GCCTGAACAAGCACATGAGA -3'	58°C	30	244 bp
Prdm14-R	5'- AGGAAGCCTTCCCACAAAT -3			
Sox2-F	5'- GAACGCCTTCATGGTATGGT-3'	60°C	30	84 bp
Sox2-R	5'- TTGCTGATCTCCGAGTTGT- 3'			
Stella-F	5'- GTCGGTGCTGAAAGACCCTA -3'	58°C	30	279 bp
Stella-R	5'- GATTTCCCAGCACCAGAAAA -3'			
Tfap2c F	5'- ATTTTCGATGACCAAGAACCCTTTG-3'	58°C	30	326 bp
Tfap2c R	5'- ACGAGAGACGTGAGGAGAGTGAC-3'			

2.1.10.3 Humane qRT-PCR Primer

Primer	Sequenz	Annealing-Temp.	Amplikon
CCND1-F	5'- TCACACGCTTCCTCTCCAG -3'	60°C	120 bp
CCND1-R	5'- TGGGGTCCATGTTCTGCT -3		

Material und Methoden

c-KIT-F c-KIT-R	5'- GGGATGCAGATCCCCTAAA -3' 5'- GACAGAATTGATCCGCACAG -3'	60°C	161 bp
DMRT1-F DMRT1-R	5'- CAAGAAGTGCAACCTGATCG -3' 5'- TCTCTCTTTTGACAAGCAGCTC -3'	60°C	146 bp
DNMT3B-F DNMT3B-R	5'- CCAGCTCTTACCTTACCATC -3' 5'- CAGACATAGCCTGTGCGCTTG -3'	60°C	83 bp
DNMT3L-F DNMT3L-R	5'- AGCAACTGGGTGTGCTACCT -3' 5'- CGAACATCTCAAGGGGATTC -3'	60°C	127 bp
GADD45B-F GADD45B-R	5'- GTCGGCCAAGTTGATGAAT -3' 5'- CACGATGTTGATGTCGTTGT -3'	60°C	145 bp
GAPDH-F GAPDH-R	5'- TGCCAAATATGATGACATCAAGAA -3' 5'- GGAGTGGGTGTCGCTGTTG -3'	60°C	210 bp
HOXA5-F HOXA5-R	5'- GAACTCCTTCTCCAGCTCCA -3' 5'- GCGCAAGCTGCACATAAGTC -3'	60°C	103 bp
ID1-F ID1-R	5'- TCCAGCACGTCATCGACTAC -3' 5'- TCAGCGACACAAGATGCG -3'	60°C	424 bp
ID2-F ID2-R	5'- TCAGCCTGCATCACCAGAGA -3' 5'- CTGCAAGGACAGGATGCTGATA -3'	60°C	92 bp
ID3-F ID3-R	5'- TCAGCTTAGCCAGGTGGAAATC -3' 5'- TGGCTCGGCCAGGACTAC -3'	60°C	76 bp
p21-F p21-R	5'- CCTCATCCCGTGTTCCTCTT -3' 5'- GTACCACCCAGCGGACAAGT -3'	60°C	97 bp
p53-F p53-R	5'- TTGCAATAGGTGTGCGTCAGA -3' 5'- AGTGCAGGCCAACTTGTTTCAG -3'	60°C	81 bp
PRAME-F PRAME-R	5'- CGTAGACTCCTCCTCTCCCACAT -3' 5'- TGGGCGATATACTGCTCTTCT -3'	60°C	74 bp
SOX17-F SOX17-R	5'- GGCGCAGCAGAATCCAGA -3' 5'- CCACGACTTGCCAGCAT -3'	60°C	61 bp
SOX2-F SOX2-R	5'- CCCTGCTGAGAATAGGACAT -3' 5'- CCCTGCAGTACAACCTCTATG -3'	60°C	82 bp
STELLAR-F STELLAR-R	5'- TCAACGTCTCGGAGGAGATT -3' 5'- CAACCTACATCCCAGGGTCT -3'	60°C	90 bp
TET2-F TET2-R	5'- TCCACCTGCAAGCTGTGATA -3' 5'- TTCTGCAGCAGTGGTTTGTC -3'	60°C	187 bp
TFAP2C-F TFAP2C-R	5'- GGCCCAGCAACTGTGTAAGA -3' 5'- GCAGTTCTGTATGTTCTCTCCAA -3'	60°C	245 bp

2.1.10.4 Murine ChIP – Primer

Gen	Lokus	Primer	Sequenz	Amplikon
Sfrp1	1. Intron	ChIP F	gtagagggggaaagctcagg	115 bp
		ChIP R	agtacctggagcgggagaag	
Fgf4	5'UTR	ChIP F	agcactcaccgaactcacg	92 bp
		ChIP R	agcagcgtccctgtggtc	
Klf4	5'UTR	ChIP F	acaacggtgggggacact	80 bp
		ChIP R	tagacaatcagcaaggcaga	

Material und Methoden

Cdk6	4. Intron	ChIP F	ttcttccagcagtggttgc	89 bp
		ChIP R	gcagcagaaggttctcacc	
c-Kit	1. Intron	ChIP F	gtttggtgatgctttgtgc	130 bp
		ChIP R	cacgcgcaactttaacaaa	
Dnmt3l	1. Intron	ChIP F	actggtttaggtccacatct	90 bp
		ChIP R	tgccccattctagagctcac	
Dmrt1	4. Intron	ChIP F	tctggggctgagagagtgat	84 bp
		ChIP R	ttagcgtggaatcagacacg	
Nanos3	5' stromaufwärts	ChIP F	ctcaaggccacatgataccc	95 bp
	TSS	ChIP R	gcccagggttaacactaa	
p21	1. Intron	ChIP F	tacgggtgccgtacatcag	80 bp
		ChIP R	agcctggtcaccttctaca	
Dnmt3b	5' UTR	ChIP F	ggaaggtccgggtagttaat	81 bp
		ChIP R	acaggtgtgtgccctcttc	
Jam2	5' UTR	ChIP F	ctaccgctcccaacacacac	118 bp
		ChIP R	gatccgctttgtgtctagtc	
Amy1 (neg Kontrolle)	1. Intron	ChIP F	ggttggtgtattgagaaagca	98 bp
		ChIP R	gtgtccttggaaaccactg	
Oct3/4 (pos Kontrolle)	5' stromaufwärts	ChIP F	ggaactgggtgtggggagggtgta	170 bp
	TSS	ChIP R	agcagattaaggaagggttaggacgagag	

2.1.10.5 Genotypisierungs – Primer

Primer	Sequenz	Amplikon
In4down	5'- AACAGGTTATCATTTGGTTGGGATT -3'	WT = 300 bp FLOX = 343 bp KO = 700 bp
Ex5up	5'- CAATTTTGTCCAACCTTCTCCCTCAA -3'	
Ex6up	5'- AATAGTCAGCCACCGCTTTACTAGG -3'	
Blimp1mVenus	5'- ACTCATCTCAGAAGAGGATCTG -3'	WT = keine Bande Blimp1mVenus = 200 bp
Blimp1mVenus	5'- CACAGTCGAGGCTGATCTC -3'	
XIST F	5'- TTGCGGGATTTCGCCTTGATT -3'	XIST (X-CHR.) = 207 bp ZFY1 (Y-CHR.) = 183 bp
XIST R	5'- TGAGCAGCCCTTAAAGCCAC -3'	
ZFY1 F	5'- GCATAGACATGTCTTAACATCTGTCC -3'	
ZFY1 R	5'- CCTATTGCATGGACAGCAGCTTATG -3'	

2.1.10.6 shRNS-Oligonukleotide

Primer	Sequenz
shRNS 1 3' UTR	5'GATCCCCGGAAGAGTTTGTACCTATTCAAGAGATAGGTAACAACTCTTCCCTTTTTA 3'GGGCCCTTCTCAAACAATGGATAAGTTCTCTATCCATTGTTTGAGAAGGGAAAAATTCTGA
shRNS 2 ORF	5'GATCCCCCAGAAGAGCCAAATCGAAATTCAGAGATTTGATTTGGCTCTTCTGTTTTTA' 3'GGGGTCTTCTCGGTTTAGCTTTAAGTTCTCTAAAGCTAAACCGAGAAGACAAAAATTCTGA
shRNS 3 ORF	5'GATCCCCGAGAAACACAGGAAATAAATTCAGAGATTTATTTCTGTGTTTCTCTTTTA 3'GGGCTCTTTGTGTCTTTATTTAAGTTCTCTAAATAAAGGACACAAAGAGAAAAATTCTGA

Material und Methoden

2.1.10.7 Primer für Bisulfit behandelte DNS

Primer	Sequenz	Amplikon
H19 Bis 1 F H19 Bis 1 R	5'- GAGTATTTAGGAGGTATAAGAAT-3' 5'- ATCAAAAACCTAACATAAACCCCT -3'	473 bp
H19 Bis 2 F H19 Bis 2 R	5'- GTAAGGAGATTATGTTTATTTTT-3' 5'- CCTCATTAATCCCATAACTAT -3'	421 bp

2.1.11 Mauslinien

Mauslinien	Referenz
Blimp1mVenus (Tg^{(Prdm1-Venus1)Sait}) MGI:3805969	(Ohinata et al., 2008)
Tfap2c^{flox/flox} (Tfap2^{ctm1Hsc}) MGI:2176695	(Werling und Schorle, 2002b)

2.1.12 Bakterienstamm

Bakterienstamm	Genotyp
TOP10F ⁻ <i>E. coli</i> -Stamm	F ['] {lacIq Tn10 (TetR)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araIeu) 7697 galU galK rpsL endA1 nupG

2.1.13 Zelllinien

Zelllinien	
γ-MEFs	murine embryonale Fibroblasten
Stella GFP	murine embryonale Stammzelllinie; zur Verfügung gestellt von A. Surani
Blimp1mVenus/Tfap2c ^{flox/flox}	murine embryonale Stammzelllinie
Blimp1mVenus/Tfap2c ^{-/-}	murine embryonale Stammzelllinie
TCam-2	humane Keimzelltumorzelllinie aus einem Seminom; zur Verfügung gestellt von S. Kitazawa

Material und Methoden

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterienkulturen

Für die Herstellung kompetenter *Escherichia coli* (*E.coli*) Kulturen wurden *E.coli* Top10 in 50 ml Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) über Nacht bei 37°C und 250 rpm in einem Bakterenschüttler inkubiert. 1 ml dieser Bakterienkultur wurde 1:100 in frischem LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD650 von 0,2 weiter kultiviert. Nach Abkühlung der Kultur und Zentrifugation bei 2500 rpm für 5 Minuten (Min) bei 4°C wurde das Bakterienpellet in 50 ml CaCl₂ (50 mM und 4°C) resuspendiert und für 20 Min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 Min, 2500 rpm, 4°C) wurde das Bakterienpellet in 10 ml CaCl₂ (50 mM und 4°C) + 15% Glycerol resuspendiert. Die Bakterienlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert.

2.2.2 shRNS-Klonierung

Um einen shRNS exprimierenden Vektor herzustellen, musste zunächst ein shRNS-Oligonukleotid konstruiert werden. Ein 60 Basen großes Oligonukleotid, welches ein Sequenzfragment des humanen *TFAP2C* Genes (shRNS B = Exon 4-5, shRNS A & C = Exon7) beinhaltet, wurde wie folgt erstellt.

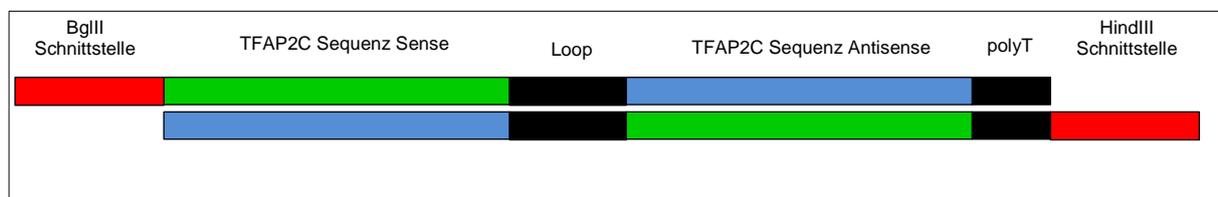


Abbildung 9: Schematische Darstellung der shRNS-Konstrukte. Am 5'-Ende befindet sich eine BglIII und am 3' eine polyT-Sequenz und eine HindIII Schnittstelle. Der TFAP2C spezifischer Sequenzbereich schließt eine Loop-Sequenz ein, welche bei Transkription die einzelsträngige RNS zusammenfaltet und eine doppelsträngige Haarnadel-Struktur entsteht.

Der Sinnstrang enthält am 5'-Ende einen *Bgl*III spezifischen Nukleotid-Überhang und am 3'-Ende eine polyT-Sequenz und einen *Hind*III-Überhang. Zudem enthält das Konstrukt eine Loop-Sequenz, welche bei korrekter Transkription die einzelsträngige RNS zusammen faltet, so dass die komplementären „Antisense“- und „Sense“-Sequenzen aneinander liegen und zu einem Fragment doppelsträngiger RNS hybridisieren. Diese doppelsträngigen Fragmente werden als „short-hairpin“ (kurze Haarnadel) bezeichnet (Abbildung 9).

Material und Methoden

Zu Beginn wurden die zwei komplementären shRNS-Oligonukleotide hybridisiert. Dazu wurden jeweils 1 µg beider Oligonukleotide, 5 µl 10x Annealing Puffer und 43 µl H₂O vermischt und wie folgt inkubiert:

- 1) 4 Min bei 90°C
- 2) 10 Min bei 70°C
- 3) Langsames abkühlen auf 10°C

Der Expressionsvektor für shRNS Konstrukte pSUPER.retro.puro wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bgl*II und *Hind*III linearisiert. Je 1 µl (1 Unit) Restriktionsendonuklease wurden mit 2 µg pSUPER.retro.puro Vektor für 30 Min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Restriktionsverdau auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, der linearisierte Vektor ausgeschnitten und mit dem ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit laut Herstellerangaben isoliert.

Das hybridisierte shRNS-Oligonukleotid und der linearisierte pSUPER.retro.puro Vektor wurden mittels T4 Ligase bei Raumtemperatur (RT) über Nacht ligiert. Am folgenden Tag erfolgte die Transformation kompetenter Bakterien mit anschließender Plasmid-Isolation (siehe 2.2.4) und Restriktionsverdau mit *Eco*RI und *Xho*I (siehe 2.2.5).

Die Herstellung von Virus mit integriertem shRNS-Konstrukt erfolgte in Kooperation mit Stefanie Riesenberg von der AG Hölzel (Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Bonn). HEK 293T Zellen wurden in eine 6 Loch-Mikrotiterplatte ausgesät und mittels Calcium-Phosphat Präzipitation mit 2 µg pSUPER.retro.puro Vektor und mit einem retroviralen „Packaging Plasmid“ System, welches aus einem gag-pol und einem VSV-G Plasmid besteht, transfiziert. Am Tag 2 wurde zweimal das Medium gewechselt und am Tag 3 der virushaltige Überstand abgenommen und gefiltert (Maschenweite 45 µm). Für die Infektion von TCam-2 Zellen, wurden diese in 1 ml virushaltigem Überstand über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel auf puromycinhaltiges Selektionsmedium. Am siebten und vierzehnten Tag nach der Virus-Transduktion wurde RNS isoliert (siehe 2.4.3).

2.2.3 Transformation kompetenter *E.coli*-Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden kompetente *E.coli*-Bakterien transformiert. Kompetente Bakterien wurden mit 1-5 µl eines Ligationansatzes für 20 Min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeschockbehandlung für 30-45 Sekunden (s)

Material und Methoden

bei 42°C und 3 Min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in 500 µl 1x LB-Medium für 45 Min bei 37°C im Thermoschüttler bei 400 rpm inkubiert. 100 µl der Bakterienkultur wurden auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.4 Isolation von Plasmid-DNS

Zur Plasmidisolation wurden 2 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mittels Zentrifugation pelletiert (40 s bei 13.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 150 µl Plasmid-Präparationspuffer 1 resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 300 µl Plasmid-Präparationspuffer 2 für 1 Min inkubiert. Zur Neutralisation der Zelllyse wurden 150 µl Plasmid-Präparationspuffer 3 zugegeben und mehrmals invertiert. Anschließend wurde für 5 Min bei 13.000 rpm zentrifugiert, wobei ausgefallenes Natriumlaurylsulfat pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C für mindestens 30 Min mit 100% Ethanol präzipitiert. Anschließend wurde für 15 Min bei 4°C und mit 13.000 rpm zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit 80% Ethanol. Die ausgefällte Plasmid-DNS wurde durch Zentrifugation (5 Min bei 13.000 rpm) pelletiert, luftgetrocknet und in 40 µl H₂O aufgenommen.

2.2.5 Plasmid–Restriktionsverdau

Zur Überprüfung der korrekten Integration von DNS-Sequenzen in Plasmiden, wurden diese mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und anschließend die DNS-Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde 1 µl (1 Unit) Restriktionsenzym mit 2 µl 10x Fast Digest Green Puffer (Thermo Scientific) und 1 µg Plasmid DNS für 15 Min bei 37°C inkubiert.

2.2.6 Transfektion von Zellen

Bei der Transfektion von Zelllinien werden Fremd-DNS oder si/shRNS-Moleküle in die Zellen eingebracht. Hierfür wurde die Methodik der liposomalen Transfektion verwendet. Negativ geladene DNS oder RNS Fragmente können mit kationischen Liposomen Komplexe ausbilden (Lipidvesikel). Wegen der Ähnlichkeit der Lipidvesikel zu den Lipiddoppelschichten der Zellmembran, können diese mit der Zellmembran verschmelzen und in die Zelle aufgenommen werden.

Material und Methoden

5 µl des Transfektionsreagenzes FuGENE® HD wurden mit jeweils 2 µg si/shRNS (TFAP2C SR304789 von Origene Technologies/USA-Rockville) zur Komplexbildung mit 100 µl RPMI Medium ohne Zusätze bei RT für 20 Min inkubiert. Anschließend wurde der FuGENE® HD/RNS Reaktionsansatz zu $1,5 \times 10^5$ Zellen in je ein Loch einer 6-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Bei transienter Transfektion wurden die Zellen für 72 Stunden (h) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend zur Analyse der RNS isoliert (siehe 2.4.3).

2.2.7 TA-Klonierung

Bei der TA-Klonierung werden PCR-Fragmente in einen Vektor (pCR2.1) ligiert. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass die *Taq-Polymerase* während der PCR die Eigenschaft hat, an das 3'-Ende eines PCR-Produkts ein Deoxyadenosin-Molekül anzuhängen. Diese PCR-Produkte können dann in einen linearisierten Vektor, welcher komplementäre 3' Desoxythymidin-Überhänge besitzt, ligiert werden. Die Ligation erfolgte in einem molaren Verhältnis von 3:1 (Insert : Vektor) bei 16°C über Nacht.

2.3 Zellkultur-Methoden

2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Murine, embryonale Stammzellen (ES-Zellen) und die Tumorzelllinie TCam-2 wurden in Brutschränken mit wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C, 5% CO₂ und 20% O₂ kultiviert. Die Arbeiten zur Kultivierung der Zelllinien wurden in Sterilbänken durchgeführt. Die Tumorzelllinie wurde in unbeschichteten 75 ml Zellkulturflaschen gehalten und die ES-Zellen auf mit 0,1% Gelatine beschichteten Zellkulturplatten.

ES-Zellkulturmedium	Endkonz.
DMEM + GlutaMAX + Natrium Pyruvat (1 mM)	500 ml
β-Mercaptoethanol	100 µM
Nichtessenzielle Aminosäuren	1x
Essenzielle Aminosäuren	1x
L-Glutamin	2 mM
Penicillin/Streptomycin	50 µg/ml
Fetales Kälberserum (FCS)	15%
Leukemia Inhibitor Factor (LIF)	1000 U/ml

Material und Methoden

TCam-2 Kulturmedium	Endkonz.
RPMI	500 ml
L-Glutamin	2 mM
Penicillin/Streptomycin	50 µg/ml
Fetales Kälberserum (FCS)	10%

2.3.2 Herstellung muriner, embryonaler Fibroblasten (EF-Zellen)

Murine, embryonale Fibroblasten (EF-Zellen) wurden aus 13,5 Tage alten Mausembryonen gewonnen. Kopf und Organe der Embryonen wurden entfernt und das Rumpfgewebe mittels einer Schere zerkleinert, in 0,05% Trypsin/0,02% EDTA in PBS transferiert und bei 37°C für 30 Min inkubiert. Anschließend wurde mit einem Volumen Medium abgestoppt und durch auf- und abpipettieren die Zellen vereinzelt. Mit Hilfe eines Zellsiebes (Maschenweite 40 µm) wurden die Zellen isoliert und in einem 50 ml Blaukappenröhrchen gesammelt. Die Zellsuspension wurde mittels Zentrifugation pelletiert, in Fibroblasten-Medium resuspendiert und auf eine 15 cm Zellkulturplatte ausplattiert (etwa 1 Embryo/Platte). Sobald die EF-Zellen konfluent waren, wurden sie im Verhältnis 1:3 gesplittet. Bei Konfluenz wurden die EF-Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Die EF-Zellen wurden mit γ -Strahlen (9 Gray) bestrahlt, wobei sie ihre Fähigkeit zur Zellteilung verlieren. Anschließend wurden die bestrahlten EF-Zellen in Aliquots in geeigneter Zellzahl eingefroren. Hierzu wurden die Zellen in Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen gegeben. Diese wurden über Nacht bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.3.3 Generierung muriner, embryonaler Stammzelllinien

Zur Herstellung *Blimp1mVenus/Tfap2c^{flox/flox}* embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) wurden aus der Verpaarung von *Blimp1mVenus* (*Tg^{(Prdm1-Venus1)Sait}*, MGI:3805969) (Ohinata et al., 2008) mit *Tfap2c^{flox/flox}* Mäusen (*Tfap2c^{tm1Hsc}*, MGI:2176695) (Werling und Schorle 2002) Blastozysten gewonnen. Zur Bestimmung des Schwangerschaftstages wurde der Morgen, an dem ein Vaginalpfropf festgestellt werden konnte, als Tag 0,5 der Embryonalentwicklung (post coitum) festgesetzt. Die schwangeren Mäuse wurden an Tag 3.5 post coitum durch zervikale Dislokation getötet, der Uterus entnommen, in PBS überführt und zur Gewinnung der Blastozysten mit EF-Medium gespült. Jeweils eine Blastozyste wurde in eine Vertiefung einer 96 Loch-Mikrotiterplatten auf γ -bestrahlten EF-Zellen gesammelt und

Material und Methoden

in ES- Medium + MEK1/2 Inhibitor (0,05 mM) kultiviert. Nach Auswachsen der inneren Zellmasse, wurde die Zellen für 10 Min bei 37°C mit Accutase vereinzelt und im Verhältnis 1:1 auf eine 48 Loch-Mikrotiterplatte ausgesät. Entsprechend des Wachstums der Zellen wurde nach drei Tagen die Platte auf zwei 48 Loch-Mikrotiterplatten gesplittet. Eine der beiden Platten diente der DNS-Gewinnung zur Bestimmung des Genotyps der Zellen und die andere zum weiteren Expandieren der Zellen.

2.3.4 Dissoziation und Passagieren von ES-Zellen

Bei einer Zelldichte von ca. 90%, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 3 – 5 Min mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA oder Accutase bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von Trypsin-Inhibitor oder Kulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert, durch auf- und abpipettieren die Zellen vereinzelt und anschließend bei 1000 rpm für 3 Min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in Kulturmedium resuspendiert und in gewünschter Zellzahl (1:1 bis 1:10 Verdünnung) auf mit 0,1% Gelatine beschichteten Platten ausplattiert.

2.3.5 Herstellung von *Blimp1mVenus/Tfap2c^{-/-}* embryonaler Stammzellen

Die expandierten *Blimp1mVenus/Tfap2c^{flox/flox}* ES-Zellen wurden auf EF-Zellen ausplattiert und für 30 Min kultiviert. Anschließend wurden die Zellen transient mit dem pGK-Cre Vektor unter Verwendung des FuGENE® HD Transfektions Reagenz transfiziert. Die Transfektion wurde wie vom Hersteller beschrieben in einem 3:1 Verhältnis (Transfektionsreagenz zu Plasmid) durchgeführt. Der pGK-Cre Vektor exprimiert die Cre-Rekombinase, welche die *loxP*-Stellen erkennt. Durch Exzision der *loxP*-Stellen und des dazwischen liegenden 5. Exons des *Tfap2c* Gens, resultieren *Blimp1mVenus/Tfap2c^{-/-}* ES-Zellen. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Exzision des *Tfap2c*-Genlokus wurden PCR-Analysen durchgeführt (siehe 2.4.8).

2.3.6 Auftauen von ES- und EF-Zellen

In Kryoröhrchen eingefrorene Zellen wurden unmittelbar nach Entnahme aus dem Stickstofftank in einem 37°C Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen zur Verdünnung des DMSO, welches als Gefrierschutzmittel im Einfriermedium enthalten ist, in 3 ml Kulturmedium aufgenommen und für 3 Min bei 1000 rpm

Material und Methoden

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und auf 0,1% Gelatine behandelte Platten und EF-Zellen ausplattiert.

2.3.7 Kultivierung der ES-Zellen in Serum-freiem Medium

Zu Beginn wurden die ES-Zelllinien von den EF-Zellen getrennt. Hierzu wurden die Zellen vereinzelt und auf gelatinisierte Zellkulturplatten für 45 Min bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Während dieser Zeit setzen sich die EF-Zellen auf der gelatinisierten Platte ab, wohingegen die ES-Zellen sich weiterhin im Überstand befinden. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Der so erhaltene Überstand enthielt nun zu etwa 99% ES-Zellen, die anschließend in 2i-Medium überführt wurden (Hayashi et al., 2011). Dieses Medium ist ein Serum-freies Zellkulturmedium für ES-Zellen, dem neben 1000 u/ml Leukemia Inhibitor Factor (LIF) auch Inhibitoren für die Glykogen Synthase Kinase-3 (3 µM GSK-3) und den MAPK/ERK (1 µM MEK) Signalweg hinzugefügt wurden. Zur Kultivierung der Zellen wurden Loch-Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C mit 0,01% Poly-L-Ornithine und dann für 30 Min mit Laminin (10 µg/ml) bei 37°C beschichtet. Bevor die Zellen auf diese beschichteten Platten ausplattiert werden konnten, wurden die Platten zweimal mit H₂O gewaschen. Da sich im 2i-Medium kein Serum befindet, welches zum Abstoppen der Trypsinreaktion genutzt werden kann, wurden die Zellen mit Accutase vereinzelt und passagiert (siehe 2.3.4). Zudem wurde Einfriermedium (10% DMSO in DMEM/F12 / Neurobasal Medium) ohne FCS benutzt. Das 2i-Medium setzt sich wie folgt zusammen:

2i-Medium	Endkonz.
DMEM/F12 + Glutamax : Neurobasal Medium	1:1
N2-Supplement	1x
B27-Supplement	1x
Glutamin	2 mM
BSA	2,5 mg/ml
β-Mercaptoethanol	100 µM
Insulin	1 mg/ml
MEK1/2-Inhibitor (PD0325901)	1 µM
GSK3- Inhibitor (CHIR99021)	3 µM
LIF	1000 u/ml

Material und Methoden

2.3.8 Herstellung von 3D-Zellaggregaten (Embryoid bodies)

Zur Aggregation von ES-Zellen in Embryoid Bodies (EBs) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin vereinzelt. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt, um die Zellen in definierter Zellzahl aggregieren lassen zu können. Die EB Generierung wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Methoden und Medien vorgenommen:

2.3.8.1 Aggregation von ES-Zellen in Tropfenkulturen (‘hanging drop culture’)

Zunächst wurde in EB-Medium plus BMP4 (100 ng/ml) eine Suspension (30000 ES-Zellen/ml) hergestellt (Young et al., 2010). Mit der 12-Mehrkanalpipette wurden jeweils 25 µl (= 750 Zellen) in den Deckel einer 15 cm Zellkulturplatte pipettiert. Nach vorsichtigem Drehen des Deckels um 180° konnten die Zellen mittels Schwerkraft im unteren Bereich des hängenden Tropfens (‘hanging drop’) sedimentieren und zu EBs aggregieren. Nach dreitägiger Inkubation in den hängenden Tropfen wurden etwa 300 EBs in einer 10 cm Bakterienkulturplatte für weitere zwei Tage kultiviert. Das EB-Medium hat folgende Zusammensetzung:

EB-Medium	Endkonz.
DMEM + GlutaMAX + Natrium Pyruvat	500 ml
FCS	15%
Nicht essenzielle Aminosäuren	1x
Essenzielle Aminosäuren	1x
L-Glutamin	2 mM
β-Mercaptoethanol	100 µM
Penicillin/Streptomycin	1x
BMP4	100 ng/ml

2.3.8.2 Aggregation von ES-Zellen in 96 Loch-Mikrotiterplatten

Für die Aggregation von ES-Zellen in 96 Loch-Mikrotiterplatten wurden die in 2i-Medium kultivierten ES-Zellen benutzt. Basierend auf der Methode publiziert von Hayashi et al. 2011 wurden die ES-Zellen zunächst vereinzelt und gezählt. Jeweils 1 x10⁵ Zellen wurden in eine Vertiefung einer mit humanem Fibronectin (16,7 µg/ml) beschichteten 12 Loch-Mikrotiterplatte überführt. Die Zellen wurden für zwei Tage bei 37°C in einem Medium kultiviert, welches Activin A, bFGF und Knockout Serum

Material und Methoden

Replacement (KSR) beinhaltet, um eine Differenzierung in Epiblast-ähnliche Zellen (EpiLCs) zu erzielen. Das Medium (EpiLC Medium) wurde jeden Tag gewechselt.

EpiLC Medium	Endkonz.
DMEM/F12 + Glutamax : Neurobasal Medium	1:1
N2-Supplement	1x
B27-Supplement	1x
L-Glutamin	2 mM
BSA	2,5 mg/ml
β-Mercaptoethanol	100 μM
Activin A	20 ng/ml
murines bFGF	12 ng/ml
KSR	1 %

Nach zweitägiger Differenzierung der Zellen in EpiLCs wurden diese vereinzelt und ausgezählt. Anschließend wurden 1000 Zellen in einem Volumen von 60 μl in Keimzell-Differenzierungsmedium aufgenommen und in jede Vertiefung einer U-Boden förmigen 96 Loch-Mikrotiterplatten überführt. Die Inkubationsdauer erfolgte für vier Tage bei 37°C, 5% CO₂ und 20% O₂. Das Keimzell-Differenzierungsmedium (PGCLC Medium) setzt sich wie folgt zusammen:

PGCLC Medium	Endkonz.
Glasgow MEM (GMEM BHK 21)	6 ml
Nicht-essenzielle Aminosäuren	0,1 mM
Sodium Pyruvat	0,1 mM
L-Glutamin	2 mM
Penicillin/Streptomycin	0,1 mg/ml
β-Mercaptoethanol	100 μM
LIF	1000 u/ml
KSR	15 %
Human recombinant BMP4	500 ng/ml
Maus recombinant SCF	100 ng/ml
Human recombinant BMP8b	500 ng/ml
Maus recombinant EGF	50 ng/ml

2.3.9 Separation der primordialen Keimzellen mittels Durchflusszytometrie

Die generierten EBs wurden in 15 ml Blaukappenröhrchen gesammelt, mit PBS gewaschen und für 3 Min bei 1000 rpm zentrifugiert. Mit Trypsin oder Accutase wurde das Pellet bei 37°C für 3 Min inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die Zellen einige Male auf- und abpipettiert um eine Zellsuspension zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen in entsprechendem Differenzierungsmedium aufgenommen und durch ein Sieb (Maschenweite 40 µm) gefiltert, zur Entfernung der nicht dissoziierten Zellen. Die Durchflusszytometrie wurde mit einem FACS Aria III Durchflusszytometer ausgeführt. Die Datenanalyse erfolgte mit der FACSDiva 6.3.1 Software. Die Signifikanz wurde mit dem Zweistichproben T-Test bestimmt und ein p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant betrachtet.

2.3.10 Fixierung von ES-Zellen und Embryoid Bodies

Hierzu wurden die ES-Zellen (in 48 Loch-Mikrotiterplatten)/ EBs (in 96 Loch-Mikrotiterplatten) zunächst mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch Zugabe von 4% PFA in PBS für 5 (ES) oder 30 (EBs) Min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 Min bei RT mit 1,25M Glycin inkubiert. Die Zellen wurden dann bis zur weiteren Verwendung in PBS bei 4°C gelagert.

2.3.11 Permeabilisierung von Zellen

Die fixierten Zellen und EBs wurden mit 0,1% TritonX-100 in PBS für 1 -5 Min permeabilisiert und anschließend mit PBS bei RT gewaschen.

2.3.12 Immunfluoreszenz auf ES-Zellen und EBs

Nach der Permeabilisierung der Zellen wurden diese für 1 h bei RT in 1,5% BSA in PBS inkubiert, auf diese Weise werden unspezifische Bindestellen blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 1,5% BSA in PBS über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und für 1 h mit einem fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Zellen wurden diese mit 0,1 mg Hoechst H3342 in PBS für 5 Min bei RT inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Abschließend wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

2.3.13 Herstellung und Immunhistochemische Färbung von Zytospins

Jeweils 1000 der separierten Blimp1^{mVenus} positiven PGCLCs wurden in 100 µl 1,5% BSA in PBS aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde dann mit Hilfe eines Zytospins für 2 Min bei 2000 rpm auf einen Objektträger zentrifugiert. Danach wurden die Zellen auf den Objektträgern mit 4% Formaldehyd für 20 Min fixiert und anschließend zweimal mit H₂O gewaschen und luftgetrocknet. Die Antigendemaskierung erfolgte in der Mikrowelle mit Citratpuffer pH6 (180 Watt für 8 Min). Die Objektträger wurden dann für 15 Min auf RT gekühlt, mit H₂O gewaschen und in den Autostainer 480 S gegeben. Dann erfolgte zuerst die Inhibierung der Peroxidase Aktivität für 10 Min mit Peroxidase Blocking-Puffer. Die Primärantikörper-Inkubation erfolgte für 30 Min und anschließend mittels eines Detektionssystems, welches aus einer Enhancerkomponente (10 Min Inkubation), einer Polymerkomponente (20 Min Inkubation) und Diaminobenzidin (8 Min Inkubation) besteht, nachgewiesen. Die Kernfärbung erfolgte für 3 Min mit Hämatoxylin und anschließend mit warmem Wasser gewaschen. Abschließend wurden die Objektträger in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und in Xylol überführt und in Pertex eingebettet.

2.3.14 Zellzyklusanalyse

1 / 2 x 10⁵ mVenus positive Zellen wurden mit PBS gewaschen, zentrifugiert (1000 rpm für 5 Min) und in 500 µl PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 80% Ethanol (-18°C) geträufelt und über Nacht bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurden die fixierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 500 µl PBS, je 1 µl RNase, 0,5 µl Triton-X und 25 µl Propidium-Iodid (1 mg/ml) aufgenommen und 30 Min im Dunkeln gefärbt. Die Durchflusszytometrie zur Bestimmung der DNS-Gehalte wurde mit dem FACS Canto durchgeführt und mit der Software FACS Diva analysiert. Zur Bestimmung der Phasen des Zellzyklus wurde die FlowJo Software (Tree Star Inc) benutzt und eine Zellzyklus Analyse mit dem Dean-Jett-Fox Modell (Fox, 1980) durchgeführt. Als signifikant wurde ein p-Wert von < 0,05 angesehen.

2.3.15 Tierhaltung

Die Mäuse wurden auf Streu in makrolon Käfigen TypII long gehalten und erhielten Trockenfutter und Wasser. Der Tag-/ Nachtzyklus betrug jeweils 12 h. Zur Unterscheidung der Tiere, wurden sie im Alter von drei Wochen mit nummerierten

Material und Methoden

Ohrmarken versehen und eine Schwanzbiopsie zur DNS-Gewinnung durchgeführt. Das Töten der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation.

2.4 Methoden der Nukleinsäureanalytik

2.4.1 DNS-Isolation aus Schwanzbiopsien und Zellen

Die Gewebestücke oder Zellpellets wurden über Nacht in 710 µl DNS-Lyse-Puffer und 40 µl ProteinaseK Lösung (10 mg/ml) bei 55°C lysiert. Am folgenden Tag wurden die Proben 5 Min bei 55°C und 1400 rpm schüttelnd inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl 5M NaCl wurden die Proben erneut 5 Min gemischt, anschließend für 10 Min bei 13.000 rpm/10°C zentrifugiert. Zur Präzipitation wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt in dem 500 µl Isopropanol vorgelegt waren. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 Min bei 13.000 rpm/ 4°C wurde das Präzipitat zweimal mit 500 µl 80% Ethanol gewaschen und anschließend für 10 Min getrocknet. Die DNS wurde in 400 µl H₂O aufgenommen und für mindestens 2 h bei 37°C gelöst.

2.4.2 DNS-Isolation in 96 Loch-Mikrotiterplatten

Zur DNS-Isolation in 96 Loch-Mikrotiterplatten wurden 4,5 ml DNS-Lysis-Puffer mit 0,5 ml ProteinaseK (10 mg/ml) vermischt. 50 µl dieser Mischung wurden in jeweils eine Vertiefung einer 96 Loch-Mikrotiterplatten gegeben, die Platte mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 56°C im Wasserbad in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die DNS mittels Zugabe von 100 µl 100% Ethanol und 2,5 h unter leichtem Schütteln gefällt. Es folgte ein Waschschriff mit 100 µl 80% Ethanol für 1 Min. Der 80% Ethanol wurde anschließend verworfen und das Präzipitat für 45 Min bei RT getrocknet, in 50 µl H₂O/Loch aufgenommen und die DNS über Nacht bei 56°C in einer feuchten Kammer gelöst.

2.4.3 RNS-Isolation aus Geweben und Zellen

Die RNS wurde entweder mittels Qiagen RNaeasy Mini Kit nach Herstellerangaben oder mittels TRIzol® isoliert. Bei der Trizol-Isolierung wurden die Zellen einer 6 Loch-Mikrotiterplatte geerntet und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml Trizol resuspendiert und für 5 Min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Reaktionsgefäß invertiert und für weitere 2 Min bei RT inkubiert. Anschließend wurde bei 4°C für 15 Min und 13000 rpm zentrifugiert. 500 µl

Material und Methoden

Isopropanol wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und die wässrige Phase darin überführt. Die präzipitierte RNS wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend bei RT 10 Min luftgetrocknet. Abschließend wurde die RNS in 30 μ l H₂O aufgenommen und bei 55°C für 10 Min gelöst. Zur späteren Verwendung wurde die RNS bei -80°C eingefroren.

2.4.4 DNS- und RNS-Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung von nukleinsäurehaltigen Lösungen erfolgte durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Dies entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Das jeweilige Lösungsmittel wurde als Referenz verwendet. Die Konzentrationen wurden photometrisch per NanoDrop gemessen. Die DNS wurde als ausreichend rein angesehen, wenn ein Verhältnis von OD 260/280 > 1,8 gegeben ist. Bei Reinheit der RNS entspricht der Wert 2,0 bei einer OD 260/280.

2.4.5 DNase Verdau

Für den DNase Verdau von RNS-Lösungen wurde 1 μ l 10x DNase Reaktionspuffer, 1 μ l DNase1 (1 Unit) und die entsprechende Menge RNS (100- 500 ng) mit DEPC-Wasser auf 10 μ l aufgefüllt und für 30 Min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μ l 50 mM EDTA abgestoppt und für 10 Min auf 65°C erhitzt. Der Verdau wurde für 1 Min auf Eis gestellt und anschließend für die cDNS-Synthese verwendet.

2.4.6 cDNS-Synthese

Die isolierte und DNase verdaute RNS wurde mit Hilfe von dem Fermentas Revert Aid Premium Kit nach Herstellerangaben in cDNS umgeschrieben.

2.4.7 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion, auch als PCR bezeichnet, dient der *in vitro* Vervielfältigung eines bestimmten DNS-Abschnittes. Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass DNS bei Temperaturen von mehr als 90°C in Einzelstränge denaturiert und kleinere Oligonukleotide (sogenannte Primer) sich bei einem Absenken der Temperatur an die homologen Sequenzen anlagern. Dies wird als Annealing bezeichnet. Thermostabile DNS- Polymerasen beginnen ausgehend vom 3'-Ende der

Material und Methoden

Primer neue komplementäre DNS- Stränge nach Vorgabe der DNS- Matrizen zu synthetisieren. Mehrere aufeinander folgende Zyklen der Denaturierung, Primeranlagerung und Synthese der DNS-Doppelstränge, bewirken eine exponentielle Amplifikation der zwischen den Primern liegenden Sequenzen. Im Folgenden wird der Reaktionsansatz einer PCR detailliert aufgeführt:

Reaktionsansatz PCR	
cDNS	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Oligonukleotid-F (10 µM)	1 µl
Oligonukleotid-R (10 µM)	1 µl
PCR-Puffer (10x)	5 µl
Taq DNS- Polymerase (5 Units)	0,2 µl
ad 50 µl ddH ₂ O	

Reaktionsprotokoll für den Nachweis von Transkripten:

3 Min bei 94°C

45 s bei 94°C

30 s bei 55-62°C

30 s bei 72°C

5 Min bei 72°C

} Anzahl der Zyklen ist abhängig von PCR

2.4.8 Genotypisierung muriner Allele

Zur Bestimmung der Genotypen der Schwanzbiopsien und Zellen wurde DNS isoliert. Anschließend erfolgte eine Amplifikation der zu untersuchenden DNS- Abschnitte. Der Reaktionsansatz für die Genotypisierung muriner Allele ist wie folgt:

Reaktionsansatz für die Genotypisierung muriner <i>Tfap2c</i> -Allele	
genomische DNS	5 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
In4down Oligonukleotid (10 µM)	1 µl
Ex5up Oligonukleotid (10 µM)	1 µl
Ex6up Oligonukleotid (10 µM)	1 µl
PCR-Puffer (10x)	5 µl
Taq DNS- Polymerase (5 Units)	0,2 µl
ad 50 µl ddH ₂ O	

Material und Methoden

Reaktionsprotokoll für die Genotypisierung muriner *Tfap2c*-Allele:

3 min bei 94°C
45 s bei 94°C
30 s bei 53,5°C
1,5 min bei 72°C
5 min bei 72°C

} x31

Reaktionsansatz für die Genotypisierung muriner *Blimp1mVenus*- Allele

genomische DNS	5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Oligonukleotid – F (10 µM)	1 µl
Oligonukleotid – R (10 µM)	1 µl
PCR-Puffer (10X)	5 µl
Taq DNS- Polymerase (5 Units)	0,2 µl
ad 50µl ddH2O	

Reaktionsprotokoll für die Genotypisierung muriner *Blimp1mVenus*- Allele:

3 Min bei 94°C
30 s bei 94°C
30 s bei 58°C
30 s bei 72°C
5 Min bei 72°C

} x30

2.4.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, um doppelsträngige DNS-Fragmente in einer Gelmatrix ihrer Größe nach aufzutrennen. Zur Herstellung der Gelmatrix wurde Agarose in 1x TAE-Puffer aufgenommen, aufgeköcht und nach kurzer Abkühlphase Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) der flüssigen Agarose zugegeben. Nach Polymerisation der Agarose wurde diese mit 1x TAE-Puffer überschichtet und die DNS-Ladepuffer-Gemische in Geltaschen aufgetragen. Durch Anlegung einer elektrischen Spannung trennen sich die DNS-Fragmente ihrer Größe nach auf. Die DNS-Fragmente sind negativ geladene Moleküle und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Ein Größenstandard wurde zur Bestimmung der Größen der einzelnen Fragmente zusätzlich aufgetragen. Die Detektion und Dokumentation der Nukleinsäuren wurde unter UV-Licht ($\lambda = 322 \text{ nm}$) durchgeführt.

Material und Methoden

2.4.10 Aufreinigung von DNS-Fragmenten

Zur Aufreinigung der DNS nach einer PCR oder zur Durchführung einer ChIP-PCR wurde die DNS mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kits von Qiagen gereinigt. Die DNS-Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.4.11 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR) dient sowohl als Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, als auch der gleichzeitigen Quantifizierung der DNS mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen. Dazu wurde der DNS interkalierende Farbstoff SYBR Green benutzt, welcher an doppelsträngige DNS bindet. Die quantitative qRT wurde mit dem Real-Time PCR System ViiA™7 durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der ViiA™7 Software und anschließend mit dem Microsoft Excel Programm. Eine Schmelzkurvenanalyse wurde zur Ermittlung der Fragmentlängen der PCR-Produkte durchgeführt, mit dieser konnte die Spezifität der Produkte bestimmt werden.

Für die qRT-PCR wurden 0,3 µl cDNS mit 5 µl SYBR GreenER qPCR SuperMix, je 0,25 µl 10 mM Forward und Reverse Primer und 4,2 µl H₂O angesetzt. Die Messungen wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt und die ermittelten CT- Werte (CT = cycle threshold) entweder gegen das Referenzgen *Gapdh* oder *beta- Aktin* normiert (Δ CT-Wert). Aus den ermittelten Werten wurde der $\Delta\Delta$ CT-Wert berechnet, indem der Quotient der Kontroll- und Testwerte gebildet wurde. Die Signifikanz wurde mit dem Zweistichproben T-Test bestimmt und ein p-Wert von <0,05 wurde als signifikant betrachtet.

2.4.12 cDNS Microarray Analyse

Die cDNS Microarray Analyse wurde in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Andreas Zimmer und Frau Dr. Astrid Becker vom Institut für Molekulare Psychiatrie der Universitätsklinik Bonn durchgeführt.

100 ng RNS wurden in einem Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array verwendet. Die Integrität der RNS wurde mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers ermittelt. Die Microarrays wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und Fluoreszenz gefärbt. Das Auslesen des Arrays erfolgte mit einem GeneChip Scanner 3000 7G. Die Microarray Datenauswertung erfolgte in Kooperation mit Herrn Dr. Marcos Araúzo-Bravo vom Max-Planck Institut für Molekulare Biomedizin in Münster.

Material und Methoden

Die Normierung der Ergebnisse wurde mit dem RMA (Robust Multiarray Analysis) Algorithmus (Irizarry et al., 2003) durchgeführt und die weitere Datenverarbeitung und die Erstellung der Grafiken mit dem Matlab Programm. Die hierarchische Clustering Analyse wurde mit Hilfe der Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (kurz UPGMA) erstellt. Die Gen-Ontology Analyse basiert auf der AMIGO Gen-Ontology Datenbank (Ashburner et al., 2000). Die Signifikanz der Gen-Ontology Analyse der differenziell exprimierten Gene wurde mit der Hypergeometrischen Verteilung berechnet. Die Ergebnisse wurden als verändert angesehen bei $p < 0,05$ nach ungepaartem, FDR korrigierten T-Test nach Benjamini Hochberg. Die Microarray Daten, die in dieser Arbeit präsentiert werden, wurden auf NCBI's Gene Expression Omnibus veröffentlicht unter der GEO Series Accession Nummer: GSE45941.

2.4.13 Sonifizierung von DNS

Die mittels Durchflusszytometrie sortierten Zellen wurden zunächst für 10 Min bei 500 rcf und 4°C pelletiert. Dann wurden $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ Zellen in 500 µl kaltem PBS resuspendiert und 13,7 µl 37% Formaldehyd zugegeben. Die Fixierung erfolgte für 7 Min bei RT im Thermoschüttler mit 1100 rpm und wurde durch Zugabe von 57 µl 1,25 M Glycin und anschließender Inkubation für 5 Min bei RT bei 1100 rpm abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen bei 500 rcf für 5-10 Min zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurde 200 µl ChIP-Lysis-Puffer mit 25x Mini Complete Protease Inhibitor Cocktail versetzt und 10 Min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Sonifizierung der Zellen im Bioruptor für 2x 5 Min und 1x 2 Min im 30 s / 30 s Takt. Für die weitere Immunpräzipitation wurde die gescherte DNS von den Zellresten durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 Min bei 4°C getrennt, der Überstand abgenommen und bei -80°C gelagert (Schockfrieren mit flüssigem Stickstoff).

2.4.14 Chromatin-Immunpräzipitation

Eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) dient zum Nachweis, ob Proteine an bestimmte Sequenzen im Chromatin lebendiger Zellen binden. Zur Durchführung einer ChIP wurden 20 µl magnetische Kügelchen (Dynabeads® Protein G) in 500 µl ChIP-Dilution-Puffer resuspendiert und für 1 Min in den vorgekühlten Magneten eingespannt. Der Überstand wurde verworfen, die magnetischen Kügelchen in 50 µl

Material und Methoden

ChIP-Dilution-Puffer aufgenommen und 3 µg Antikörper (spezifischer Antikörper anti-Tfap2c (H77 Santa Cruz) und Kontrollantikörper anti-IgG rabbit (Millipore)) zugeben. Die Antikörper- Inkubation erfolgte im Thermomixer bei RT für 3 h. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die magnetischen Kügelchen mit ChIP-Dilution-Puffer gewaschen und 10 – 20 µg geschertes Chromatin in ChIP-Dilution-Puffer (mit 25x Mini Complete Protease Inhibitor Cocktail versetzt) zugegeben und für 16 h bei 4°C inkubiert. Dabei wurde jeweils die gleiche Menge DNS auf die Antikörper (spezifischer und Kontroll-Antikörper) aufgeteilt und zusätzlich 2% der gescherten DNS als Input-Kontrolle behalten. Am folgenden Tag wurde das Reaktionsgemisch in den vorgekühlten Magneten eingespannt, der Überstand verworfen und das Antikörper/ Chromatin- Gemisch dreimal mit 500 µl ChIP-Wasch-Puffer + 25x Protease-Inhibitor Cocktail bei 4°C für jeweils 10 Min gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift wurde das Reaktionsgemisch in 500 µl Wasch-Puffer resuspendiert und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, der Überstand verworfen und in 110 µl Elutions-Puffer resuspendiert. Die Elution erfolgte bei RT im Thermoschüttler bei 1100 rpm für 1 h. Anschließend wurden die 1,5 ml-Reaktionsgefäß in den Magneten eingespannt und der Überstand in ein PCR- Gefäß überführt. Die für die Input-Kontrolle zurückbehaltene DNS wurde in 110 µl Elutions-Puffer aufgenommen und ebenfalls in ein PCR- Gefäß überführt. Zur Aufhebung der DNS-Protein-Interaktionen wurde das immunpräzipitierte Chromatin mit 11 µl 5M NaCl und 6 µl ProteinaseK (10 mg/ml) versetzt und im Thermocycler über Nacht bei folgendem Programm inkubiert:

1:30 h bei 55°C

6:00 h bei 65°C

2:00 h bei 75°C

∞ bei 4°C

Das immunpräzipitierte Chromatin wurde mit einem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und in 10 µl H₂O eluiert und für weitere Amplifikationsschritte verwendet.

2.4.15 Amplifizierung von ChIP-DNS-Fragmenten

Zur Amplifizierung der immunpräzipitierten DNS-Fragmente wurde das Whole Genome Amplification Kit 4 (WGA4) nach Herstellerangaben verwendet. Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die Fragmente mit einer QIAquick-Säule aufgereinigt, in 30 µl H₂O eluiert und anschließend die Konzentration der ChIP-DNS Lösung mit dem Nano-Drop bestimmt.

Material und Methoden

2.4.16 Natrium-Bisulfit-Behandlung genomischer DNS

Die Natrium-Bisulfit-Behandlung genomischer DNS ist eine Methode, um die DNS-Methylierung ausgewählter Genloki überprüfen zu können. Die DNS-Methylierung wird enzymatisch von DNS Methyltransferasen (DNMTs) durch Übertragung einer Methylgruppe an die C5-Position von Cytosinen erstellt, hier hauptsächlich an CpG-Dinukleotiden.

Für die Untersuchung der DNS-Methylierung wurde zunächst genomische DNS aus Zellen isoliert (siehe 2.4.3), 150 ng genomischer DNS in 20 µl H₂O aufgenommen und nach Anleitung des EZ DNA Methylation Direct Kits konvertiert. Danach erfolgte eine achtminütige Denaturierung der DNS bei 98°C, da die anschließende Sulfonierung der Cytosine am 6. Kohlenstoffatom nur an einzelsträngiger DNS erfolgen kann. Bei der Deaminierung entsteht ein sulfoniertes Intermediat, dabei werden Cytosin-Sulfonate zu Uracil-Sulfonaten und bei der späteren Desulfonierung entsteht aus dem Uracil-Sulfonat Uracil. Wenn nun eine Methylgruppe an der C5-Position des Pyrimidinrings vorhanden ist, verhindert diese die Sulfonierung und es wird kein Uracil gebildet. Aus der Bisulfit-Behandlung resultieren DNS Bereiche, in denen zuvor unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt wurde, während methyliertes Cytosin nicht umgewandelt wird.

Die resultierende DNS wurde für eine PCR-Reaktion als Matrize genommen, bei der Primer entsprechend der zu untersuchenden Sequenz ausgewählt wurden. Es erfolgte eine sogenannte Nested-PCR, die genutzt werden kann um sehr geringe Mengen DNS amplifizieren zu können. Bei der ersten PCR wird der gewünschte Abschnitt der DNS erzeugt. Bei der zweiten PCR dient das Amplikon der ersten PCR als Template und die nun verwendeten Primer binden innerhalb dieses Template Bereiches. Der gewünschte Sequenzbereich wird so mit hoher Spezifität amplifiziert.

Reaktionsansatz für 1. PCR und 2. Nested-PCR Reaktionen

DNS / Template 1. PCR	2 µl / 6 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Oligonukleotid – F (10 µM)	1 µl
Oligonukleotid – R (10 µM)	1 µl
PCR-Puffer (10x)	5 µl
Platinum Taq DNS- Polymerase	0,3 µl
ad 50µl ddH ₂ O	

Material und Methoden

PCR Reaktionsprotokoll für die Amplifizierung des H19 Lokus (Hayashi et al, 2011):

1. PCR		2. Nested- PCR	
4 min bei 95°C	} x2	3 min bei 95°C	} x38
2 min bei 55°C		1 min bei 95°C	
2 min bei 72°C		1 min bei 55°C	
1 min bei 95°C	30 s bei 72°C		
2 min bei 55°C	} x39	5 min bei 72°C	
2 min bei 72°C			
5 min bei 72°C			

Die PCR-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese überprüft und anschließend wurde eine TA-Klonierung der PCR-Fragmente durchgeführt (siehe 2.2.7). Am folgenden Tag wurden die Ligationsansätze in kompetente *E.coli*-Bakterien transformiert, Übernachtskulturen angesetzt und am nächsten Tag die Plasmid isoliert. Ein Test- Restriktionsendonuklease Verdau wurde durchgeführt, zur Bestimmung der Plasmide mit inseriertem PCR- Fragment, und zur Sequenzierung (durchgeführt von Beckman Coulter Genomics) geschickt. Die resultierenden Sequenzierungsergebnisse wurden mit Hilfe der BISMA (Bisulfite Sequencing DNA Methylation Analysis) Software ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro* Analysen zur Aufklärung der funktionellen Rolle von Tfp2c während der Keimzell-Entwicklung

Die Spezifizierung der primordialen Keimzellen (Primordial Germ Cells = PGCs) erfolgt an Tag E6.25 der Embryonalentwicklung im Epiblasten und wird durch BMP-Signale vom extra-embryonalen Ektoderm und viszeralem Endoderm induziert (Lawson et al. 1999; Ying et al. 2000; Ying & Zhao 2001). Blimp1 und Prdm14 sind dabei die Schlüsselfaktoren der Keimzell-Spezifizierung.

Aufgrund der Tatsache, dass in *Tfp2c*-Nullmutanten keine PGCs ab dem Tag E8.0 detektiert werden können (Weber et al., 2010), stellte sich die Frage, wie es zum Verlust der PGCs kommt und welche Gene während der Keimzell-Entwicklung durch *Tfp2c* reguliert werden.

Aufgrund der Problematik, dass kurz nach der Spezifizierung lediglich 40 PGCs existieren (Saitou und Yamaji, 2010) und bis zum heutigen Zeitpunkt keine *in vitro* Kulturbedingungen für PGCs etabliert werden konnten, wurden *in vitro* Systeme zur Generierung von Keimzell-ähnlichen Zellen genutzt, die auf der Differenzierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) basieren.

3.2 Differenzierung von Keimzell-ähnlichen Zellen *in vitro*

Zur Generierung von Keimzell-ähnlichen Zellen aus ES-Zellen, wurde eine ES-Zelllinie genutzt, welche ein Stella-GFP-Reporter Konstrukt trägt. Das Konstrukt beinhaltet 10 kb der 5'-Sequenz, Exon 1 und Teile von Exon 2 des *Stella* Gens, welches mit einem eGFP-Konstrukt fusioniert ist (Payer et al., 2006). Stella ist bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt der beste Keimzell-spezifische Marker, da dieser ausschließlich in den PGCs exprimiert wird (Sato et al., 2002).

Jeweils 750 StellaGFP ES-Zellen wurden unter Zugabe von 100 ng BMP4 und ohne LIF in hängenden Tropfen (je 25 µl) für drei Tage kultiviert (Young et al., 2010). Während der dreitägigen Kultivierung bilden sich in den hängenden Tropfen Embryoid Bodies (EBs), in denen Nischen mit Keimzell-ähnlichen Zellen entstehen. Die EBs wurden gesammelt und für zwei weitere Tage in unbeschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Während dieses Zeitraums (Tag 3 – Tag 5) proliferieren die EBs und die StellaGFP-Fluoreszenz nimmt zu, was ein Indikator für die Keimzell-Differenzierung ist (Abbildung 10 A - F). Nach fünftägiger Differenzierung (Tag 5)

Ergebnisse

wurden die EBs eingesammelt und mit Trypsin vereinzelt. Die Anzahl GFP-positiver Zellen wurde mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie bestimmt. Diese lag an Tag 5 bei Durchschnittlich 2,3 % (Abbildung 10 G).

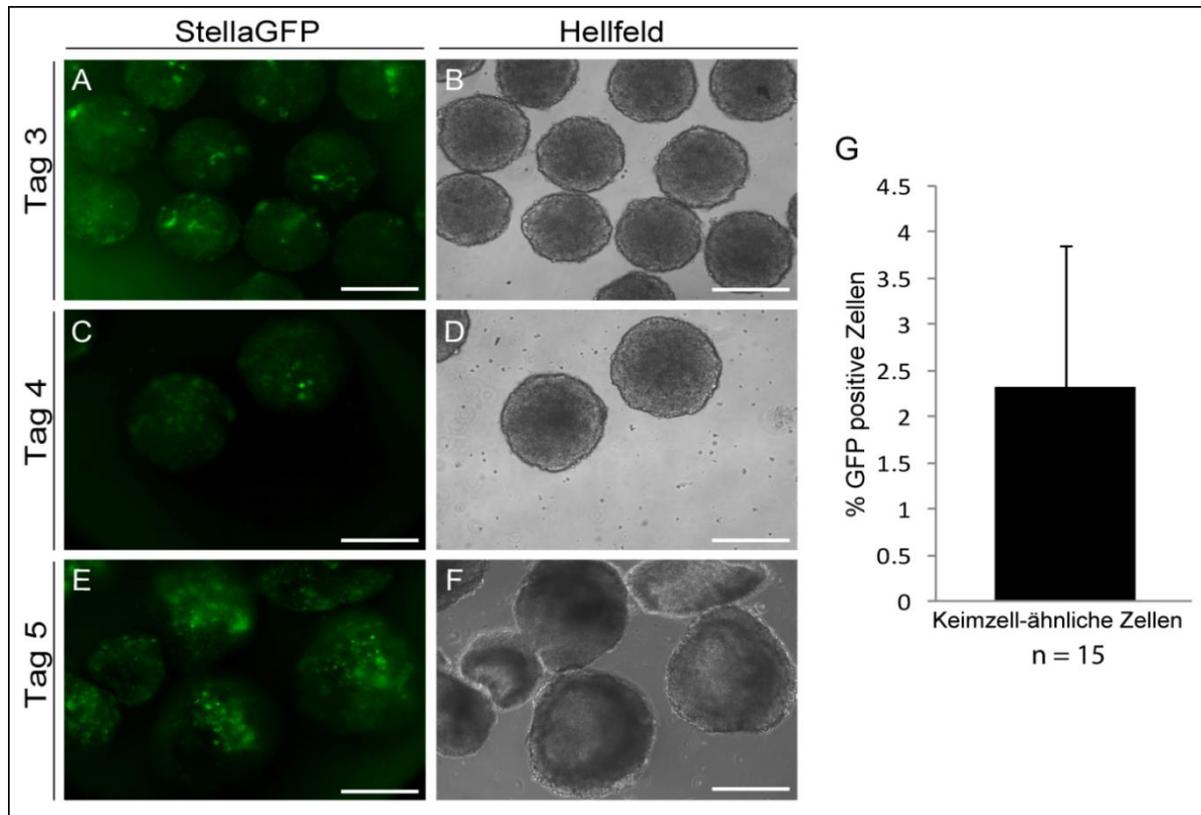


Abbildung 10: Differenzierung über fünf Tage von Keimzell-ähnlichen StellaGFP-positiven Zellen *in vitro*. [A, C, E] Mikroskopische Aufnahmen der StellaGFP-Fluoreszenz und [B, D, F] Die Aufnahmen der EBs zwischen Tag 3 und Tag 5 zeigen eine Zunahme der StellaGFP-Fluoreszenz im Verlauf der Differenzierung. Die Größenbalken entsprechen 250 μ m. [G] Durchflusszytometrische Analyse zur Ermittlung der Anzahl StellaGFP-positiver Zellen an Tag 5.

Zur Untersuchung der Expression Keimzell-spezifischer Gene während der *in vitro* Differenzierung von StellaGFP-Zellen, wurden quantitative RT-PCR-Analysen (qRT-PCR) (Abbildung 11 A) und Immunfluoreszenzfärbungen (Abbildung 11 B - E) durchgeführt. In den StellaGFP-positiven Zellen konnte im Vergleich zu den GFP-negativen Zellen eine signifikant erhöhte Expression früher Keimzellmarker wie *Blimp1* und *Prdm14* detektiert werden (Abbildung 11 A). Der Keimzellmarker *Tfap2c* wird ebenfalls in den StellaGFP-positiven Zellen exprimiert. Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte in einem Teil Stella-positiver Zellen, der Oberflächenmarker *Ssea1* detektiert werden (Abbildung 10 B - C). Dieser wird in Nierentubuli Zellen, im neuralen Ektoderm und in der Neuralleiste exprimiert, und ist zudem ein Marker für PGCs und ES-Zellen (Fox et al., 1981).

Ergebnisse

Zusammenfassend weist eine Expression Keimzell-spezifischer Marker wie *Blimp1*, *Prdm14*, *Tfap2c* und *Ssea1* darauf hin, dass unter den gewählten Kulturbedingungen eine Differenzierung von ES-Zellen in Keimzell-ähnliche Zellen stattfindet.

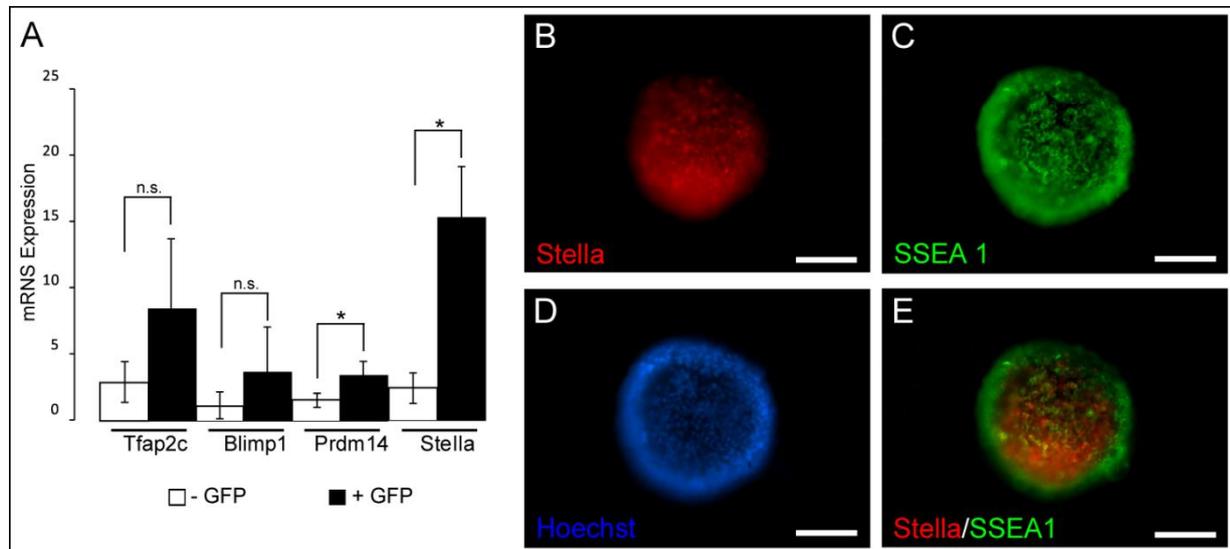


Abbildung 11: Untersuchung Keimzell-spezifischer Marker in StellaGFP-positiven Zellen. [A] qRT-PCR-Analyse zur Untersuchung der Expression Keimzell-spezifischer Marker in StellaGFP-positiven Zellen im Vergleich zu StellaGFP-negativen Zellen. Es wurde gegen *Gapdh* normiert und das Expressionslevel der ES-Zellen auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von biologischen Triplikaten. Ein p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant betrachtet (*). [B – E] Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis einer Stella [B] und SSEA-1 [C] Expression. [D] DNS-Färbung mit Hoechst. [E] Eine Überlagerung der Bilder B und C zeigt, dass einzelne Zellen *Stella* und *SSEA-1* exprimieren. Größenbalken entspricht 100 μm .

3.3 Der Transkriptionsfaktor *Tfap2c* bindet an regulatorische Regionen von *Dnmt3b*, *Dmrt1* und *Nanos3*

Wie gezeigt wurde, führt die Deletion von *Tfap2c* in der murinen Keimbahn zur Sterilität in männlichen und weiblichen Tieren durch Verlust der Keimzellen an Tag E8.0 (Weber et al. 2010). Die Keimzell-Spezifizierung findet in diesen Tieren statt, allerdings weist der Keimzell-Verlust daraufhin, dass *Tfap2c* für die Aufrechterhaltung des Keimzell-Schicksals essenziell ist. Es stellte sich nun die Frage, welche Gene von dem Transkriptionsfaktor *Tfap2c* reguliert werden, die bei der Aufrechterhaltung des Keimzell-Schicksals in murinen PGCs mitwirken. Dazu sollten Chromatin-Immunpräzipitations (ChIP) Analysen durchgeführt werden, mit denen eine direkte Bindung von *Tfap2c* an definierte Promotorregionen nachgewiesen werden können. Für die Durchführung einer ChIP-Analyse wurden 100.000 StellaGFP-positive Keimzell-ähnliche Zellen fixiert, lysiert und die DNS in 250–500 bp große Fragmente sonifiziert. Diese sonifizierten Chromatin-Fragmente wurden mit einem Antikörper spezifisch für den Transkriptionsfaktor *Tfap2c* (Santa Cruz; H77) inkubiert. Hierdurch

Ergebnisse

können Bindestellen von Tfp2c in verschiedenen Promotorregionen identifiziert werden. Die Spezifität des Tfp2c Antikörpers wurde mit einer IgG Kontrolle überprüft, wobei der IgG Antikörper keine spezifische Bindung an die Promotorregionen aufweist.

Mit Hilfe der rVISTA 2.0 Software (Loots and Ovcharenko, 2004) wurden Promotorregionen der Keimzell-spezifischen Gene *Dmrt1* und *Nanos3* und der *de-novo* Methyltransferase *Dnmt3b* auf konservierte Tfp2c Bindestellen überprüft (Abbildung 12 A - C). Tfp2 Proteine binden an die palindromischen Konsensussequenzen 5'-GCC N₃ GGC-3', 5'-GCC N₄ GGC-3' und 5'-GCC N_{3/4} GGC-3' (Mohibullah et al., 1999). Zur Untersuchung der Bindung von Tfp2c an die konservierten Bindestellen wurden quantitative PCR-Analysen (qPCR) nach der ChIP-Analyse durchgeführt. Dafür wurden Primer erstellt, welche den Bereich um die Konsensussequenz amplifizieren (Abbildung 12; rote Pfeile). Die Ergebnisse der qPCR, zeigen die relativen Bindungen von Tfp2c und des IgG Antikörpers an den untersuchten Promotorbereich, die jeweils gegen die Input Kontrolle normiert wurden. Die Input Kontrolle enthält nicht immunpräzipitiertes Chromatin. Anschließend wurden die berechneten Werte der IgG Kontrolle gleich Eins gesetzt.

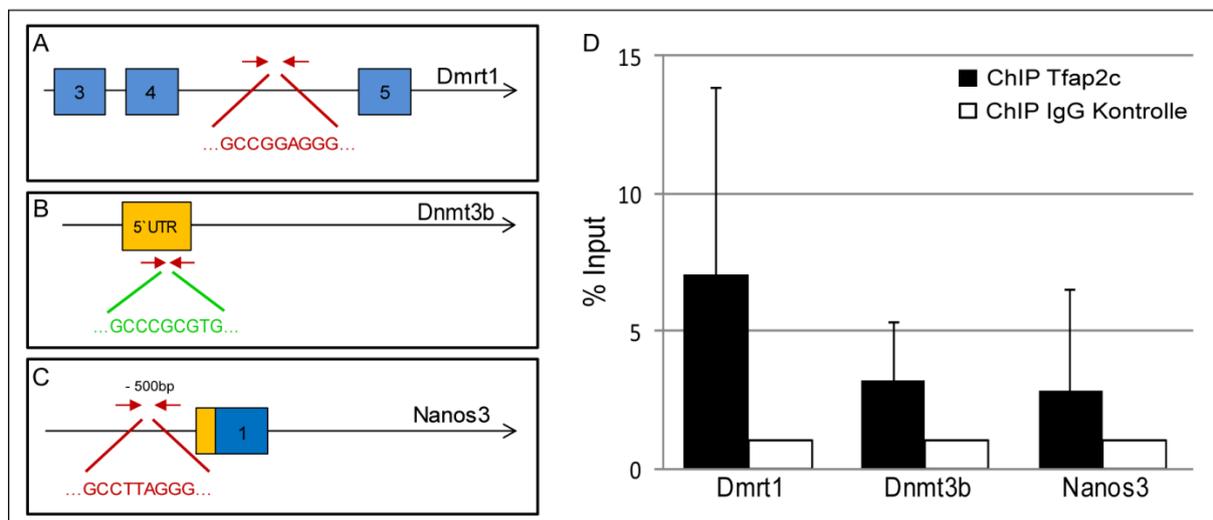


Abbildung 12: Chromatin-Immunpräzipitations- (ChIP) Analysen zur Identifizierung von direkten Tfp2c Zielgenen in StellaGFP Keimzell-ähnlichen Zellen. [A, B, C] zeigen schematische Darstellungen von Tfp2c (rote Markierung) und Tfp2 (grüne Markierung) Bindestellen in den Genen *Dmrt1*, *Dnmt3b* und *Nanos3*. [D] ChIP mit spezifischem Tfp2c Antikörper und einem IgG Antikörper zur Kontrolle. Die Ergebnisse der qPCR wurden gegen den Input normiert und die IgG Kontrolle gleich 1% gesetzt. Die ChIP Analyse wurde in biologischen Triplikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

Ergebnisse

Bei einer Bindung von Tfp2c an den untersuchten Promotorbereich, wird dieser Bereich mittels ChIP angereichert und der ermittelte qPCR-Wert übersteigt den IgG Kontrollwert 1. Auf diese Weise kann die Bindung von Tfp2c an eine Promotorregion belegt werden. Die untersuchten regulatorischen Regionen von *Dmrt1*, *Dnmt3b* und *Nanos3* zeigen alle bei der qPCR höhere Werte, was auf eine Anreicherung der Promotorregion durch die ChIP hinweist und somit auf eine Bindung von Tfp2c an diese Region (Abbildung 12 D).

3.4 Etablierung einer embryonalen Stammzelllinie mit einer *Tfp2c* Deletion

Zur Beantwortung der Frage, welche Gene in ES-Zellen und während der Keimzell-Entwicklung durch Tfp2c transkriptionell reguliert werden, sollten ES-Zelllinien generiert werden, die eine Deletion des Exon 5 im *Tfp2c* Gen aufweisen und so eine Funktionsverlustmutation (Loss-of-function-Mutation) tragen.

Des Weiteren sollten die ES-Zellen einen Keimzell-spezifischen Reporter besitzen, der nicht von Tfp2c reguliert wird. Die Expression des Keimzellmarkers *Stella* ist nach *Tfp2c* Verlust in Keimzell-ähnlichen Zellen reduziert. Hingegen konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Blimp1* in *Tfp2c*^{-/-} EBs unverändert vorliegt (Weber et al., 2010).

Zur Generierung von *Blimp1mVenus/Tfp2c*^{-/-} ES-Zelllinien wurden *Blimp1mVenus* Mäuse (Tg^(Prdm1-Venus1)Sait, MGI:3805969) (Ohinata et al., 2008) mit *Tfp2c*^{flox/flox} Mäusen (*Tfp2c*^{ctm1Hsc}, MGI:2176695) (Werling und Schorle, 2002b) verpaart. Die F2-Generation mit dem Genotyp *Blimp1mVenus/Tfp2c*^{flox/flox} wurde zur Gewinnung von Blastozysten miteinander verpaart. Es wurden 8 Blastozysten aus dieser Verpaarung gewonnen und in ES-Medium mit MEK1/2 Inhibitor kultiviert.

Ergebnisse

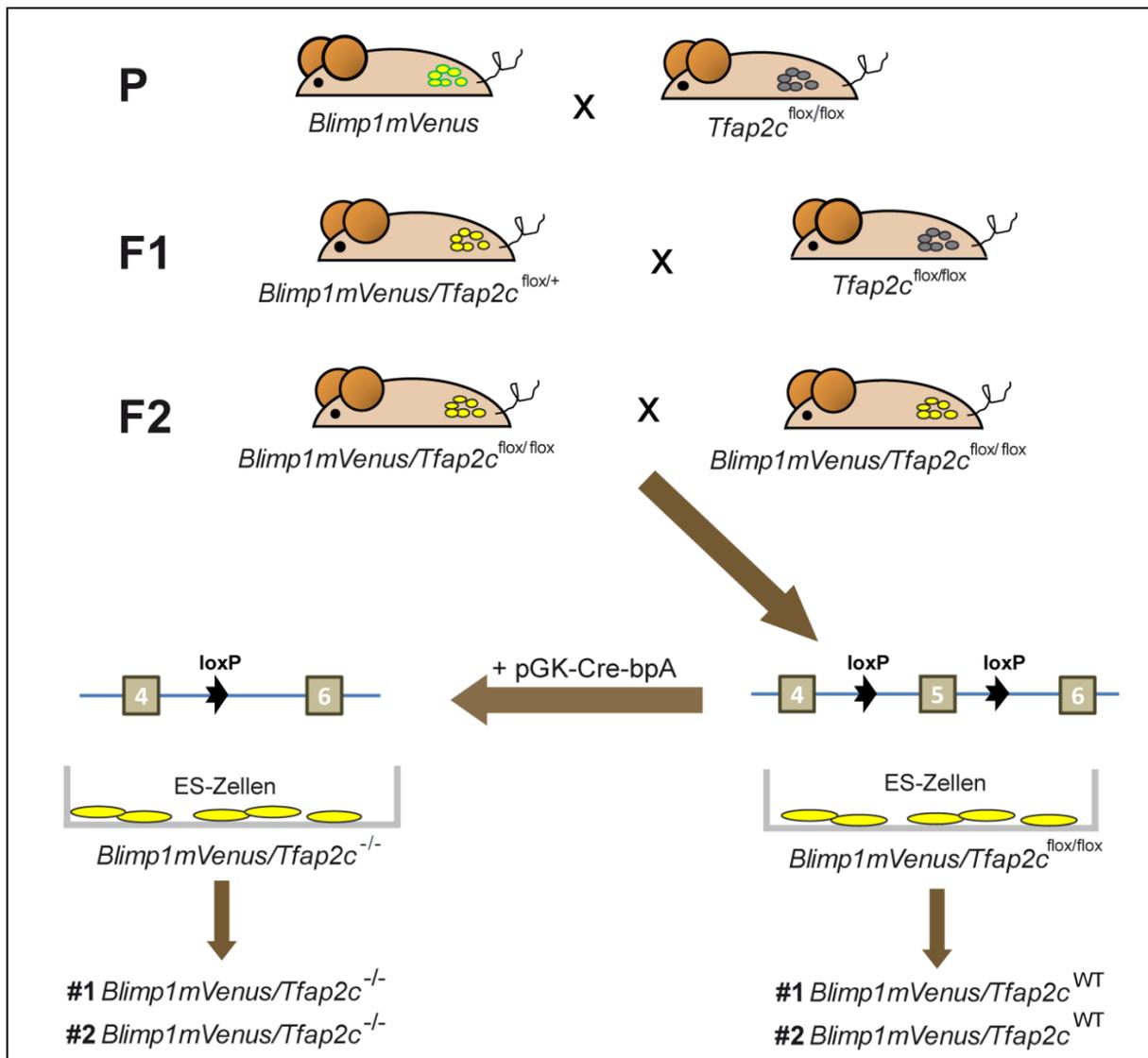


Abbildung 13: Schematische Darstellung zur Generierung der *Blimp1mVenus/Tfap2c^{WT}* und *Blimp1mVenus/Tfap2c^{-/-}* ES-Zelllinien. *Blimp1mVenus* Mäuse wurden mit *Tfap2c^{flox/flox}* Mäusen verpaart. Die Blastozysten zur ES-Zellgenerierung wurden aus Verpaarung der F2-Generation entnommen und kultiviert. Die etablierten Zelllinien wurden mit dem pGK-Cre-bpA Plasmid transient transfiziert, was in einer Exzision der loxP Fragmente resultiert und so zur Generierung der *Tfap2c^{-/-}* Zelllinien führt.

PCR-Analyse mit Primern, die spezifisch das Reporterkonstrukt mVenus erkennen, konnten drei ES-Zelllinien (#1, #2 und #6) identifizieren, die das *Blimp1mVenus* Reporter-Allel besitzen (Abbildung 14 A). Zwei dieser *Blimp1mVenus/Tfap2c^{flox/flox}* ES-Zelllinien (#1 und #2) wurden anschließend mit dem pGK-Cre-bpA Vektor transfiziert. Dieser Vektor kodiert für die Bakteriophage P1 Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Phosphoglycerat-Kinase-Promotors (PGK) und dem Polyadenylierungs-Signal (bpA) des Rinder-Wachstumshormons, welches der Termination der Cre-Rekombinase Transkription dient. Durch transiente Transfektion der ES-Zellen mit dem pGK-Cre-bpA Vektor erfolgte die Deletion des von loxP-

Ergebnisse

Elementen flankierten fünften Exons des *Tfap2c* Gens (Abbildung 13). Zwei Tage nach der Transfektion wurden 48 Einzelzellen von jeder Zelllinie (#1 und #2) gepickt und jeweils in einer Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte kultiviert. Die Charakterisierung der Einzelzellen erfolgte mittels PCR-Analyse.

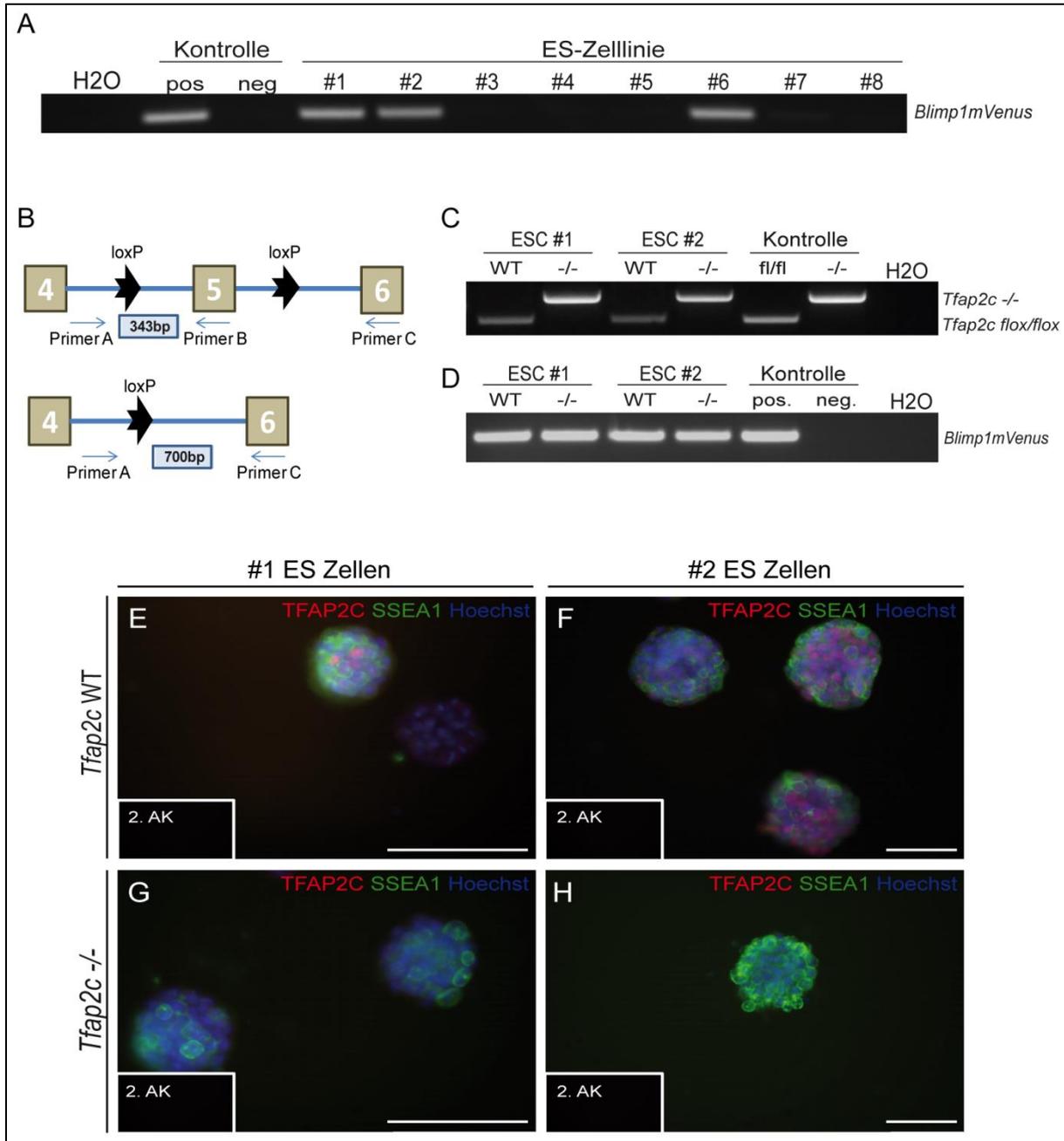


Abbildung 14: Genotypisierung der *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT} ES-Zelllinien. [A] PCR zur Bestimmung des *Blimp1mVenus* Allels in den etablierten ES-Zelllinien. [B] Schematische Darstellung der PCR-Strategie zur Bestimmung des *Tfap2c* Genotyps. [C; D] PCR zur Bestimmung der Genotypen der *Blimp1mVenus/Tfap2c*^{WT} und *Blimp1mVenus/Tfap2c*^{-/-} ES-Zelllinien #1 und #2. [E – H] Immunfluoreszenzfärbungen gegen *Tfap2c* und *Ssea1* in *Tfap2c*^{WT} und *Tfap2c*^{-/-} ES-Zellen. Die Zellkerne sind mit Hoechst angefärbt. Die Größenbalken entsprechen 100 µm. (Teile der Abbildung sind in Schemmer et al. 2013 publiziert)

Ergebnisse

Durch Einsatz von drei unterschiedlichen Primern, kann die Deletion von Exon 5 des *Tfap2c* Gens in einer PCR-Reaktion nachgewiesen werden. Bei erfolgreicher Deletion wird ein 700 Basenpaar (bp) großes Amplikon mit den Primern A und C synthetisiert, wohingegen bei gefloxtem *Tfap2c* Allel ein Amplikon von 343 bp mit den Primern A und B gebildet wird (Abbildung 14 B). Hierbei wird kein Amplikon mit den Primern A und C synthetisiert, da dieses größer als 700 bp wäre und dies durch die gewählte Dauer der Elongationsphase während der PCR unterbunden wird. Das Ergebnis der Genotypierungs-PCR zur Bestimmung des *Tfap2c* Genlokus, zeigt je zwei Subklone mit deletiertem Exon 5 (#1 *Tfap2c*^{-/-}/*Blimp1mVenus* und #2 *Tfap2c*^{-/-}/*Blimp1mVenus*) und zwei Linien mit intakten loxP Elementen (Abbildung 14 C). Diese parentalen *Blimp1mVenus/Tfap2c*^{flox/flox} Zelllinien wurden für alle weiteren Experimente als *Tfap2c* Wildtyp-Kontrollen betrachtet (#1 *Tfap2c*^{WT}/*Blimp1mVenus* und #2 *Tfap2c*^{WT}/*Blimp1mVenus*). Des Weiteren konnte in allen generierten ES-Zelllinien das *Blimp1mVenus* Reporter-Allel nachgewiesen werden (Abbildung 14 D). Zusätzlich wurde der Verlust des *Tfap2c* Proteins mittels Immunfluoreszenzfärbungen gegen *Tfap2c* überprüft (Abbildung 14 E - H). In beiden *Tfap2c*^{-/-}-Zelllinien konnte kein *Tfap2c* Protein detektiert werden (Abbildung 14 G und H). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die Zellen ihren Genotypen entsprechend als *Tfap2c*^{-/-} oder *Tfap2c*^{WT} bezeichnet.

3.5 *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT} ES-Zellen zeigen keine morphologischen Unterschiede in 2i-Medium

Für die erfolgreiche ES-Zellkultur ist die Kultivierung der Zellen auf embryonalen Fibroblasten (EF-Zellen) und die Zugabe des Leukemia Inhibitor Faktors (LIF) notwendig. Dieser aktiviert über den Jak/Stat Signalweg den Transkriptionsfaktor Stat3, welcher eine Differenzierung der ES-Zellen verhindert. Zudem wurde gezeigt, dass der MAPK/ERK-Signalweg durch Fgf4 Aktivierung zur Differenzierung der ES-Zellen führt (Kunath et al. 2007; Stavridis et al. 2007). Neuere Forschungsergebnisse konnten zeigen, dass eine Blockade des MAPK/ERK-Signalweges und des Glykogen Synthase Kinase-3 (Gsk3) Signalweges durch zwei spezifische Inhibitoren (2i) und die Zugabe von LIF ausreichen, um das ES-Zellschicksal aufrechtzuerhalten und die ES-Zellen im sogenannten „ground-state of pluripotency“ zu halten, welcher dem Zustand von Epiblast-Zellen entspricht (Ying et al. 2008; Nichols & Smith 2009).

Ergebnisse

Ein weiterer Vorteil dieser 2i-Kulturbedingungen ist, dass die Problematik der Verwendung von fetalem Kälberserum im Medium nicht mehr besteht. Fetales Kälberserum ist chargenbedingt unterschiedlich und es ist zudem unklar, welche Inhaltsstoffe im Serum die Differenzierung begünstigen oder inhibieren können. Die Differenzierung findet somit nicht unter genau definierten Bedingungen statt, was zu Schwankungen in der Effizienz und der Qualität führen kann.

Für weitere Experimente sollten die in dieser Arbeit generierten ES-Zelllinien in serum-freiem Medium und ohne EF-Zellen kultiviert werden, um möglichst homogene Bedingungen für die Differenzierung zu schaffen.

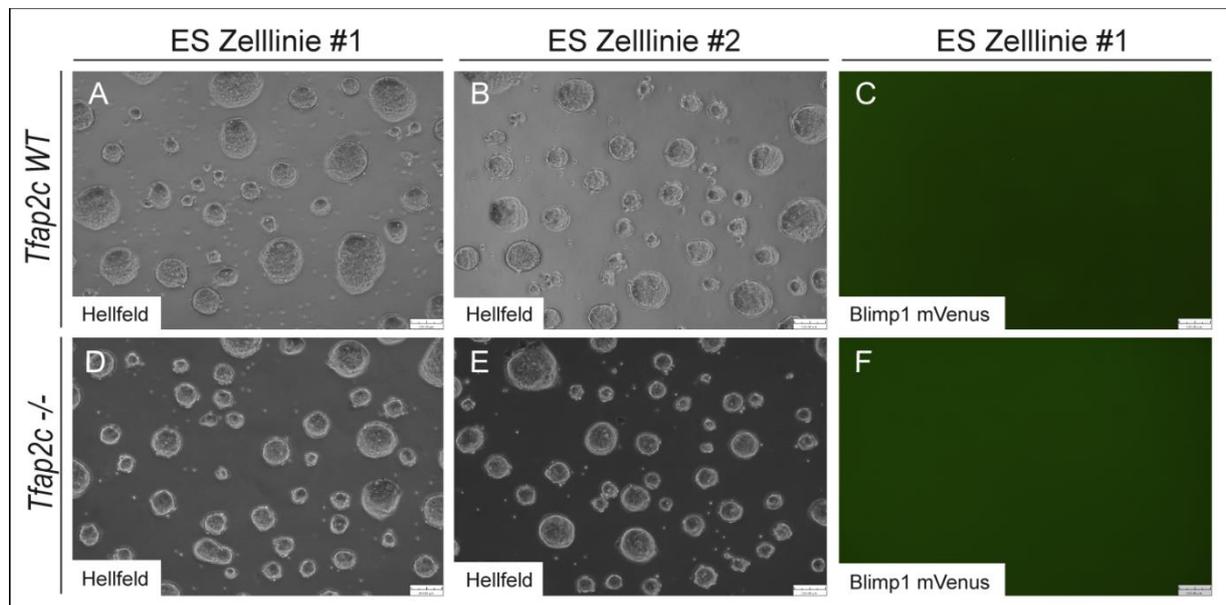


Abbildung 15: Kultivierung von *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT} ES-Zellen in 2i-Medium. [A, B] Phasenkontrastaufnahmen der *Tfap2c*^{WT} Zelllinien #1 und #2 [D, E] und der *Tfap2c*^{-/-} ES-Zelllinien #1 und #2. [C, F] Kontrolle der Blimp1mVenus Fluoreszenz in der Zelllinie #1. Größenbalken entsprechen 100 µm.

Dazu wurden die ES-Zellen in 2i-Medium kultiviert, welches sich aus DMEM/F12 und Neurobasal Medium im Verhältnis 1:1 zusammensetzt und mit MAPK/ERK Kinase-Inhibitor (PD0325901), GSK3-Inhibitor (CHIR99021) und LIF supplementiert wird. Zwischen den *Tfap2c*^{-/-} und den *Tfap2c*^{WT} ES-Zellen zeigten sich bei Kultivierung in diesem 2i-Medium keine morphologischen Unterschiede, wie zuvor unter Kulturbedingungen mit EF-Zellen und in Medium supplementiert mit Serum (Abbildung 15 A, B, D, E). Eine Blimp1mVenus Fluoreszenz konnte in den ES-Zellen nicht detektiert werden, was daraufhin deutet, dass in ES-Zellen kein Blimp1 exprimiert wird (Abbildung 15 C, F).

3.6 Etablierung einer *in vitro* Differenzierung in PGCLCs

Aufgrund der beschriebenen Problematik, dass die Ausbeute von Keimzell-ähnlichen Zellen durch Differenzierung in hängenden Tropfen nur bei 2-3% liegt (Abbildung 10 G) und diese Zellzahl für weitere Analysen nicht ausreichend ist, wurde ein zu diesem Zeitpunkt publiziertes Protokoll zur *in vitro* Differenzierung mit den in dieser Arbeit erstellten ES-Zelllinien angewandt. Das Protokoll wurde 2011 von Hayashi et al. publiziert und basiert auf der Idee, dass *in vivo* die Keimzellen aus Zellen des Epiblasten an Tag E6.25 hervorgehen. Dieses Prinzip wurde von Hayashi und seiner Gruppe adaptiert, indem sie ES-Zellen für zwei Tage in Epiblast-ähnliche Zellen, sogenannte „Epiblast-like cells“ (EpiLCs) differenzierten und diese dann für weitere zwei bis sechs Tage in „Primordial Germ Cell-like Cells“ (PGCLCs) differenzieren ließen. Mittels dieser Methode konnten sie nach viertägiger Differenzierung 38,7% Blimp1-mVenus positive Zellen und 13,5% Stella-ECFP positive Zellen detektieren, die sie als PGCLCs identifizieren konnten (Hayashi et al., 2011). Die Grafik in Abbildung 16 zeigt schematisch die Differenzierung der ES-Zellen über die EpiLCs Zwischenstufe in PGCLCs.

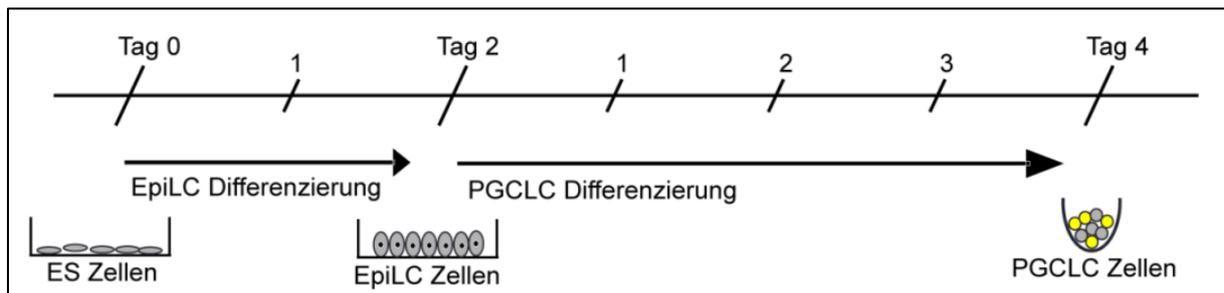


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Differenzierung von PGCLCs über eine Epiblast-ähnliche Zwischenstufe (EpiLCs) (Hayashi et al. 2011). Die Induktion der EpiLCs erfolgt über zwei Tage. Für weitere vier Tage wurden dann die EpiLCs in PGCLCs differenziert.

3.7 Die Induktion von Epiblast-ähnlichen Zellen ist in *Tfap2c*^{-/-}-Zellen nicht beeinflusst

Die Differenzierung der Epiblast-ähnlichen Zellen (EpiLCs) erfolgte für zwei Tage durch die Zugabe von Activin A, dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor bFGF und 1% Knockout Serum Replacement (KSR) (Abbildung 17 A - H). Im Verlauf der EpiLC Differenzierung zeigen sich morphologische Unterschiede zu den ES-Zellen. Die EpiLCs weisen nach einem Tag (Tag 1) eine spindelförmige Morphologie auf, welche zu einem flachen, dicht bewachsenen Monolayer mit epithel-ähnlichen Zellen auswächst (Abbildung 17 C, G). Eine Fluoreszenz des Blimp1mVenus Reporters

Ergebnisse

konnte zu diesem Zeitpunkt der Differenzierung nicht detektiert werden, da Epiblast-Zellen kein *Blimp1* exprimieren (Abbildung 17 D, H).

Semiquantitative RT-PCR-Analysen zeigten, dass sowohl in den *Tfap2c*^{WT}-EpiLCs, als auch in den *Tfap2c*^{-/-}-EpiLCs nach zweitägiger Differenzierung die Epiblast-Marker *Fgf5* und *Dnmt3b* exprimiert werden (Abbildung 17 I). Eine Expressionsreduktion von *Prdm14* und *Klf4* zeigte sich in den EpiLCs sowohl in den *Tfap2c*^{WT} als auch in den *Tfap2c*^{-/-}-Zellen. *Prdm14* und *Klf4* sind in der Inneren Zellmasse exprimiert und im Verlauf der Embryonalentwicklung nimmt die Expression im Epiblasten ab (Hayashi et al., 2011). Der Pluripotenz-Marker *Oct3/4* wurde durchgehend in den ES-Zellen und den EpiLCs exprimiert (Abbildung 17 I).

Diese Experimente zeigen, dass die *in vitro* Differenzierung von EpiLCs unabhängig von *Tfap2c* stattfindet, da EpiLCs generiert werden können und keine morphologischen Unterschiede zwischen den *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT} EpiLCs zu finden sind. Zudem konnten keine Unterschiede bei der Expression Epiblast-spezifischer Gene festgestellt werden.

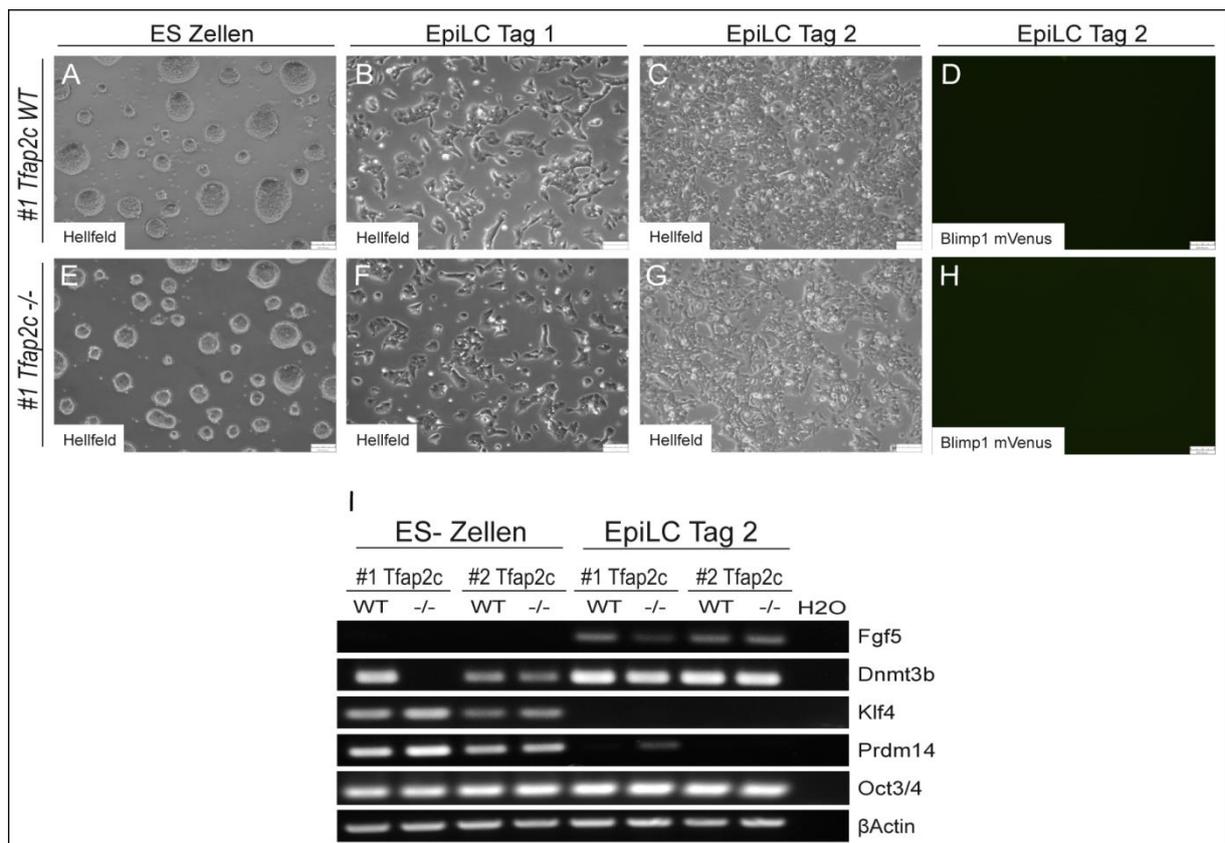


Abbildung 17: Differenzierung von ES-Zellen in Epiblast-ähnliche Zellen. [A - C] Phasenkontrastaufnahmen der *Tfap2c*^{WT} Zelllinie #1 und [E - G] der *Tfap2c*^{-/-} ES-Zelllinie #1 über den Zeitraum der EpiLC Differenzierung von zwei Tagen. [D, H] Kontrolle der *Blimp1*mVenus Fluoreszenz in den EpiLCs. Die Größenbalken entsprechen 100 µm. [I] RT-PCR-Analyse ausgewählter Marker zur Überprüfung der Differenzierung in EpiLCs im Vergleich zu ES-Zellen. (Teile der Abbildung sind in Schemmer et al. 2013 publiziert)

Ergebnisse

3.8 Weniger PGCLCs bei der Differenzierung von *Tfap2c*^{-/-}-Zellen

Als nächstes wurden die generierten EpiLCs für weitere vier Tage in primordiale Keimzell-ähnliche Zellen (PGCLCs) differenziert. Die PGCLC Differenzierung erfolgte durch Zugabe der Zytokine BMP4, BMP8b, SCF, EGF und LIF. Mit Hilfe des Keimzell-spezifischen Fluoreszenzreporters *Blimp1mVenus* konnte die Generierung von PGCLCs detektiert werden. Die Abbildung 18 zeigt die Differenzierung der *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT} EpiLCs der Zelllinie #1 über den Zeitraum von vier Tagen (Tag 1 bis Tag 4) und der Zelllinie #2 am letzten Tag der Differenzierung (Tag 4).

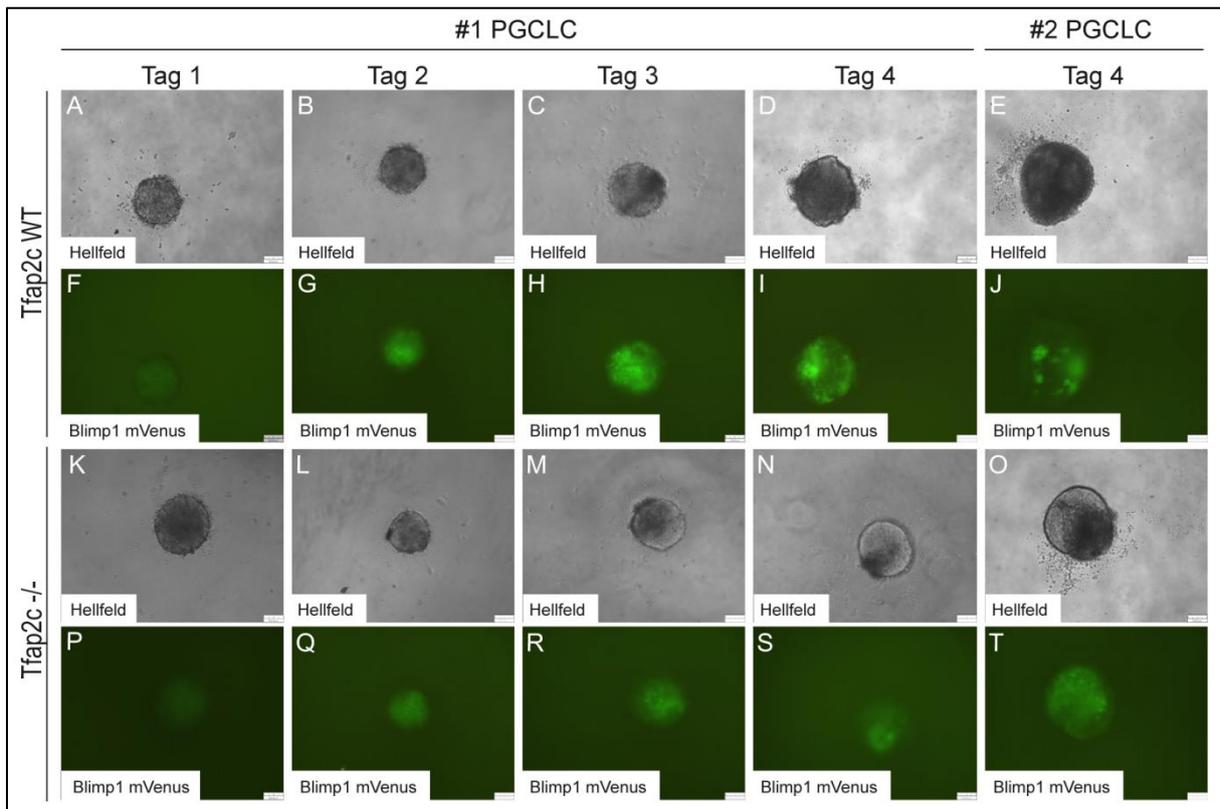


Abbildung 18: Differenzierung von EpiLCs in PGCLCs. [A - D] Phasenkontrastaufnahmen und der *Tfap2c*^{WT} Zelllinien #1 und [E] #2. [K - N] Phasenkontrastaufnahmen der *Tfap2c*^{-/-} ES-Zelllinie #1 und [O] #2. [F - J] Fluoreszenzaufnahmen zur Detektion der *Blimp1mVenus* Intensität in den *Tfap2c*^{WT} Zelllinien und [P - T] in den *Tfap2c*^{-/-} Zelllinien im Verlauf der Differenzierung. Die Größenbalken entsprechen 100 µm.

Nach 24 Stunden unter Differenzierungsbedingungen konnte in einzelnen Zellen eine *Blimp1mVenus* Fluoreszenz detektiert werden (Abbildung 18 F, P). Im Verlauf der viertägigen Differenzierung nahm die Anzahl an *Blimp1mVenus* positiven Zellen in den *Tfap2c*^{WT} und *Tfap2c*^{-/-}-Zellen zu, wobei an Tag 3 und Tag 4 die Zellzahl am höchsten war (Abbildung 18 H, I, R, S). Die PGCLC Differenzierung der Zellen der Linie #2 zeigten ähnliche Ergebnisse (Abbildung 18 E, J, O, T).

Ergebnisse

Die generierten PGCLCs wurden an Tag 4 gesammelt, enzymatisch vereinzelt und mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie quantifiziert. Bei den *Tfap2c*^{WT}-Zellen konnten durchschnittlich 14,2% (#1) und 14,9% (#2) Blimp1mVenus positive Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 19 A). Dagegen wurden bei den *Tfap2c*^{-/-}-Zellen signifikant weniger Blimp1mVenus positive Zellen detektiert (#1 = 5,2%; #2 = 8,0%) (Abbildung 19 A).

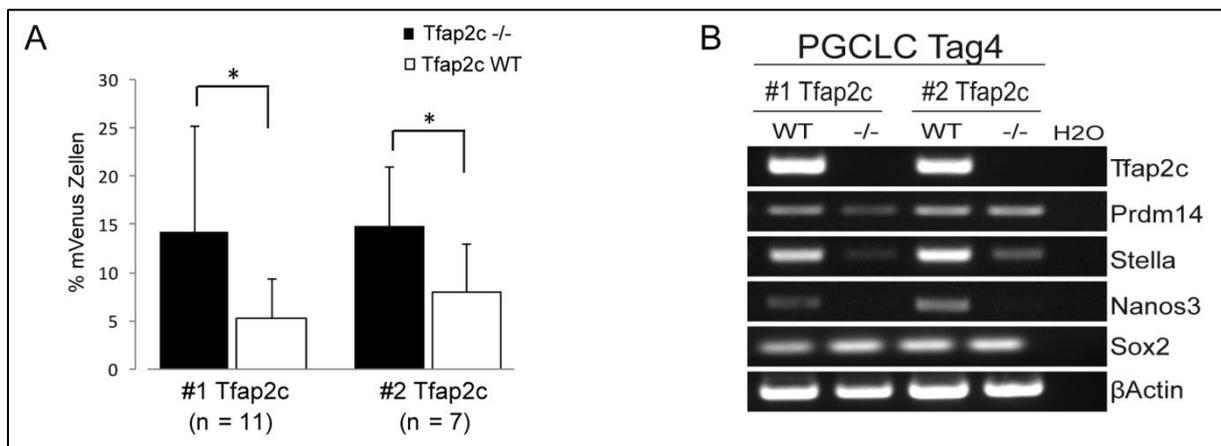


Abbildung 19: In vitro Differenzierung von *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT} PGCLCs. [A] Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil differenzierter PGCLCs ermittelt mit Hilfe von Fluoreszenz-Durchflusszytometrie. Die prozentuale mVenus Fluoreszenz ist bei *Tfap2c*^{WT} #1 14,2% und #2 14,9% (weiße Balken) und in den *Tfap2c*^{-/-} Zellen #1 5,2% und #2 8,0% (schwarze Balken). Als signifikant wurde ein p-Wert von ≤ 0.05 festgelegt (*). [B] RT-PCR-Analyse ausgewählter Marker zur Überprüfung der Differenzierung der PGCLCs. (Publiziert in Schemmer et al. 2013)

Es zeigten sich hohe Standardabweichungen bei allen Zelllinien. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass während des experimentellen Zeitraums unterschiedliche Chargen der Zytokine und Medien benutzt wurden, was die Differenzierung der PGCLCs unterschiedlich beeinflussen könnte.

Als nächstes erfolgte eine Validierung des Keimzell-ähnlichen Status der Blimp1mVenus positiven Zellen mittels semiquantitativer RT-PCR-Analyse. Dazu wurde die Expression von Genen, die während der Keimzell-Spezifizierung und der Keimzell-Migration exprimiert werden, untersucht. Die RT-PCR-Analyse zeigte, dass die Expression des frühen Keimzell-Markers *Prdm14* und des Pluripotenz-Markers *Sox2* nach Verlust von *Tfap2c* detektiert werden können (Abbildung 19 B). Hingegen zeigte sich eine reduzierte Expression später Keimzellmarker (*Stella*, *Nanos3*) in *Tfap2c*^{-/-}-Zellen.

Durch die Expression der frühen Keimzell-Marker *Blimp1*, was durch den Reporter mVenus ermittelt werden konnte, und *Prdm14* zeigt sich, dass eine *in vitro* Differenzierung von PGCLCs aus *Tfap2c* defizienten ES-Zellen erfolgt. Allerdings

zeigt sich bei *Tfap2c* Verlust nach viertägiger *in vitro* Differenzierung eine Reduktion der PGCLCs im Vergleich zu den *Tfap2c*^{WT}-Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Tfap2c* keine essenzielle Rolle bei der Spezifizierung der PGCLCs spielt, dafür aber für die Aufrechterhaltung des Keimzell-Schicksals wichtig ist. Das Genexpressionsprofil der PGCLCs deutet außerdem darauf hin, dass die generierten PGCLCs migratorischen PGCs *in vivo* entsprechen, da für die Migration spezifische Marker wie *Nanos3* exprimiert werden.

3.9 Untersuchung des globalen Expressionsmusters von *Tfap2c*^{-/-} ES-Zellen und *in vitro* differenzierten PGCLCs

Aufgrund der Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR-Analyse der PGCLCs (Abbildung 19 B), dass nach *Tfap2c* Verlust Keimzell-spezifische Gene eine Expressionsreduktion aufweisen, stellte sich nun die Frage, inwieweit *Tfap2c* an dem globalen transkriptionellen Netzwerk während der Keimzell-Entwicklung beteiligt ist. Um einen Einblick über die Veränderungen des globalen Expressionsmusters zu bekommen, wurde ein cDNS-Microarray mit ES-Zellen und PGCLCs durchgeführt. Bei dieser Methode ist es möglich, die Expression einer großen Anzahl Gene nur mit kleinen Mengen RNS zu untersuchen. Hierzu wurden jeweils 100 ng RNS der vier ES-Zelllinien (#1 *Tfap2c*^{WT}; #1 *Tfap2c*^{-/-} und #2 *Tfap2c*^{WT}; #2 *Tfap2c*^{-/-}) isoliert und für den cDNS-Microarray benutzt. Zudem wurden von jeder Zelllinie (#1 *Tfap2c*^{WT}; #1 *Tfap2c*^{-/-} und #2 *Tfap2c*^{WT}; #2 *Tfap2c*^{-/-}) die *in vitro* etablierten PGCLCs zweier Differenzierungen gesammelt und ebenfalls die RNS isoliert.

Mit Hilfe bioinformatischer Auswertung konnten die Expressionslevel von 39.000 Transkripten (GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array) untersucht werden. Durch hierarchische Clusteranalyse und der Hauptkomponentenanalyse (Principle component analysis = PCA) ist es möglich, die Microarray-Daten Gruppen zuzuordnen, den sogenannten Hauptkomponenten. Hierdurch entsteht ein vereinfachter Datensatz, bei dem sich ähnliche Proben annähern (clustern) und eine Hauptkomponente bilden. Das hierarchische Clustering ergab, dass die ES-Zelllinien (#1 und #2; rote Balken) und die PGCLCs (#1 und #2; *Tfap2c*^{WT} = blaue Balken; *Tfap2c*^{-/-} = grüne Balken) jeweils ein Cluster bilden. Je weiter die untersuchten Proben voneinander entfernt liegen (durch Balken gekennzeichnet), desto größer ist der Unterschied in der Genexpression (Abbildung 20 A).

Ergebnisse

Bei der Hauptkomponentenanalyse erfasst die erste Hauptkomponente (x-Achse), 47% der Genexpressionsvariabilität und zeigt den Unterschied zwischen den ES-Zellen (negative Koordinate) und PGCLCs (positive Koordinate) (Abbildung 20 B).

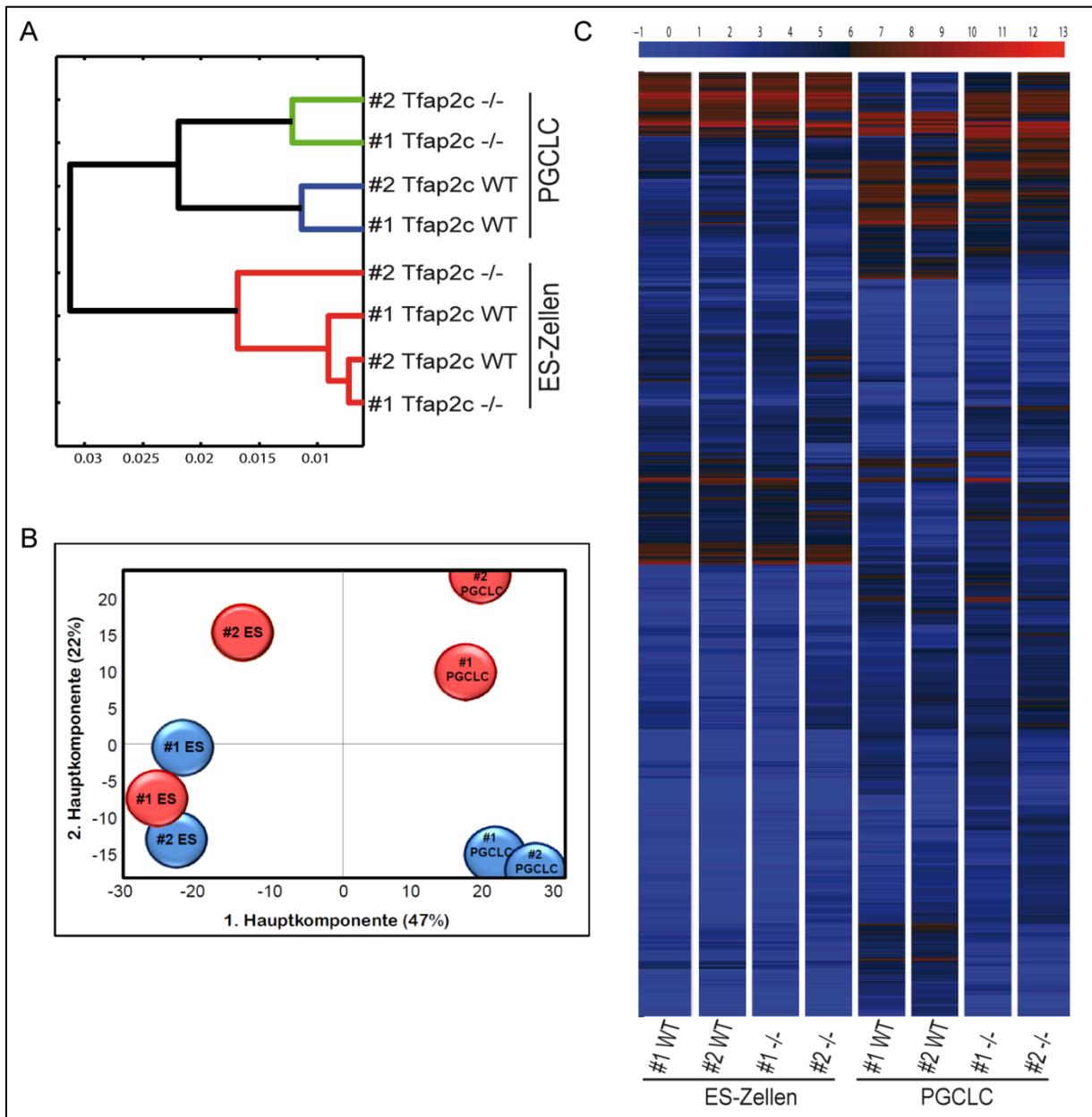


Abbildung 20: Analyse der globalen Genexpression in ES-Zellen und PGCLCs. Die Affymetrix cDNS Microarray Analyse wurde mit RNS von #1 *Tfap2c*^{WT}; #1 *Tfap2c*^{-/-} und #2 *Tfap2c*^{WT}; #2 *Tfap2c*^{-/-} ES-Zellen und PGCLCs durchgeführt. [A] Hierarchisches Clustering. Die roten Balken clustern die ES-Zellen, die grünen *Tfap2c*^{-/-} PGCLCs und blaue Balken *Tfap2c*^{WT} PGCLCs. Je weiter der Abstand zwischen den Proben ist, desto größer ist der Unterschied in der Genexpression. [B] Die Hauptkomponentenanalyse zeigt, dass die 1. Hauptkomponente 47% der Genexpressionsvariabilität erfasst und die 2. 22%. Die *Tfap2c*^{WT} Zellen sind in Blau dargestellt und die *Tfap2c*^{-/-} in Rot. [C] Die Heat Map präsentiert die ermittelten Genexpressionsveränderungen. Die Farbskala gibt die Genexpression in Log₂ an. Rote und blaue Balken zeigen höhere oder niedrigere relative Expression an. (Teile der Abbildung sind in Schemmer et al. 2013 publiziert).

Die zweite Hauptkomponente (y-Achse) erfasst 22% und separiert die #1 / #2 *Tfap2c*^{WT} (blau markiert) und #1 *Tfap2c*^{-/-}-ES-Zellen (rot markiert), sowie die

Ergebnisse

Tfap2c^{WT}-PGCLCs (blau markiert) (negative Koordinate) von den *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs und #2 *Tfap2c*^{-/-}-ES-Zellen (rot markiert) (positive Koordinate). Diese Ergebnisse zeigen, dass die *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs clustern und sich deutlich von den *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs abgrenzen (Abbildung 20 A, B).

Die geringen Genexpressionsvariabilitäten zwischen den *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT} ES-Zellen weisen darauf hin, dass *Tfap2c* in den ES-Zellen keine essenzielle Rolle spielt. Dagegen weisen die Genexpressionsvariabilitäten zwischen den *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs große Varianzen auf und dies spricht für eine essenzielle Funktion von *Tfap2c* in den PGCLCs.

Um ein genaueres Bild über die globale Expression in den verschiedenen Zellen zu erlangen, wurde eine weitere hierarchische Clusteranalyse, die sogenannte „Heat-Map“ Analyse durchgeführt, bei der die Gene entsprechend ihres Expressionslevels farblich dargestellt werden. Nach *Tfap2c* Verlust zeigt sich sowohl eine Reduktion (hellblaue Balken) der relativen Genexpression als auch eine Induktion (rote Balken) (Abbildung 20 C). Die „Heat-Map“ Analyse zeigt deutlich, dass einige Gene in den *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs im Vergleich zu den *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs differenziell exprimiert sind. Hingegen weisen die vier ES-Zelllinien ein ähnliches Genexpressionsprofil auf (Abbildung 20 C). Dies bekräftigt die bisherigen Ergebnisse, dass *Tfap2c* in den ES-Zellen keine essenzielle Rolle zu haben scheint.

Eine weitere bioinformatische Methode ist die Streudiagramm-Analyse. Hierbei werden jeweils zwei statische Merkmale zweier Proben gegeneinander in ein Koordinatensystem aufgetragen, in diesem Fall von *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT}-ES-Zellen (Abbildung 21 A). Jeder Punkt zeigt hierbei das Expressionslevel eines Gens in den untersuchten Proben. Je mehr die Genexpression der beiden Proben übereinstimmt, desto näher befinden sich die Punkte an der Diagonalen (Abbildung 21 A). Das Streudiagramm der Microarray Ergebnisse der ES-Zellen zeigt, dass nur sehr geringe Expressionsunterschiede zwischen den ES-Zelllinien bestehen. Bei der weiteren Auswertung wurden alle Gene mit einer ca. 3-fachen Expressionsänderung berücksichtigt. Dies entspricht bei einem Logarithmus zur Basis 2 (Log2) einer 1,5-fachen Expressionsänderung (FC <1,5 in Log2). Zudem wurden nur Expressionsänderungen mit einer Signifikanz von p<0,05 betrachtet. Daraus resultierten 26 Gene, die in *Tfap2c* defizienten ES-Zellen herauf- bzw. herunterreguliert sind (Abbildung 21 B).

Ergebnisse

Zur Validierung der Microarray Daten und zum Nachweis, dass es sich nicht um einen zufälligen Effekt bei den Genexpressionsänderungen handelt, wurde nochmals RNS von allen ES-Zelllinien isoliert und anschließend qRT-PCR-Analysen durchgeführt (Abbildung 21 C).

Die zuvor ermittelten Veränderungen der Genexpression (Herunter- oder Heraufregulation) konnten mittels qRT-PCR bei allen ausgewählten Genen validiert werden. Allerdings zeigten sich bei 4 der 6 untersuchten Gene (*Rian*, *Meg3*, *Car8* und *Nxf3*) weniger starke Expressionsunterschiede bei der qRT-PCR-Analyse im Vergleich zum Microarray (Abbildung 21 C).

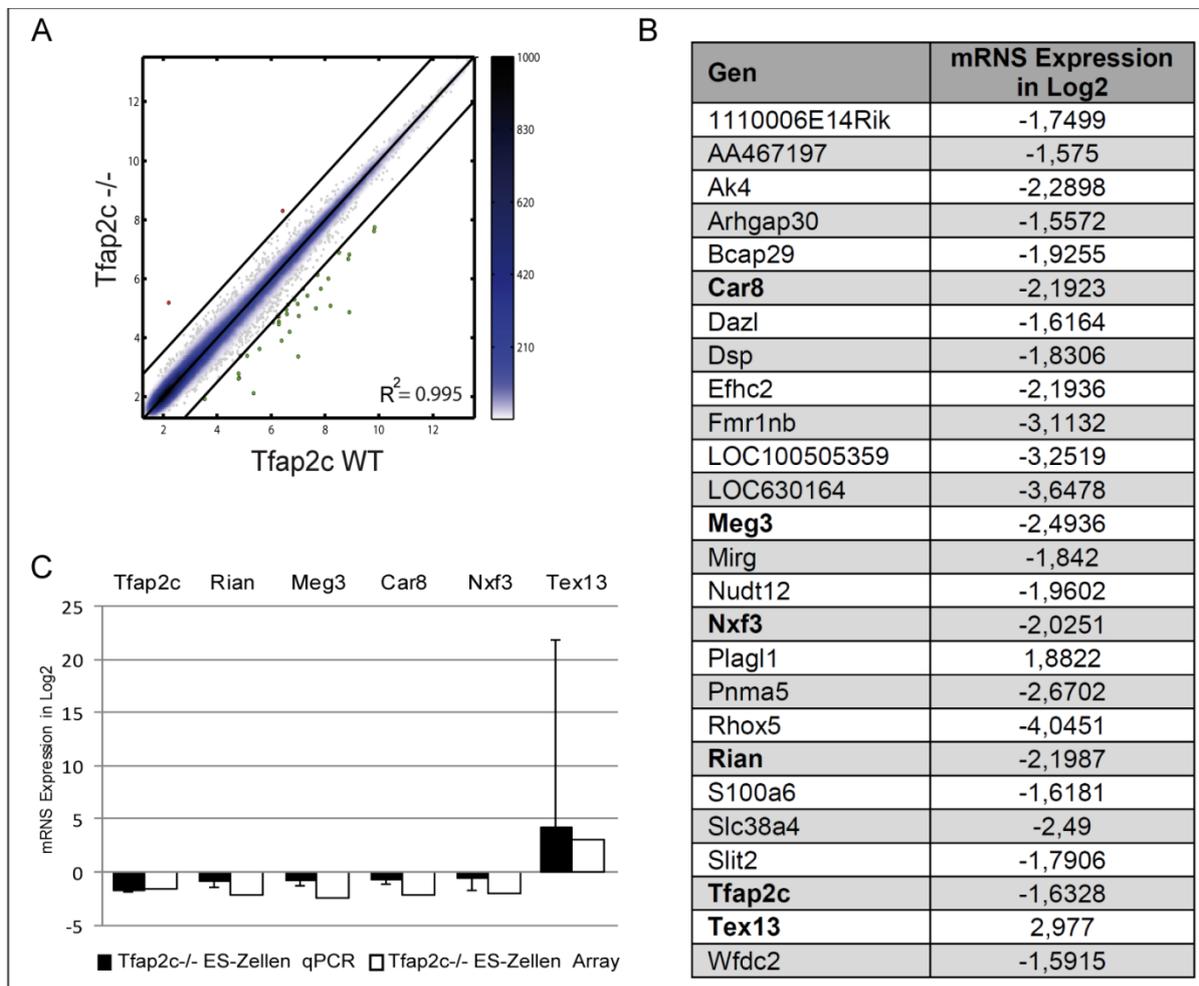


Abbildung 21: Globale Genexpressionsanalyse in ES-Zellen. [A] Streudiagramm der *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT} ES-Zellen. Die Farbskala zeigt die Intensität der Streuung; dabei zeigt hellblau eine leichte und dunkelblau eine höhere Streudichte an. R^2 = Fisher's Korrelationskoeffizient. [B] Auflistung der 26 deregulierten Gene mit mind. einer 1,5-fachen Expressionsänderung in Log2. [C] qRT-PCR-Analyse ausgewählter Gene zur Validierung der Microarray Daten. Die mRNS Expression wurde gegen *b-Actin* normiert, je Zelllinie biologische Duplikate durchgeführt und anschließend der Mittelwert berechnet. Schwarze Balken zeigen qRT-PCR Ergebnisse der *Tfap2c*^{-/-}-ES-Zellen und weiße Balken die Microarray Ergebnisse. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (Teile der Abbildung sind in Schemmer et al. 2013 publiziert).

Ergebnisse

Aufgrund der methodischen Unterschiede zwischen der qRT-PCR-Analyse und dem Microarray können derartige Schwankungen bei den Genexpressionslevel auftreten. Jedoch kann zusammenfassend festgehalten werden, dass durch die qRT-PCR-Analyse die Ergebnisse des Microarray bestätigt werden konnten.

Neben dem Expressionslevel in den ES-Zellen, wurde außerdem die globale Expression bei Verlust von *Tfap2c* in PGCLCs untersucht. Hierbei zeigte sich mit Hilfe der Streudiagramm-Analyse ein Expressionsunterschied bei 455 Genen. 247 dieser Gene zeigen eine Induktion der Genexpression (Abbildung 22 A; rote Punkte) nach Verlust von *Tfap2c* und 208 Gene eine reduzierte Genexpression (Abbildung 22 A; grüne Punkte).

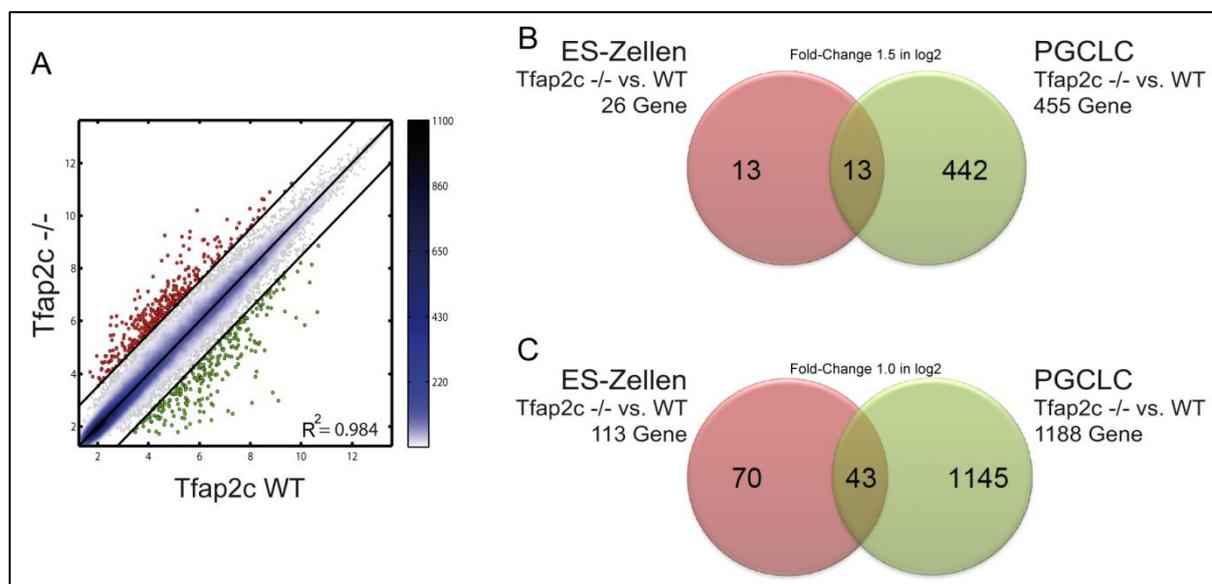


Abbildung 22: Differenziell exprimierte Gene in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs. [A] Streudiagramm der *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT} PGCLCs. Hochregulierte Gene sind in rot dargestellt und herabregulierte Gene in grün. Die Farbskala zeigt die Intensität der Streuung; Hellblau bedeutet eine leichte und dunkelblau eine höhere Streudichte. R^2 = Fisher's Korrelationskoeffizient. [B] Das Venn-Diagramm zeigt, dass bei einem Fold-Change von 1.5 in \log_2 455 Gene in PGCLCs dereguliert sind und in ES-Zellen 26 Gene. Gemeinsam sind 13 Gene dereguliert. [C] Das Venn-Diagramm zeigt die deregulierten Gene bei einem Fold-Change von 1.0 in \log_2 . 1188 sind in den PGCLCs und in den ES-Zellen 113 dereguliert. Gemeinsam sind 43 Gene dereguliert. (Teile der Abbildung sind in Schemmer et al. 2013 publiziert)

Bei einem Vergleich der Expressionsprofile von ES-Zellen und PGCLCs finden sich nur 13 gemeinsam deregulierte Gene (Tabelle 1) mit einer Expressionsänderung größer 1,5-fach (in \log_2) (Abbildung 22 B); hingegen können 43 gemeinsam deregulierte Gene bei einer 1-fachen (in \log_2) Expressionsänderung ermittelt werden (Abbildung 22 C).

Ergebnisse

Dieses Ergebnis zeigt, dass größtenteils unterschiedliche Gene von *Tfap2c* in den ES-Zellen und PGCLCs reguliert werden. Dabei werden in den PGCLCs etwa 17-mal mehr Gene von *Tfap2c* reguliert.

Tabelle 1: Gemeinsam deregulierte Gene in *Tfap2c*^{-/-} ES-Zellen und PGCLCs (bei einer 1,5-fachen (in Log2) Expressionsänderung)

Gen	FC in ES-Zellen	FC in PGCLCs
AA467197	-1,575	-3,2584
Ak4	-2,2898	-4,5507
Bcap29	-1,9255	-1,8901
Dsp	-1,8306	-1,5163
LOC100505359	-3,2519	-1,6254
Meg3	-2,4936	-1,7257
Plagl1	1,8822	2,5904
Rhox5	-4,0451	-4,2916
Rian	-2,1987	-1,5003
S100a6	-1,6181	-2,2477
Slc38a4	-2,49	-1,5213
Slit2	-1,7906	-2,3488
Tfap2c	-1,6328	-1,5977

Die durch den cDNS-Microarray ermittelten, differenziell exprimierten Gene, wurden durch eine Gen-Ontology-Analyse entsprechend ihrer biologischen Funktion gruppiert. Hierbei handelt sich um eine Methode zur Identifizierung von Gruppen deregulierter Gene, die eine ähnliche Funktion besitzen. Zu Beginn der Analyse werden Gene zu einer Oberkategorie zusammengefasst, die weiter in Subkategorien und noch einmal in Untergruppen unterteilt wird.

Die Abbildung 23 zeigt Untergruppen, welche sich aus differenziell exprimierten Genen zusammensetzen, die eine gemeinsame biologische Funktion besitzen. Die größte dieser Gruppen ist die der Regulation entwicklungsrelevanter Prozesse, zu der Gene wie die Homeobox-Proteine *Hhex* und *Hoxa5* (Abbildung 23 A) gehören. Weiter sind unter den Gruppen einige, die mit der somatischen Differenzierung assoziiert werden können wie z.B. die Gruppen: Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS), Neuralrohrentwicklung, Neuralrohrverschluss und Organentwicklung (Abbildung 23 A; rote Markierung). Die Gene welche diese Gruppen bilden, weisen bei *Tfap2c* Verlust eine Expressionsinduktion auf.

Ergebnisse

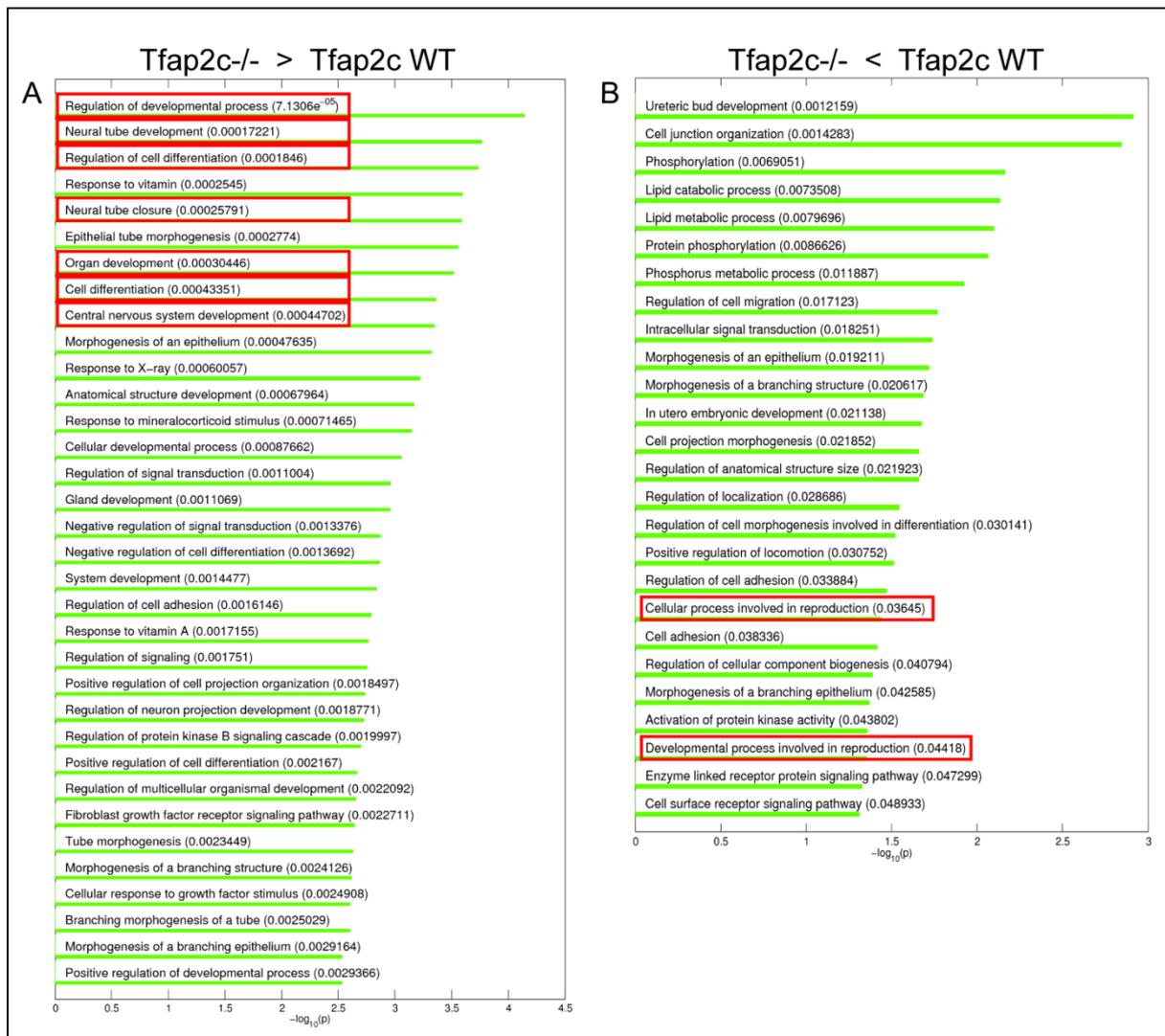


Abbildung 23: Gen-Ontology Analyse. Untergruppen, die entsprechend ihrer biologischen Funktion eingeteilt wurden. Die Untergruppen in [A] beinhalten Gene, die in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs hochreguliert sind und [B] beinhaltet Untergruppen mit herunterregulierten Genen.

Des Weiteren konnten funktionelle Untergruppen identifiziert werden, in denen sich Gene befinden, welche nach *Tfap2c* Verlust eine Expressionsreduktion aufweisen. Eine dieser Gruppen kann der biologischen Funktion der Reproduktion zugeordnet werden (Abbildung 23 B; rote Markierung). Zu dieser Gruppe zählen Gene, die für die Keimzell- und Gametenentwicklung essenziell sind (Abbildung 23 B).

Ergebnisse

Tabelle 2: Deregierte Gene in *Tfap2c*^{-/-}PGCLCs unterteilt in fünf Kategorien entsprechend ihrer Funktion

Kategorie	Gen	FC	Funktion	Gen	FC	Funktion
I: Somatische Differenzierung	Bcl11a	1.93	Hämatopoese	Cldn5	-2.13	ZNS Entwicklung
	Cited2	1.87	ZNS Entwicklung	Dner	-3.44	ZNS Entwicklung
	Chd7	1.67	ZNS Entwicklung	ErbB3	-2.33	ZNS Entwicklung
	Cobl	2.43	Neuralrohrverschluss	Gata2	-1.87	ZNS Entwicklung; Hämatopoese
	Enah	2.01	Neuralrohrentwicklung	Kctd15	-3.20	Neurogenese
	Gbx2	2.36	Neurogenese	Lhx1	-1.59	Mesodem Formation
	Gli2	3.48	Neuralrohrentwicklung	Slit2	-2.34	Neurogenese
	Hck	2.83	Hämatopoese	Tgif2	-1.64	ZNS Entwicklung
	Hhex	1.52	Hämatopoese			
	Hoxa5	1.97	Brustdrüsen-; Lungenentwicklung			
	Hoxa1	1.13	ZNS & Mesoderm Entwicklung			
	Hoxa3	1.13	Knorpelgewebe; Thymusentwicklung			
	Hoxb1	1.03	ZNS & Mesoderm Entwicklung			
	Lrp2	2.79	Vorderhirnentwicklung			
	Mcf2	1.87	ZNS Entwicklung			
	Mtap1b	1.70	ZNS Entwicklung			
	Ncam1	2.42	Neuronen Adhäsion			
	NdrG2	1.58	ZNS Entwicklung			
	Nefl	3.56	Neurogenese			
	Neurod1	1.57	Neurogenese			
	Pten	1.63	ZNS Entwicklung			
	Robo1	1.79	Neurogenese			
	Sema4a	1.88	Neurogenese; Angiogenese			
	Serpine2	1.60	Neurogenese			
	Sfrp1	3.12	Neuralrohrverschluss; -entwicklung			
	Sfrp2	1.66	Neuralrohrentwicklung			
	Smarca1	2.06	Gehirnentwicklung			
	Tcf7l2	2.56	Neuralrohrentwicklung			
	Tubb2b	1.79	ZNS Entwicklung			
	Zic2	3.71	ZNS Entwicklung; Neuralrohrverschluss			
Zic5	3.14	Neuralrohrverschluss				
Zfp423	2.13	ZNS Entwicklung				
II: Keimzell-Entwicklung	Sprink3	2.54	Inhibiert die Calcium Aufnahme in Spermatozoa	Aurkc	-2.06	Regulator von Mitose, Meiose
				Bik	-2.20	Spermatogenese, Apoptose
				Ceacam10	-2.98	Spermienoberflächen Protein
				Chdh	-4.80	Spermienfertilität
				Cxcr4	-1.94	Keimzellmigration
				Cxcr7	-1.28	Keimzellmigration
				Dazl	-1.40	Keimzell-Entwicklung
				Dmrt1	-2.68	Gametogenese
				Hk1	-3.04	Meiose in Keimzellen
				Immp2l	-1.57	Spermatogenese
				c-Kit	-1.91	Keimzellmigration
				Phf13/Spoc1	-1.85	Spermatogenese
				Rhox5	-4.29	Spermatogenese
				Rhox4a	-2.70	Keimzell-Entwicklung
				Rhox6	-6.11	Keimzellschicksal Determinierung
				Rhox9/Psx2	-5.59	Oogenese
				Sept4	-1.63	Spermien-Kapazitation
				Slco4c1	-2.32	Spermien Reifung
				Spa17	-2.30	Spermienoberflächen Protein
				Stella/Dppa3	-4.27	PGC spezifisches Gen
			Tes	-2.04	Exprimiert in Spermatischen	
III: Zellzyklus	Ccnd1	2.33	interagiert mit Cdk4/Cdk6	Gadd45b	-1.12	G2/M-Arrest
	Cdk6	1.50	G1/S Phase	Rgcc	-3.22	G2/M-Arrest
	Cdk7	1.17	aktiviert Cdk1/Ccnb1			
	p21	1.02	Inhibierung der G1/S und G2 Transition			
	Fez1	1.79	aktiviert Cdk1/Ccnb1			
	Id1	1.58	Zellzyklus			
	Id2	1.29	Zellzyklus			
	Id4	1.28	Zellzyklus			
Plk2	1.68	G1/S Phase				
IV: Pluripotenz	Eras	3.52	Aufrechterhaltung der Pluripotenz			
	Fgf4	2.94	Zellproliferation und Differenzierung			
	FoxD3	1.03	Oct3/4 Zielgen			
	Gbx2	2.36	Zelldifferenzierung und Pluripotenz			
	Jam2	2.47	Oct3/4 Zielgen			
	Klf4	2.22	Aufrechterhaltung der Pluripotenz			
	Msi2	2.31	Aufrechterhaltung der Pluripotenz			
	Nr0b1	1.62	Aufrechterhaltung der Pluripotenz			
Tdgf1	1.36	Oct3/4 Zielgen				
V: Epigenetik	Dnmt3b	1.34	de novo DNS Methylierung	Pcgf5	-2.40	Histonmodifikation
	Dnmt3l	3.21	interagiert mit Dnmt3a/b	Phf19	-2.17	Histonmodifikation
	JmjdC	1.46	Histonmodifikation			
	Kdm6b	1.11	Histonmodifikation			
	Mbd2	1.54	DNS Methylierung			
	Tet2	1.27	Konversion von 5mC zu 5hmC			
Uhrf1	1.45	DNS Methylierung				

Ergebnisse

Entsprechend der Gen-Ontology-Analyse und aufgrund von Literaturrecherche wurden ausgewählte deregulierte Gene den folgenden fünf Kategorien zugeordnet: I. „Somatische Differenzierung“, II. „Keimzell-Entwicklung“, III. „Zellzyklus“, IV. „Pluripotenz“ und V. „Epigenetik“ (Tabelle 2; publiziert in Schemmer et al. 2013). Die Kategorie I „Somatische Differenzierung“ umfasst Gene, die eine Rolle bei der Differenzierung von somatischen Zellen spielen, welche zum großenteil nach *Tfap2c* Verlust in PGCLCs hochreguliert sind (Tabelle 2). Die Kategorie II „Keimzell-Entwicklung“ beinhaltet Gene, die essenziell für die Keimzell- und Gametenentwicklung sind, wie z.B. *Bik*, *c-Kit*, *Dazl*, *Dmrt1*, *Phf13*, *Rhox5/6/9* und *Stella*. Hier zeigt sich nach *Tfap2c* Verlust in PGCLCs eine Herunterregulation der meisten Keimzell-relevanten Gene (Tabelle 2).

In der Kategorie III „Zellzyklus“ sind Gene zusammengefasst, die eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielen zusammengefasst und die IV Kategorie „Pluripotenz“ umfasst Pluripotenz-assoziierte Gene wie z.B. *Eras*, *Fgf4*, *Klf4* oder *Nr0b1*. In der letzten Kategorie V „Epigenetik“ finden sich *Dnmt3b*, *Dnmt3l*, *Uhrf1* und *Tet2* die an der DNS-Methylierung beteiligt sind (Tabelle 2). Die Gene dieser drei Gruppen (III – V) sind in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs zum größten Teil heraufreguliert.

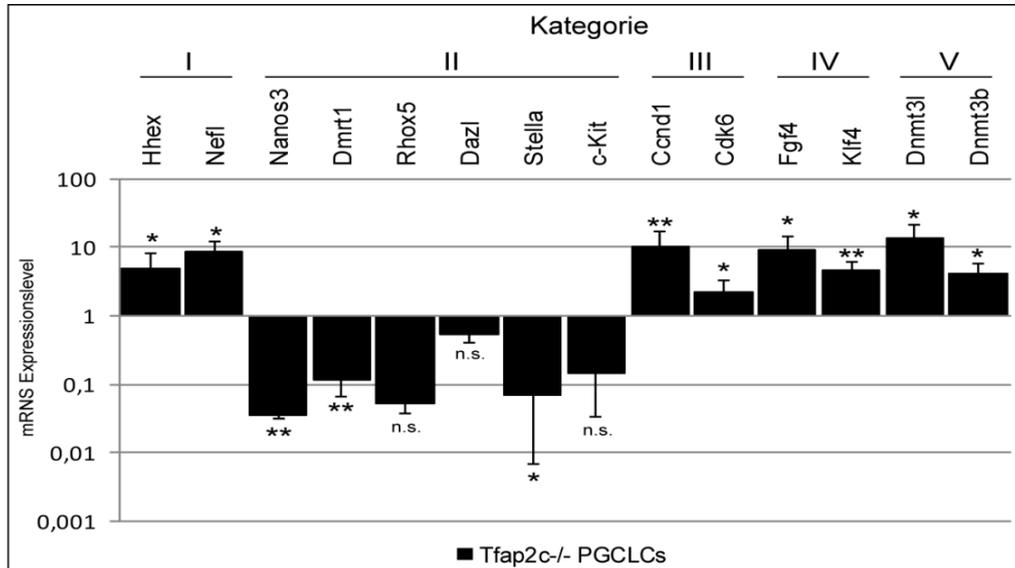


Abbildung 24: Validierung der cDNS-Microarray Daten mittels qRT-PCR-Analyse. mRNA Expressionslevel ausgewählter Marker aller fünf Kategorien. Die Expressionslevel wurden gegen β -Actin normiert, die Expression der *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs gleich 1 gesetzt und die Ergebnisse im Log zur Basis 10 dargestellt. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung und p-Werte von <0.05 (*) und <0.005 (**) wurden als signifikant betrachtet. (Teile der Abbildung sind in Schemmer et al. 2013 publiziert)

Zur Überprüfung der deregulierten Gene in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs erfolgte eine qRT-PCR-Analyse. Dazu wurde RNS aus PGCLCs der Zelllinien #1 und #2 isoliert, jeweils

Ergebnisse

100 ng der RNS in cDNS umgeschrieben und anschließend qRT-PCR-Analysen mit ausgewählten Genen aller fünf Kategorien durchgeführt (Abbildung 24). Die Ergebnisse der qRT-PCR validieren die ermittelten Genexpressionsunterschiede im cDNS-Microarray. Der Marker *Hhex* ist im Microarray bei einem Log₂ 1,52-fach hochreguliert und *Nefl* 3,56-fach. Die qRT-PCR zeigt eine signifikante Expressionserhöhung von 2,30-fach in Log₂ für *Hhex* und 3,11-fach in Log₂ für *Nefl* (Abbildung 24). Die mRNA Expressioneslevel der Marker der Kategorie II zeigen in der qRT-PCR-Analyse die gleichen Genexpressionsunterschiede wie im Microarray. In diese Kategorie wurde auch *Nanos3* eingeordnet, da es sich hierbei ebenfalls um ein Keimzell-spezifisches Gen handelt. Mittels des cDNS-Microarrays konnte aber keine Aussage über die *Nanos3* Expression getroffen werden, da auf dem Microarray kein Oligonukleotid homolog zu *Nanos3* gebunden war. Die semiquantitative RT-PCR in Kapitel 3.8 konnte aber aufzeigen, dass bei *Tfap2c* Verlust die *Nanos3* Expression reduziert wird. Dies sollte mittels qRT-PCR bestätigt werden. Hierbei zeigte sich bei einem Log₂ eine signifikante 4,79-fache Expressionsreduktion von *Nanos3* in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs (Abbildung 24).

Die ermittelten Expressionslevel im Microarray von *Ccnd1* (3,37-fach in Log₂) und *Cdk6* (1,16-fach in Log₂), Gene der Kategorie II, zeigen ebenfalls eine signifikante Heraufregulation bei der qRT-PCR. Die Pluripotenz-assoziierten Marker *Fgf4* (3,21-fach bei Log₂) und *Klf4* (2,21-fach bei Log₂) und die *de-novo* Methylasen *Dnmt3b* (3,79-fach in Log₂) und *Dnmt3l* (2,08-fach in Log₂) zeigen ebenfalls die im cDNS-Microarray ermittelte Tendenz einer signifikanten Heraufregulation nach *Tfap2c* Verlust (Abbildung 24).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse des cDNS-Microarrays und der qRT-PCR-Analyse, dass es in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs zu einer Störung bei der Aufrechterhaltung des Keimzell-Schicksals kommt, da unter anderem Gene für die somatische Differenzierung induziert werden. *Tfap2c* scheint dabei eine essenzielle Rolle bei der Repression somatischer Gene insbesondere solcher Gene, die bei der Neurogenese eine Funktion besitzen, zu spielen. Weiter scheint der Verlust von *Tfap2c* in den PGCLCs zu einer veränderten Zellzyklus-Regulation und zur Aufrechterhaltung der Expression einiger Pluripotenz-assoziiierter Gene zu führen.

Ergebnisse

3.10 Analyse direkter Zielgene von Tfp2c in PGCLCs

Basierend auf den Ergebnissen des cDNS-Microarrays, wurde unter den differenziell deregulierten Genen solche gesucht, die direkt von Tfp2c gebunden werden. Dies erfolgte mit Hilfe von ChIP und anschließender qPCR-Analyse.

Mittels der rVISTA 2.0 Software (Loots und Ovcharenko, 2004) wurden deregulierte Gene aller fünf Kategorien ausgewählt und auf konservierte Tfp2c Bindestellen überprüft. Es konnten elf Gene mit konservierter Tfp2 oder Tfp2c Bindestelle in der Promotorregion identifiziert werden (Abbildung 25 A – K).

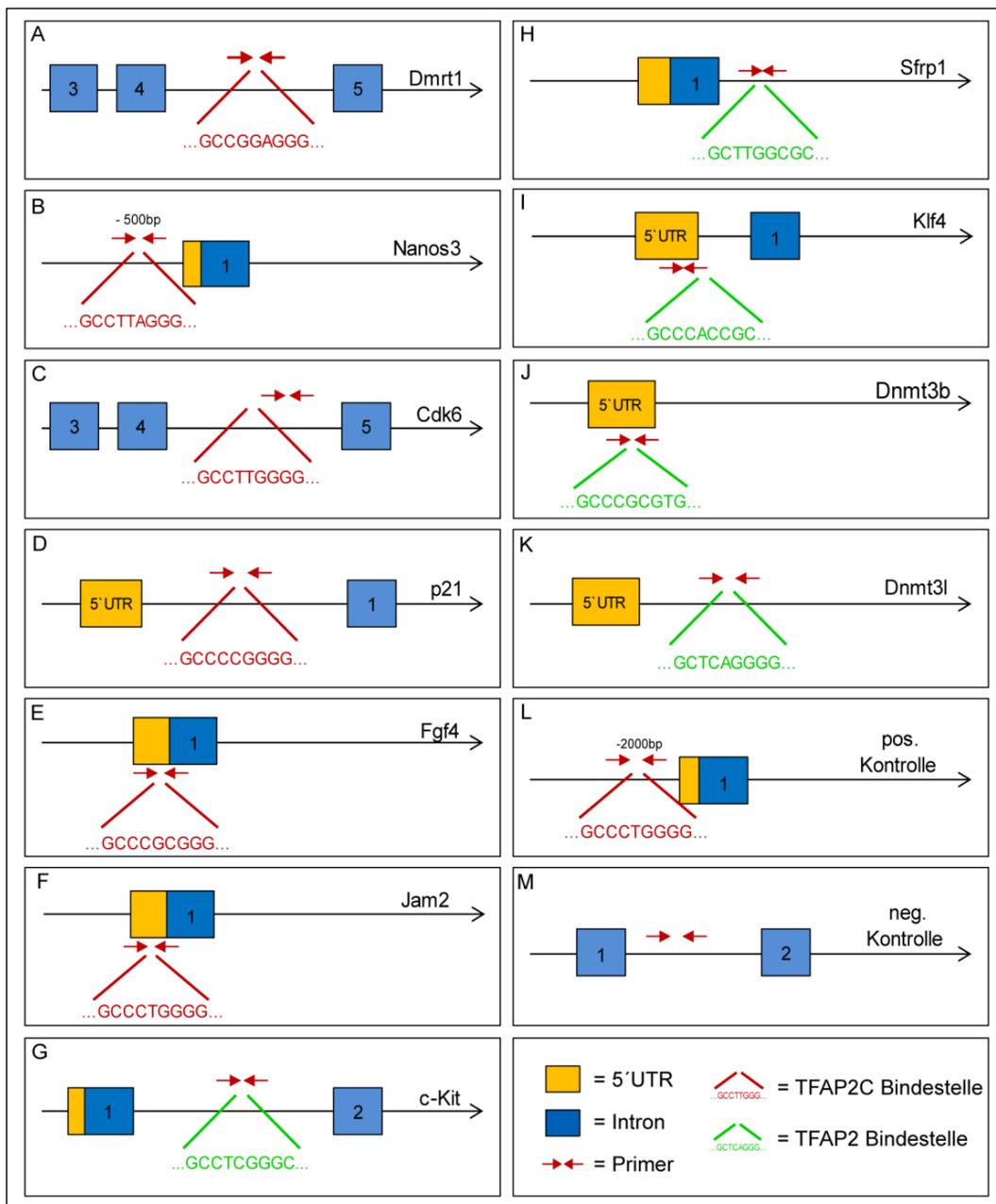


Abbildung 25: Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) zur Identifizierung von direkten Tfp2c Zielgenen in PGCLCs. [A - M] zeigen schematische Darstellungen von Tfp2c (rote Markierung) und Tfp2 (grüne Markierung) Bindestellen in den Promotorregionen ausgewählter Gene.

Ergebnisse

Bei den Genen *Dmrt1*, *Nanos3*, *Cdk6*, *p21*, *Fgf4* und *Jam2* konnte in den Promotorregionen die Tfp2c Bindesequenz 5'-GCCN₃GGG-3' identifiziert werden (Abbildung 25 A - F) und bei *c-Kit* die folgende Tfp2 Bindesequenz 5'-GCCN₃GGC-3' (Abbildung 25 G). Die Promotorregionen der Gene *Sfrp1*, *Klf4*, *Dnmt3b* und *Dnmt3l* hingegen weisen Tfp2 Konsensussequenzen auf, die von den in Mohibullah et al. beschriebenen Sequenzen, um jeweils eine Base abweichen (Abbildung 25 H - K). Für die ChIP-Analysen wurden jeweils 100.000 Blimp1mVenus/*Tfp2c*^{WT} PGCLCs und 100.000 StellaGFP Keimzell-ähnliche Zellen fixiert, lysiert und die DNS in 250 - 500 bp große Fragmente sonifiziert. Die anschließenden ChIP- und qPCR-Analysen erfolgten wie in Kapitel 3.3 beschrieben. Die Primer für die qPCR-Analysen wurden so erstellt, dass sie den Bereich um die oder in unmittelbarer Nähe zu der ermittelten Konsensussequenz amplifizieren (Abbildung 25; rote Pfeile).

Die qPCR Ergebnisse zeigten bei allen ausgewählten Genen eine Anreicherung der untersuchten Promotorregion durch den spezifischen Tfp2c Antikörper. Dies indiziert, dass diese Promotorbereiche von Tfp2c gebunden werden (Abbildung 26). Hierbei zeigten sich allerdings Unterschiede in der Intensität der relativen Bindung von Tfp2c an die Regionen. Bei den Genen *c-Kit* und *Nanos3* konnte eine hohe relative Bindung von Tfp2c nachgewiesen werden (Abbildung 26), wohingegen bei *Sfrp1* im Vergleich zur IgG Kontrolle nur eine geringe relative Bindung von Tfp2c an die untersuchte Promotorregion zeigte (Abbildung 26).

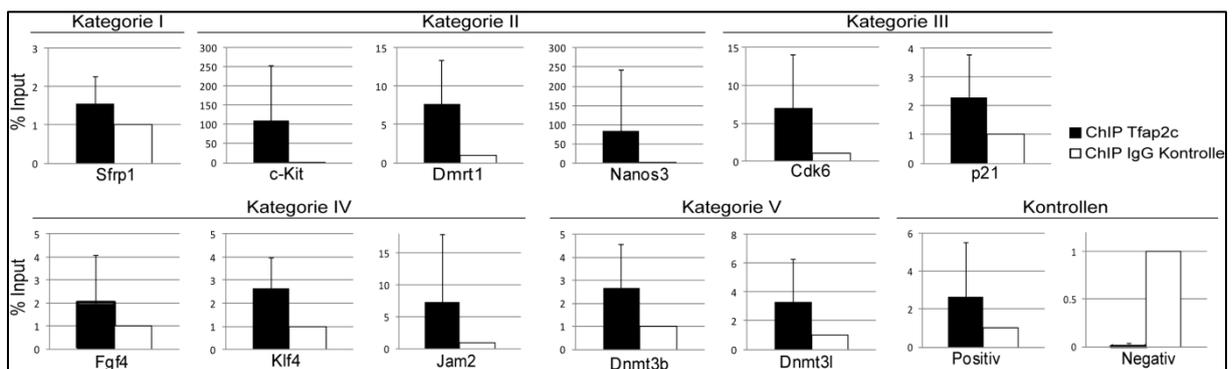


Abbildung 26: ChIP-qPCR-Analysen in PGCLCs. ChIP mit spezifischem Tfp2c-Antikörper (schwarze Balken) und zur Kontrolle einem IgG-Antikörper (weiße Balken). Die Ergebnisse der qPCR wurden auf den Input normiert und die IgG Kontrolle gleich 1% gesetzt. Die ChIP Analysen wurden je Zelllinie mit biologischen Duplikaten durchgeführt und anschließend die Ergebnisse zusammengefasst. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. (Teile der Abbildung sind in Schemmer et al. 2013 publiziert).

Des Weiteren wurden die generierten cDNS-Microarray Daten mit einer kürzlich erschienen Publikation verglichen. Magnúsdóttir et al. konnten 2013 nach *Tfp2c* Überexpression in der embryonalen Karzinomzelllinie P19 1393 Gene mittels ChIP-

Ergebnisse

Analyse und anschließender Sequenzierung identifizieren, welche direkt von Tfp2c gebunden werden. Bei einem Vergleich dieser direkten Zielgene von Tfp2c mit den 1186 im Microarray gefundenen differenziell exprimierten Genen (1186 Gene bei FC > 1.0 in Log2), finden sich 159 Gene, die sowohl direkt in P19 Zellen von Tfp2c gebunden werden als auch in *Tfp2c*^{-/-}-PGCLCs dereguliert sind (Abbildung 27).

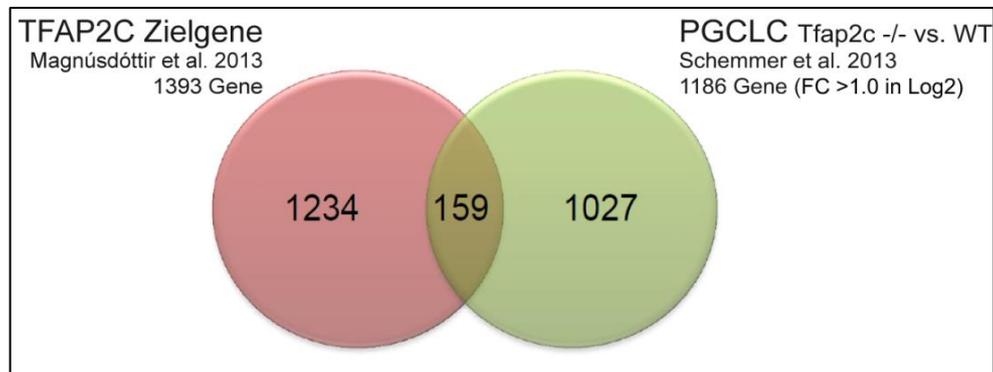


Abbildung 27: Venn-Diagramm zum Vergleich der Zielgene von Tfp2c in P19-Zellen und von deregulierten Genen in *Tfp2c*^{-/-}-PGCLCs. 1393 Tfp2c Zielgene wurden mittels CHIP-Seq in der P19 Zelllinie identifiziert (Magnúsdóttir et al., 2013) und mit den 1186 deregulierten Genen in *Tfp2c*^{-/-}-PGCLCs, die mittels cDNS-Microarray detektiert wurden, verglichen. Es zeigt sich eine Übereinstimmung von 159 Genen.

3.11 Die Expression Keimzell-spezifischer Gene ist in *Tfp2c*^{-/-} PGCLCs reduziert

Der cDNS-Microarray und die anschließende Gen-Ontology Analyse zeigten, dass Gene, die mit der Entwicklung von Keimzellen und der Gameten assoziiert werden können, in *Tfp2c*^{-/-}-PGCLCs herunterreguliert sind (Tabelle 2). Eine Publikation von Nakaki et al. 2013 beschreibt die *in vitro* Differenzierung zur Generierung von Keimzellen ebenfalls über einen EpiLCs Status, mit einer anschließenden Überexpression der Faktoren *Blimp1*, *Prdm14* und *Tfp2c* mittels piggyBac Transposon Vektoren. 24 Stunden nach der Überexpression wurden hier globale transkriptionelle Analysen durchgeführt.

Ein Vergleich mit den 75, von Nakaki et al. als sogenannte „Core-PGC“ bezeichneten Gene, ergab, dass 50 der 75 „Core-PGC“ Gene in *Tfp2c*^{-/-}-PGCLCs dereguliert sind (Abbildung 28 A). Von diesen 50 Genen zeigen 47 eine mindestens 1-fache (in Log2) Expressionsreduktion in *Tfp2c*^{-/-}-PGCLCs (Abbildung 28 B). Die Reproduktiven Homeobox Gene (*Rhox6* und *Rhox9*) zeigen im cDNS-Microarray die größten Expressionsänderungen in *Tfp2c*^{-/-}-PGCLCs. Die *Rhox6* Expression ist um das 6,11-fache in Log2 und die *Rhox9* Expression um das 5,59-fache in Log2 reduziert (Abbildung 28 B). Nur drei „Core-PGC“ Gene zeigen eine Induktion der Genexpression in den *Tfp2c*^{-/-}-PGCLCs. Hierzu zählen *Id4*, welches eine wichtige

Ergebnisse

Rolle bei der Zellzyklus-Kontrolle spielt (Yun et al., 2004), das Junctional Adhesion Molecule *Jam2* (Su et al., 2012) und *D330028D13Rik*, ein Gen der Fam221 Familie, dessen Funktion derzeit unbekannt ist.

Zusammenfassend zeigt der Vergleich mit der Studie von Nakaki et al., dass 50 der 75 als „Core-PGC“ bezeichneten Gene in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs dereguliert sind. Dies bestätigt ebenfalls, das *Tfap2c* eine essenzielle Rolle in der Aufrechterhaltung des Keimzell-Status besitzt.

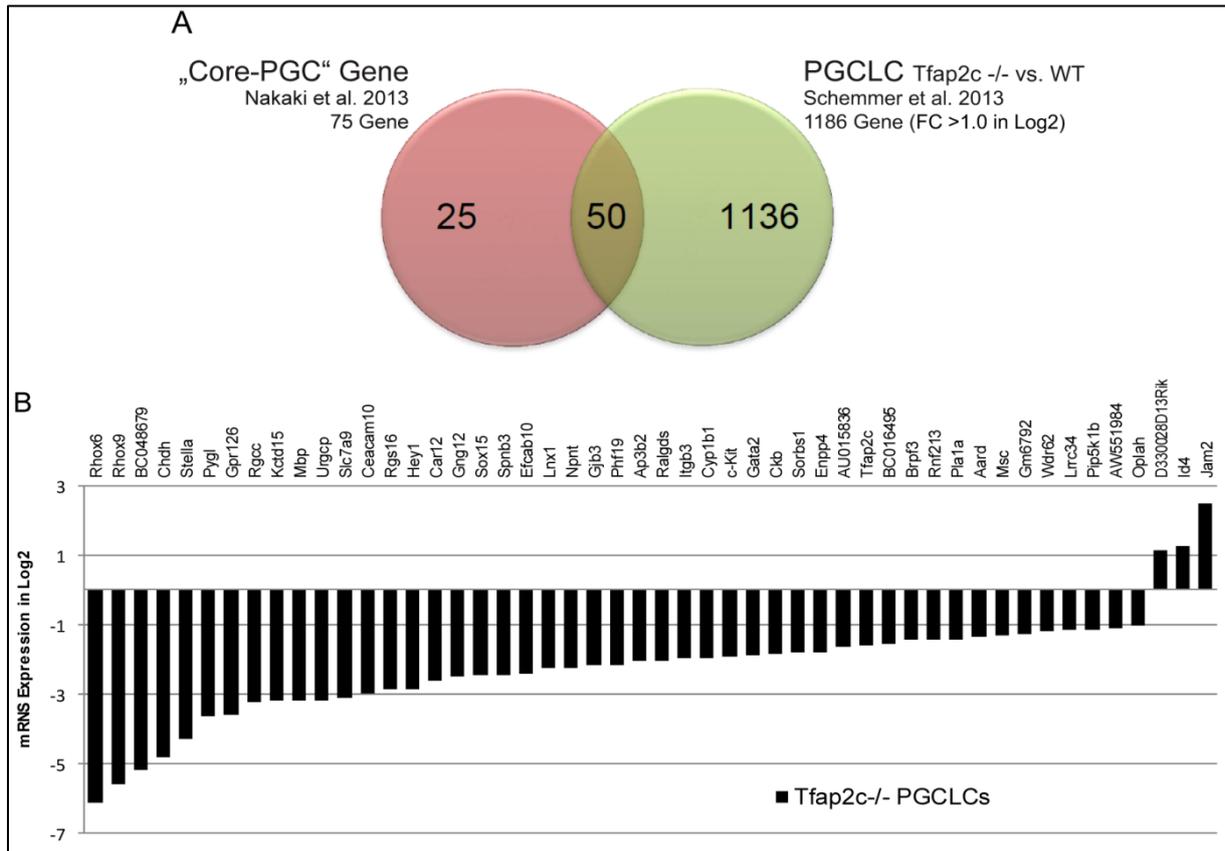


Abbildung 28: Vergleichende Analyse der „Core-PGC“ Gene (Nakaki et al., 2013) und deregulierter Gene in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs. [A] Ein Vergleich der 75 „Core-PGC“ Gene zu den 1186 deregulierten Genen in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs, zeigt eine Übereinstimmung von 50 Genen. [B] mRNA Expression in Log2. Die Genexpression zeigt das 47 der 50 Gene in den *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs runterreguliert sind und 3 Gene eine Heraufregulation zeigen.

3.12 *In Vitro* Untersuchungen charakteristischer Prozesse migrierender Keimzellen bei *Tfap2c* Verlust

Während der Embryonalentwicklung migrieren die Keimzellen von der Allantois zu den Genitalfalten. Dabei finden in den Keimzellen zwischen dem Tag E7.5 und E9.5 drei wichtige Prozesse statt, welche die Epigenetik, den Zellzyklus und die Kontrolle der Transkription umfassen.

Die in der Abbildung 19 B gezeigten semiquantitativen RT-PCR-Analysen weisen darauf hin, dass die *in vitro* generierten PGCLCs mit primordialen Keimzellen *in vivo* verglichen werden können, die gerade zu migrieren begonnen haben. Somit stellte sich die Frage, ob ein Verlust des Transkriptionsfaktors *Tfap2c* in PGCLCs zu einer Störung der für migrierende Keimzellen wichtigen Prozesse führen kann. Da mittels des cDNS-Microarrays einige differenziell exprimierte Gene in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs ermittelt werden konnten, die sowohl den Zellzyklus (Kategorie III), die Epigenetik (Kategorie V) als auch die Transkriptionskontrolle betreffen, sollten diese Prozesse untersucht werden.

3.13 Analyse des Zellzyklus in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs

Während der Migrationsphase zwischen Tag E7.5 und E9.5 sind die Keimzellen in der G2-Phase des Zellzyklus arretiert, was zu einer gehemmten Proliferation der Zellen führt (Seki et al., 2007).

Mittels des cDNS-Microarrays konnten einige Gene identifiziert werden, die eine Funktion bei der Kontrolle des Zellzyklus haben (Abbildung 29). Die Gene *p21*, *Rgcc*, *Gadd45b*, *Cdk7* und *Fez1* sind in die Kontrolle der Transition von der G2-Phase in die M-Phase des Zellzyklus involviert. Hierbei fördern *Gadd45b* (-1.12-fach reguliert in Log2) und *Rgcc* (-3.22-fach in Log2) den Arrest in der G2-Phase, wohingegen *Cdk7* (1.17-fach in Log2) und *Fez1* (1.79-fach in Log2) die für die G2/M-Phasen wichtigen Cdks (Cycline Dependent Kinases) und Cycline aktivieren. *Plk2*, *Cdk6* und *Ccnd1* sind während der G1-Phase des Zellzyklus hochreguliert und fördern die Progression am Kontrollpunkt zur S-Phase. Die cDNS-Microarray Analyse zeigte, dass *Plk6* 1.68-fach, *Cdk6* 1.50-fach und *Ccnd1* 2.33-fach (alle Werte in Log2) in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs hochreguliert sind und der Cyclin-Kinase Inhibitor *p21* um das 1.02-fache hochreguliert ist (Abbildung 29). *p21* inhibiert während des Zellzyklus die Aktivität der CDKs und hat Einfluss auf die Transition von der G1-Phase zur S-Phase.

Ergebnisse

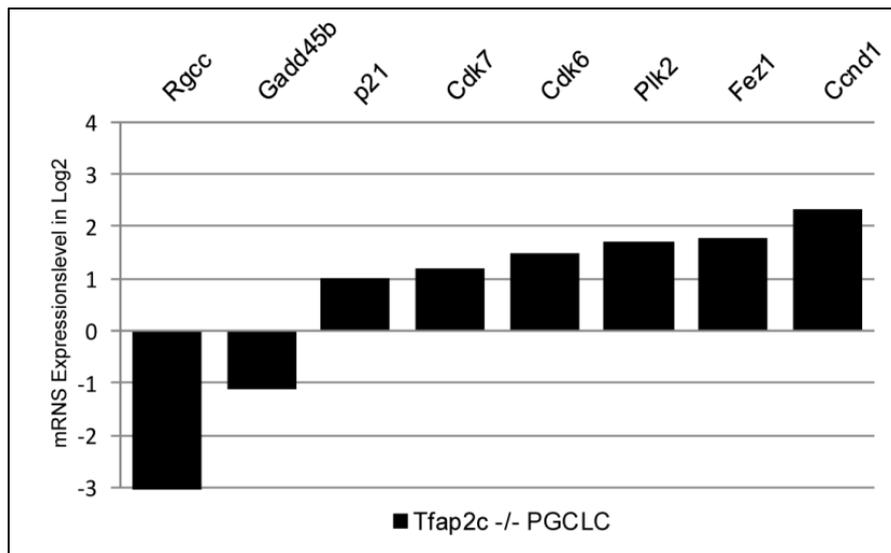


Abbildung 29: Differenziell exprimierte Gene der Kategorie III (Zellzyklus). Diese Gene wurden mittels cDNS-Microarray Analyse in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs identifiziert. Die mRNA Expressionslevel sind im Log2 dargestellt.

Zur Analyse der Zellzyklusverteilung wurden PGCLCs (*Tfap2c*^{WT} und *Tfap2c*^{-/-}) fixiert und mit dem DNS interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidium-Iodid gefärbt. Durch anschließende Messung mittels Durchflusszytometrie, kann das emittierte Fluoreszenzlicht jeder Zelle ermittelt werden, welches proportional zum DNS-Gehalt der Zellen ist. Dabei besitzen Zellen in der G1-Phase einen einfachen, in der S-Phase einen erhöhten und in der G2-Phase einen doppelten DNS-Gehalt.

Die Ergebnisse zeigen, dass verglichen mit den *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs, weniger *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs in der G2-Phase sind (Abbildung 30 A – D). Bei #1 *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs zeigt sich eine signifikante Reduktion von 13% in der G2-Phase (Abbildung 30 B). Diese Tendenz kann ebenfalls bei den #2 *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs ermittelt werden (-4,5%) (Abbildung 30 D). Zusätzlich zeigen die PGCLCs der *Tfap2c*^{-/-}-Zelllinien eine erhöhte Anzahl an Zellen in der S-Phase (#1 +7,8% und #2 +2,9%) (Abbildung 30 B, D).

Ergebnisse

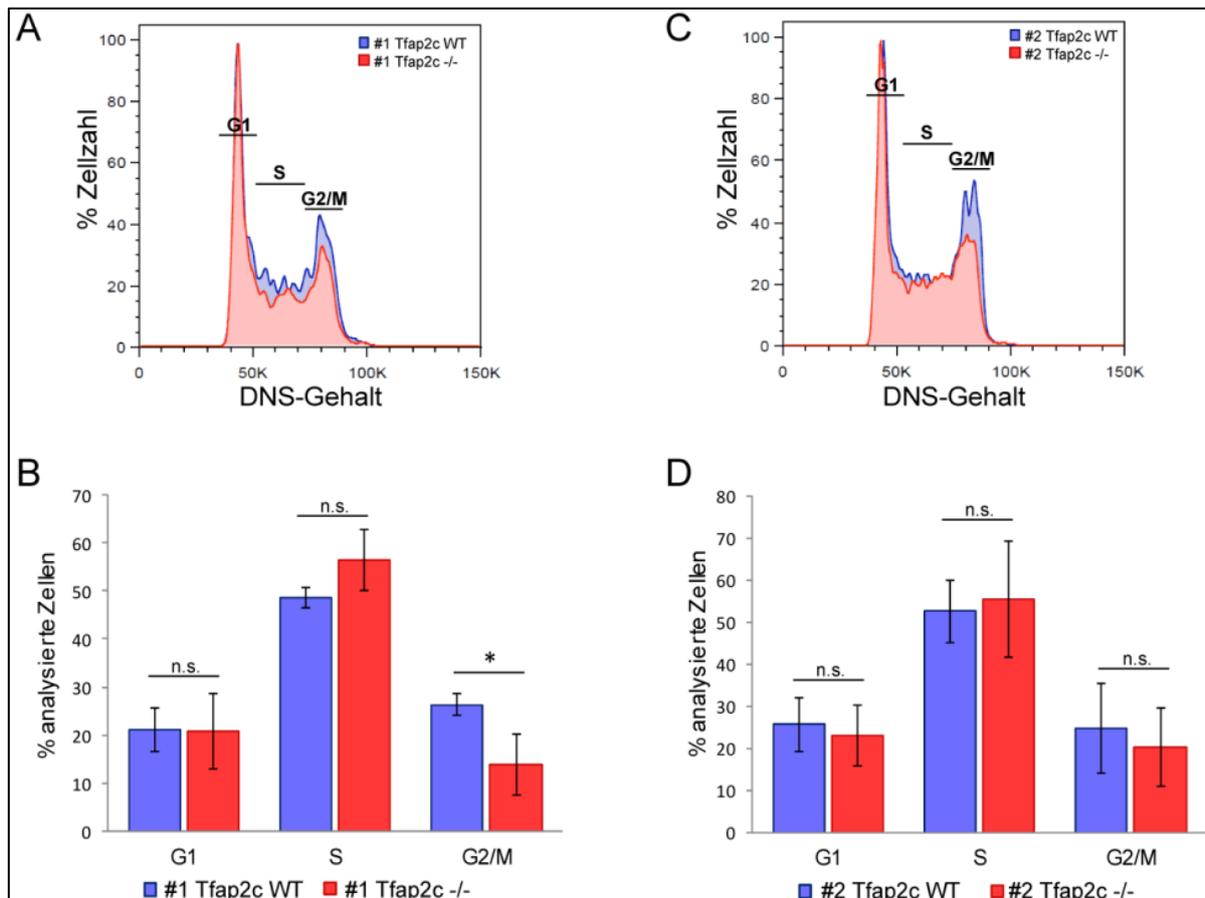


Abbildung 30: Analyse der Zellzyklusphasen in PGCLCs mittels Bestimmung des DNS-Gehaltes [A; B] Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse der Zelllinie #1 und [C; D] der Zelllinie #2. [A; C] Histogramme des DNS-Gehaltes aufgetragen gegen die Anzahl an gemessenen Zellen in Prozent. [B; D] Balkendiagramme der einzelnen Zellzyklusphasen der *Tfp2c*^{-/-} (rote Balken) und *Tfp2c*^{WT} (blaue Balken) PGCLCs. Die Analysen wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Ein p-Wert von <0,05 (*) wurde als signifikant betrachtet.

Zur Überprüfung, der Spezifität der ermittelten Zellzyklusveränderungen in den PGCLCs, wurden zur Kontrolle Blimp1mVenus negative Zellen fixiert und mit Propidium-Iodid gefärbt. Hierbei konnten in den *Tfp2c*^{-/-}-Blimp1mVenus negativen Zellen mehr Zellen in der G2-Phase detektiert werden, als bei den *Tfp2c*^{WT}-Zellen (Abbildung 31 B, D). Bei den Blimp1mVenus negativen Zellen handelt es sich um Zellen, die während der EB Kultivierung spontan in alle drei Keimblätter differenzieren und es wurde gezeigt, dass sie proliferierenden, somatischen Zellen entsprechen (Hayashi et al., 2011).

Da diese Blimp1mVenus negativen Zellen eine andere Zellzyklusverteilung aufweisen, können die ermittelten Veränderungen der Zellzyklusphasen in *Tfp2c*^{-/-}-Blimp1mVenus positiven PGCLCs als spezifisch bestätigt werden.

Ergebnisse

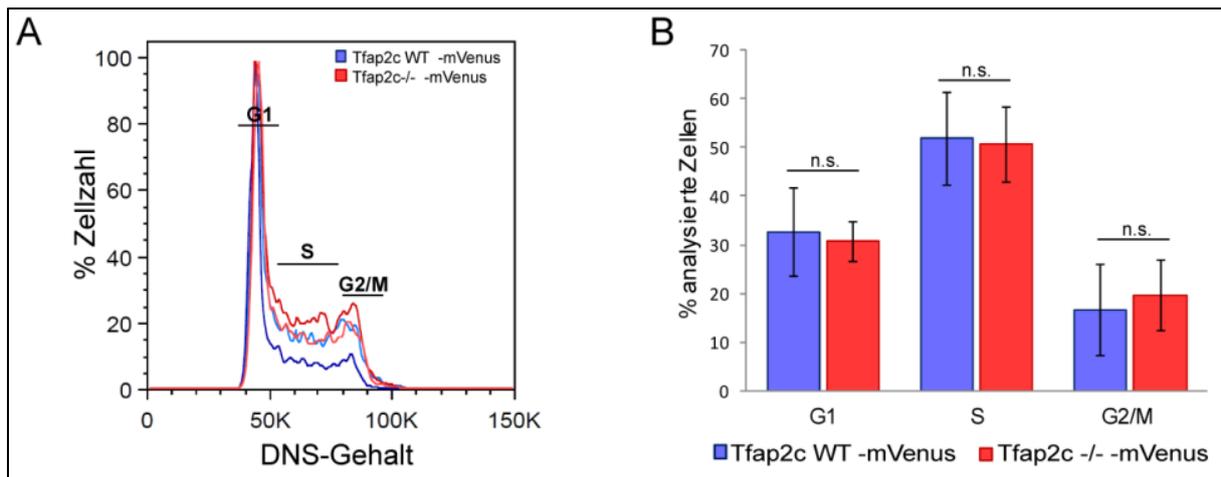


Abbildung 31: Analyse der Zellzyklusphasen in Blimp1mVenus negativen Zellen mittels Bestimmung des DNS-Gehaltes. [A; B] Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse der Blimp1mVenus negativen Zellen. [A] Histogramm des DNS-Gehaltes aufgetragen gegen die Anzahl an gemessenen Zellen in Prozent. [B] Balkendiagramm der einzelnen Zellzyklusphasen der *Tfap2c*^{-/-} (rote Balken) und *Tfap2c*^{WT} (blaue Balken) Zellen (n = 6). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Eine verringerte Proliferationsrate und der Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus sind Eigenschaften migrierender Keimzellen (Seki et al., 2007). Die Zellzyklusanalyse der PGCLCs zeigt, dass bei einem Verlust von *Tfap2c* diese Zellzyklusverteilung gestört ist. Zum einen zeigt sich ein Verlust von Zellen in der G2-Phase und zum anderen eine größere Anzahl an proliferierenden Zellen in beiden *Tfap2c*^{-/-}-Zelllinien.

3.14 Untersuchung der DNS-Methylierung in PGCLCs

Während der Keimzell-Migration findet globale Demethylierung statt. Gene mit Imprinting weisen in prä-migratorischen und migratorischen Keimzellen eine Methylierung des maternal oder des paternal vererbten Allels auf. Bei post-migratorischen Keimzellen wird dieses Imprintingmuster gelöscht und je nach Geschlecht des Embryos ab dem Tag E14.5 ein paternales oder ein maternales Imprintingmuster erstellt (Verona et al., 2008).

Die globale DNS-Demethylierung ist bis zum Eintritt der Keimzellen in die Genitalanlagen abgeschlossen und wird durch die Herunterregulation von *de-novo* Methylasen wie *Dnmt3a/b*, *Dnmt3l* und *Uhrf1*, welches mit der DNS-Methyltransferase *Dnmt1*, aber auch mit *Dnmt3a/b* interagiert, etabliert (Saitou et al., 2012). Zusätzlich konnte in Keimzellen zum Ende der Migrationsphase, eine aktive Demethylierung durch die Tet-Proteine (Tet1 und Tet2), bei der 5mC in 5hmC konvertiert wird, nachgewiesen werden (Yamaguchi et al., 2013).

Ergebnisse

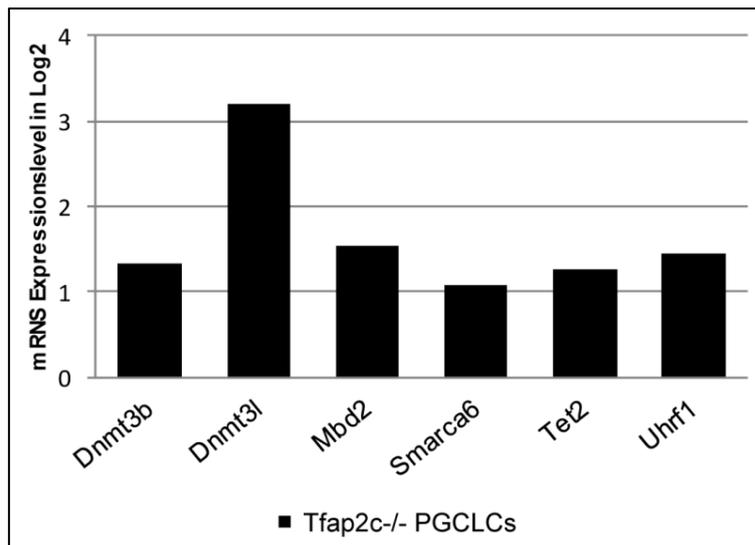


Abbildung 32: Differenziell exprimierte Gene der Kategorie V (Epigenetik). Diese Gene wurden mittels cDNS-Microarray Analyse in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs identifiziert. Die mRNS Expressionslevel sind in Log2 dargestellt.

Bei *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs konnte im Vergleich zu den *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs eine Heraufregulation von *Dnmt3b*, *Dnmt3l* und *Uhrf1*, sowie von *Mbd2*, *Smarca6* und *Tet2* nachgewiesen werden (Abbildung 32). Diese an der epigenetischen Regulation beteiligten Gene, könnten an Veränderungen der DNS-Methylierung in PGCLCs beteiligt sein.

Aufgrund dieser cDNS-Microarray Ergebnisse und einer Untersuchung, bei der die differenziell methylierte Region (DMR) des 5'-Bereichs des *H19* Genlokus analysiert wurde (Hayashi et al., 2011), sollte die Methylierung der DNS in den *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs im Vergleich zu den *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs untersucht werden.

Hayashi et al. konnten bei dem Imprinting Gen *H19* eine leichte Reduktion des Methylierungslevels bei Tag 6 *in vitro* differenzierten PGCLCs zeigen, was daraufhin deutet, dass die PGCLCs den Prozess der Imprinting-Löschung initiiert haben.

Die 5'-DMR Region des *H19* Gens enthält 17 CpG-Dinukleotide, die Ziel von DNS-Methylierungsprozessen sind, welche zu einer epigenetischen Inaktivierung des Gens führen können. Es wurde eine 421 bp große Region ungefähr 4000 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts amplifiziert (Hayashi et al., 2011) (Abbildung 33 A).

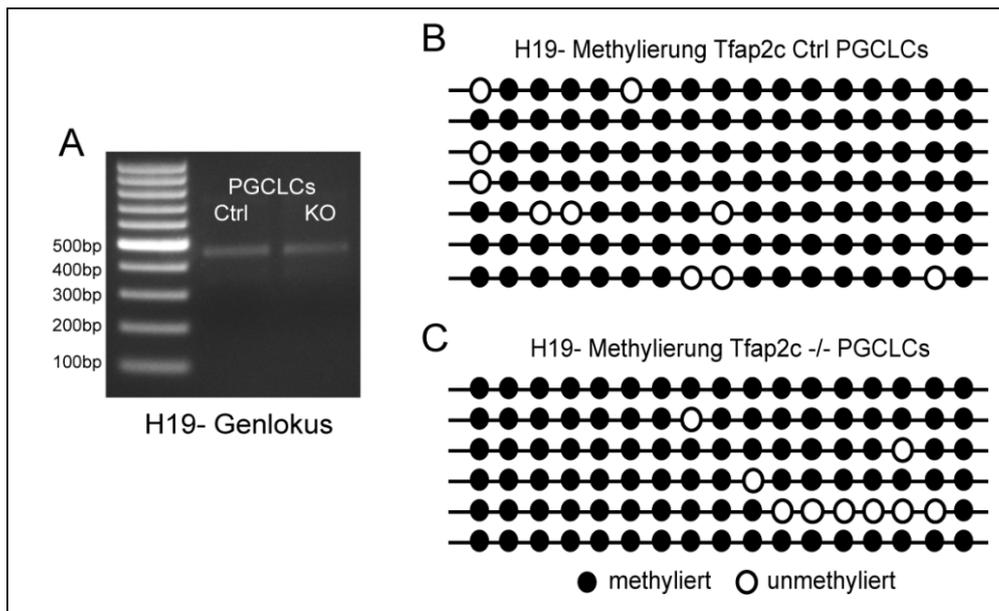


Abbildung 33: Analyse der DNS-Methylierung in PGCLCs. [A] PCR zur Amplifikation eines 421 bp großen Fragmentes im 5' Bereich des H19 Genlokus. [B; C] Bisulfidsequenzierung von *Tfap2c*^{WT} und *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs. Der H19 Locus weist methylierte CpGs (schwarze Kreise) und unmethylierte CpGs (weiße Kreise) auf. 92% der analysierten CpGs in *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs sind methyliert und 91% sind in den *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs methyliert.

Die Bisulfid-Sequenzierung ergab, dass für den DMR Bereich des *H19* Genlokus in den *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs eine 92% Methylierung vorliegt und bei den *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs eine 91% Methylierung (Abbildung 33 B - C). Da noch über 90% der CpG-Dinukleotide eine Methylierung aufweisen, scheinen die in dieser Arbeit generierten PGCLCs den Prozess der Imprinting-Löschung noch nicht initiiert zu haben.

3.15 Untersuchung der Transkriptionsregulation in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs

Ein weiterer essenzieller Prozess, der während der Migrationsphase stattfindet, ist die Reduktion von repressiven Histon-Modifikationen, was eine erhöhte Transkription begünstigt. Dies findet in migrierenden Keimzellen allerdings nicht statt, da ein Transkriptions-Abbruch während der Elongationsphase etabliert wird, durch Herunterregulation der RNS-Polymerase II Aktivität (Seki et al., 2007).

Zur Überprüfung der Aktivität der RNS-Polymerase II abhängigen Transkription wurde die Expression einzelner Gene die an diesem Prozess beteiligt sind, mittels qRT-PCR-Analyse untersucht (Abbildung 34).

Ergebnisse

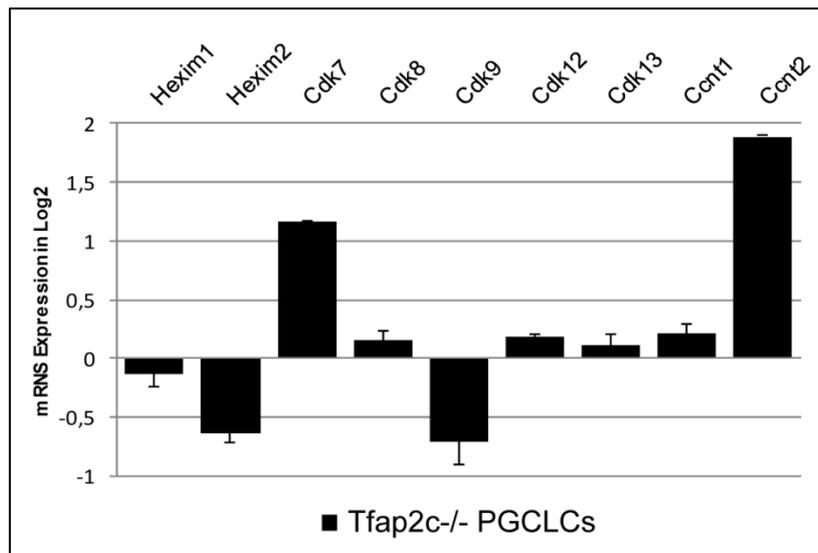


Abbildung 34: Untersuchung der RNS-Polymerase II abhängigen Transkription in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs. Das mRNS Expressionslevel verschiedener Gene wurde mittels qRT-PCR analysiert. Die Expressionslevel wurden gegen $\beta Actin$ normiert, die Expression der *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs gleich 1 gesetzt und die Ergebnisse im Log2 dargestellt. Die qRT-PCR wurde in biologischen Duplikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die qRT-PCR-Analyse der *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs konnte im Vergleich zu den *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs eine Herabregulation von *Hexim1* und *Hexim2*, sowie von der Cyclin-abhängigen Kinase *Cdk9* aufzeigen (Abbildung 34). Dagegen zeigen die Cyclin-abhängigen Kinasen *Cdk7*, *Cdk8*, *Cdk12* und *Cdk13* und die Cycline *Ccnt1* und *Ccnt2* eine Heraufregulation nach *Tfap2c* Verlust. Hierbei zeigen *Cdk7* und *Ccnt2* die höchste Heraufregulation und *Hexim2* und *Cdk9* die größte Expressionsreduktion. Dagegen weisen die anderen untersuchten Gene nur sehr geringe Expressionsänderung auf.

Die ermittelten Veränderungen in der Genexpression könnten zu Störungen in der Regulation der Transkription-Elongation in PGCLCs führen. Die Elongation wird durch Hyperphosphorylierung der Serin-Reste 2 (Ser2), 5 (Ser5) und 7 (Ser7) der Carboxyterminalen-Domäne (CTD) der RNS-Polymerase II reguliert (Saunders et al. 2006). Die Phosphorylierung von Ser5 und Ser7 erfolgt durch *Cdk7* und P-TEFb und von Ser2 durch *Cdk8*, *Cdk12* und *Cdk13* (Ghamari et al. 2013; Heidemann et al. 2013, Jeronimo et al. 2013).

Um dies zu Überprüfen wurden PGCLCs generiert, mittels *Blimp1mVenus* Reporter identifiziert und anschließend Zytospins mit jeweils 1000 Zellen pro Objektträger angefertigt. Diese wurden immunhistochemisch mit Antikörpern, die phosphoryliertes Ser2 und Ser5 detektieren, gefärbt.

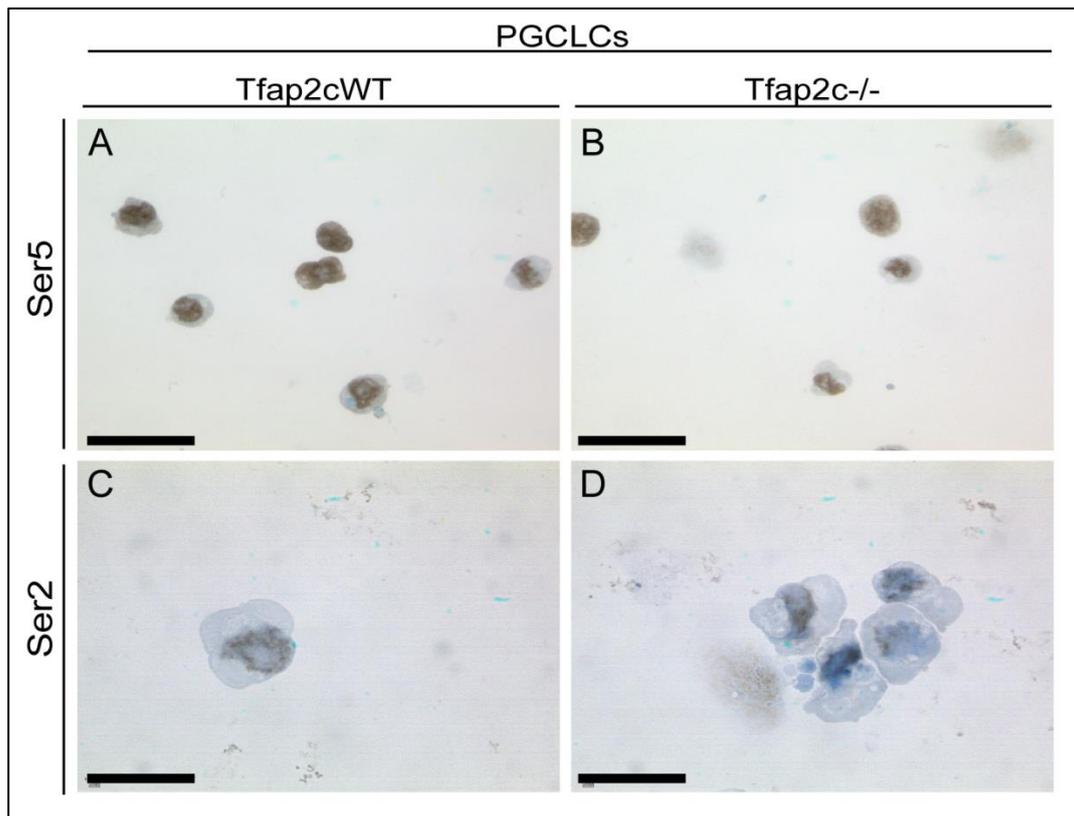


Abbildung 35: Immunhistochemische-Färbungen von *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs zur Analyse phosphorylierter Serin-Reste der CTD der RNS-Polymerase II. [A; B] Antikörper gegen phosphoryliertes Ser5 und [C; D] gegen Ser2. Die Größenbalken entsprechen 50 µm [A; B] und 20 µm [C; D].

Die Abbildung 35 zeigt die Phosphorylierung von Ser5 (Abbildung 35 A, B) und Ser2 (Abbildung 35 C, D) in *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs. Die Untersuchung konnte keine Unterschiede in der Phosphorylierungsintensität bei den beiden Genotypen aufzeigen, was darauf hindeutet, dass in den untersuchten PGCLCs kein Unterschied des Phosphorylierungszustandes bei *Tfap2c* Verlust besteht.

3.16 Transienter TFAP2C-Knockdown in TCam-2 Zellen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Funktion von *Tfap2c* bei der Genregulation während der murinen Keimzell-Entwicklung, auch im humanen System konserviert ist. Eine Auswahl *Tfap2c* regulierter Gene in murinen PGCLCs sollte daher in der humanen Keimzelltumorzelllinie TCam-2 untersucht werden. Diese Keimzelltumorzelllinie wurde als *in vitro* Modell für humane Keimzellen beschrieben, da TCam-2 Zellen genetische und epigenetische Eigenschaften von Keimzellen aufweisen (Weber et al. 2010, Schäfer et al. 2011).

Ergebnisse

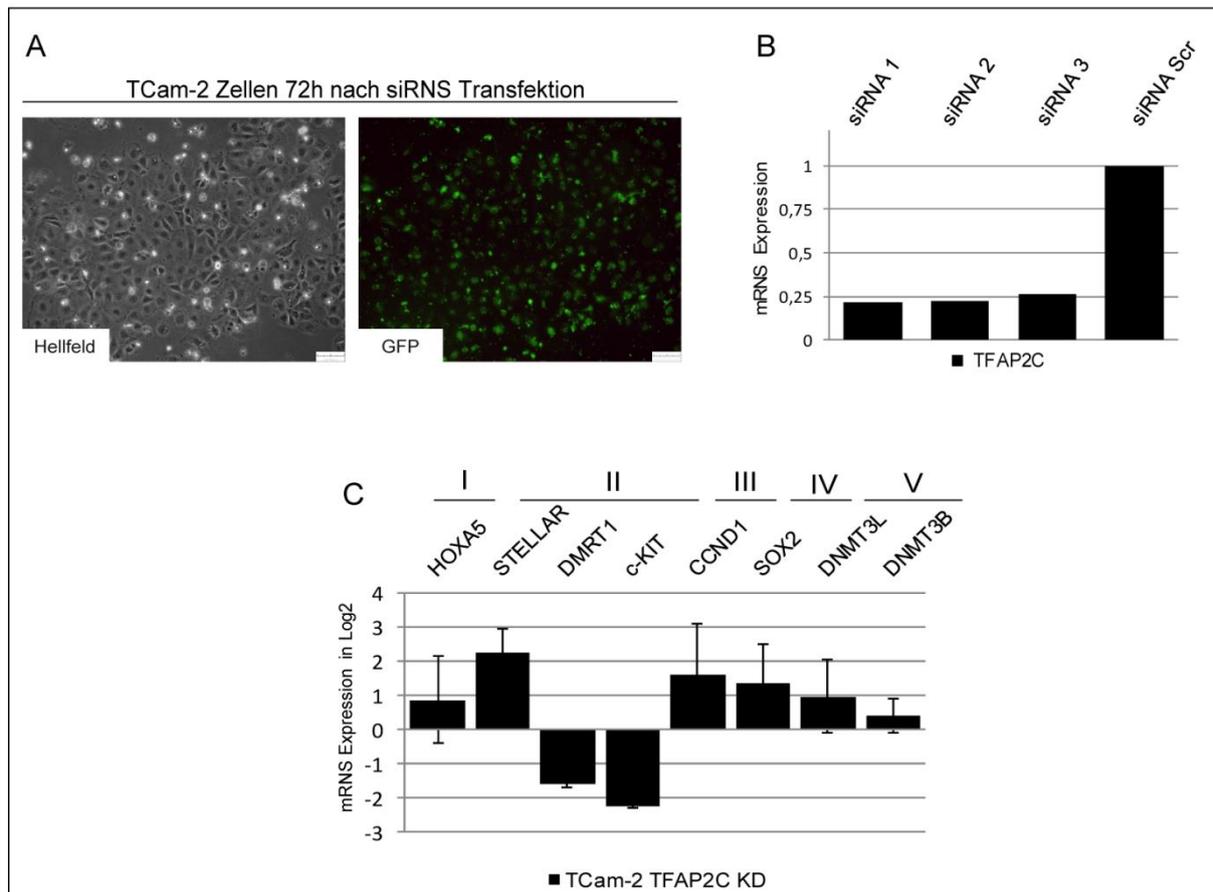


Abbildung 36: Transienter TFAP2C-Knockdown in TCam-2 Zellen. [A] TCam-2 Zellen 72 h nach siRNA Transfektion. Eine Kontrollfluoreszenz siRNA gibt Auskunft über die Transfektionseffizienz. Der Größenbalken entspricht 100 μm . [B] qRT-PCR zur Analyse der Knockdown-Effizienz der drei siRNA-Konstrukte 1, 2 & 3 im Vergleich zur Kontroll siRNA (Scr), welche gleich 1 gesetzt wurde. [C] qRT-PCR ausgesuchter Gene der fünf Kategorien (Tabelle 2) nach TFAP2C Knockdown in TCam-2 Zellen. Die mRNA Expression wurde gegen die Kontroll siRNA (Scr) gerechnet und in Log₂ angegeben. Die Analyse wurde in biologischen Triplikaten durchgeführt und die mRNA Expression wurde gegen *Gapdh* normiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (Teile dieser Abbildung wurden in Schemmer et al. 2013 publiziert).

In einem siRNA basierten Experiment wurde die Expression von humanem *TFAP2C* in TCam-2 Zellen reduziert. Zur Überprüfung der Transfektions-Effizienz der Zellen wurde zeitgleich eine fluoreszenzmarkierte siRNA transfiziert (Abbildung 36 A). 72 Stunden nach der Transfektion der *TFAP2C*-siRNA konnte eine deutliche Reduktion von 75% des *TFAP2C* Expressionslevels mittels qRT-PCR-Analyse bestimmt werden (Abbildung 36 B).

Anschließend wurde die Expression ausgesuchter Gene aller fünf Kategorien differenziell exprimierter Gene in murinen PGCLCs mit Hilfe der qRT-PCR in TCam-2 Zellen überprüft. Nach Transfektion der *TFAP2C*-siRNA konnte eine Expressionsinduktion bei *HOXA1*, *CCND1*, *SOX2*, sowie bei den *de novo* Methylasen *DNMT3L* und *DNMT3B* nachgewiesen werden (Abbildung 36 C). Eine

Ergebnisse

Reduktion der Expression konnte bei den Keimzellmarkern *c-KIT* und *DMRT1* beobachtet werden. Zusätzlich konnte eine Heraufregulation der Expression von *STELLAR* gezeigt werden.

Die beobachteten Veränderungen der Expressionslevel nach siRNS-Knockdown entsprechen den ermittelten Ergebnissen bei *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs, mit Ausnahme von Stella/STELLAR. Dies zeigt eine Herabregulation in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs, wohingegen in TCam-2 Zellen nach TFAP2C-Knockdown eine Heraufregulation der *STELLAR* Genexpression nachgewiesen werden kann. Dies weist daraufhin, dass das Pluripotenz-assoziierte Protein STELLAR eine unterschiedliche Funktion in den beiden untersuchten Zellsystemen besitzt.

3.17 Stabiler TFAP2C-Knockdown in TCam-2 Zellen

Da nach der transienten, siRNS-vermittelten Reduktion von TFAP2C eine Heraufregulation von Keimzellmarkern wie *STELLAR* beobachtet wurde, bestand die Möglichkeit, dass eine kurzzeitige Reduktion nicht ausreicht, um langfristige Expressionsunterschiede nach TFAP2C Verlust zu untersuchen. Dazu wurden Zellklone mit stabiler TFAP2C Reduktion mittels shRNS-Konstrukten generiert. Die Knockdown-Effizienz und die Spezifität der TFAP2C shRNS-Konstrukte wurde zunächst durch eine transiente Transfektion in TCam-2 Zellen getestet (Abbildung 37 A). Bereits 48 h nach der Transfektion zeigte sich eine deutliche Reduktion bei den shRNS-Konstrukten A und B (Abbildung 37 A). Diese Konstrukte (shRNS-A und shRNS-B) wurden daraufhin zur Generierung stabiler Klone eingesetzt. Nach einer Woche bzw. zwei Wochen der stabilen Transfektion mit dem shRNS-A Konstrukt, wurde zur Bestimmung der TFAP2C-Knockdown-Effizienz RNS isoliert. Nach einer Woche (Tag 7) zeigte sich eine 71% (-1,78 in Log2) Reduktion der *TFAP2C* Expression und nach zwei Wochen (Tag 14) eine 86% (-2,77 in Log2) *TFAP2C* Reduktion (Abbildung 37 B). Während des Zeitraums der Zellkultivierung wurde eine hohe Rate an apoptotischen Zellen beobachtet, was dazu führte, dass nach dreiwöchiger Kultivierung keine RNS isoliert werden konnte. Eine starke Expressionsreduktion von *TFAP2C* könnte zum Zelltod oder zu terminaler Differenzierung in den TCam-2 Zellen geführt haben. Wie bei den transienten Untersuchungen wurde mittels qRT-PCR Analyse die Expression ausgewählter Gene nach TFAP2C Reduktion überprüft.

Ergebnisse

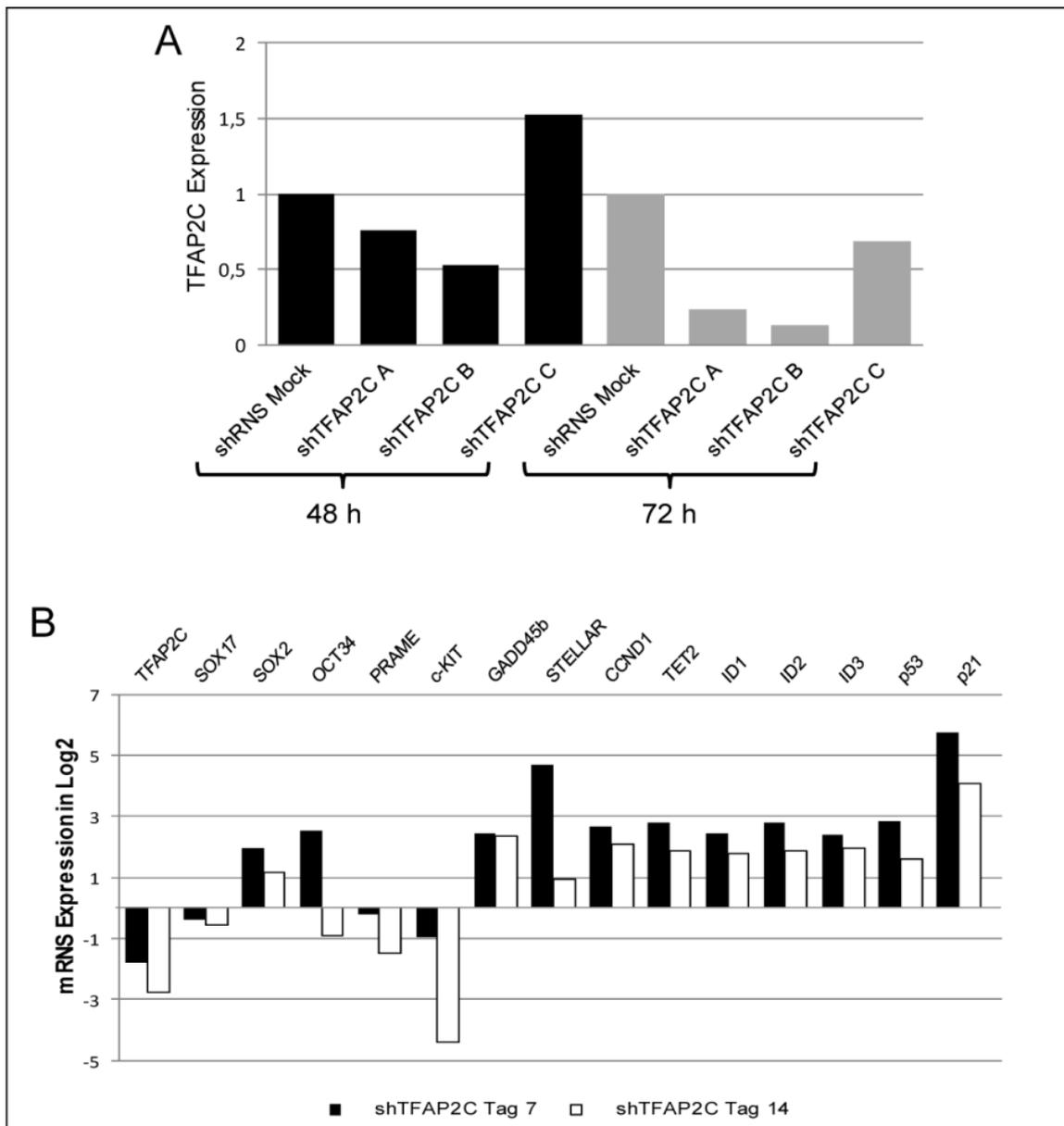


Abbildung 37: Stabiler TFAP2C-Knockdown in TCam-2 Zellen. [A] Transiente Transfektion zur Überprüfung der shRNS Konstrukte. Die qRT-PCR-Analysen wurden 48 h und 72 h nach der Transfektion durchgeführt. Die Knockdown-Effizienz von drei shRNS Konstrukten (shTFAP2C A, B & C) wurde überprüft. [B] qRT-PCR-Analyse ausgesuchter Gene nach einer Woche (Tag 7) und vierzehn Tagen (Tag 14) nach Transduktion der TCam-2 Zellen mit dem shRNS-Konstrukt A. mRNA Expression wurde gegen die Kontroll siRNS (Scr) gerechnet und in Log2 angegeben. Die mRNA Expression wurde gegen *Gapdh* normiert.

Eine Woche nach Transfektion konnte in den TCam-2 Zellen eine *SOX2* und *OCT3/4* Expressionsinduktion ermittelt werden, sowie eine Reduktion der *SOX17* Expression. Des Weiteren konnte eine Expressionsreduktion zweier weiterer Gene ermittelt werden; die Spermatogenese-assoziierten Gene *PRAME* und *c-KIT* sind nach TFAP2C-Knockdown herunterreguliert (Abbildung 37 B).

Die Expression von *STELLAR* zeigt bei stabilem Knockdown die gleiche Tendenz wie bei den Versuchen mit siRNS. Bei *STELLAR* und auch bei *GADD45b* konnte eine

Ergebnisse

Expressionsinduktion gezeigt werden. Die Expression der Gene *CCND1*, *TET2*, *ID1*, *ID2*, *ID3*, *p53* und *p21* war bei TFAP2C-Knockdown in TCam-2 Zellen heraufreguliert, was den Beobachtungen der Expressionsänderungen bei *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs entspricht. Interessanterweise sind einige der hochregulierten Gene (*GADD45b*, *ID1*, *ID2*, *ID3*, *p21*) im Zellzyklus involviert und hier speziell bei der Etablierung eines G2-Arrests. Dies deutet daraufhin, dass TFAP2C eine Rolle bei der Zellzyklus Kontrolle besitzt, diese aber in den verschiedenen Zellsystemen (murine PGCLCS und humane Seminomzelllinie) unterschiedliche Auswirkungen hat.

Zusammenfassend deuten die transienten und stabilen Knockdown-Experimente darauf hin, dass es in TCam-2 Zellen bei einer Reduktion der *TFAP2C* Expression, wie in den murinen *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs, zu einer Deregulation von Genen kommt, welche an der Aufrechterhaltung des Keimzell-Schicksals beteiligt sind. In humanen TCam-2 Zellen ist TFAP2C an der Regulation aller beschriebenen funktionellen Kategorien (Tabelle 2), welche in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs identifiziert werden konnten, involviert.

4 Diskussion

Während der murinen Embryonalentwicklung bilden sich die PGCs ab Tag E6.25 im proximal-posterioren Epiblasten. Die Induktion der Keimzell-Kompetenz unterliegt dabei stringenter genetischer Kontrolle durch die beiden PR-Domäne-Faktoren Blimp1 und Prdm14. Diese spezifizieren das Keimzell-Schicksal in wenigen Zellen und aktivieren in diesen Zellen Keimzell-spezifische Gene wie *Tfap2c*, *Nanos3* und *Stella*. Zudem reprimieren Blimp1/Prdm14 epigenetische Regulatoren und Zellzyklus-assoziierte Gene (Saitou & Yamaji 2010, Kurimoto et al., 2008; Yamaji et al., 2008). Insbesondere ist die Repression der somatischen Gene durch Blimp1 das Schlüsselereignis zur Induktion der Keimzell-Entwicklung. Aufgrund der Expression Pluripotenz-assoziiierter Gene wie *Oct3/4*, *Sox2* und *Nanog*, der globalen Hypomethylierung und dem Verlust repressiver Histon-Modifikationen befinden sich die Keimzellen in einem pluripotenten Zustand, welcher durch Repression der somatischen Genen aufrechterhalten wird.

In dieser Arbeit sollten die Aspekte der Keimzell-Entwicklung untersucht werden, die durch den Transkriptionsfaktor *Tfap2c* reguliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass in einer konditionalen *Tfap2c*-Nullmutante ein Keimzell-Verlust kurz nach deren Spezifizierung an Tag E8.0 stattfindet (Weber et al., 2010). Aus diesem Grund wurden ES-Zelllinien mit einer Deletion im *Tfap2c* Genlocus generiert. Mit einem *in vitro* Differenzierungsprotokoll wurden Keimzell-ähnliche Zellen (PGCLCs) erzeugt und das transkriptionelle Netzwerk mittels cDNS-Microarray analysiert. Mit dieser Methodik konnten erstmals Gene in PGCLCs identifiziert werden, die nach *Tfap2c* Verlust eine Deregulation aufweisen. Es wurden 208 Gene identifiziert, die eine Herabregulation zeigen und 247 Gene, die eine Hochregulation zeigen.

Während *Tfap2c* einerseits für die Repression somatischer Gene und hier insbesondere für die Repression mesodermaler Marker und Neurogenese-Marker verantwortlich ist, zeigt sich andererseits eine essenzielle Rolle von *Tfap2c* bei der Induktion Keimzell- und Spermatogenese-spezifischer Gene während der murinen Keimzell-Entwicklung. Des Weiteren ist *Tfap2c* durch Repression epigenetischer Regulatoren an der Aufrechterhaltung der Demethylierung in Keimzellen beteiligt und reprimiert zusätzlich Zellzyklus- und Pluripotenz-assoziierte Gene.

4.1 Aufrechterhaltung des Keimzell-Schicksals durch *Tfap2c*

In dieser Arbeit wurden PGCLCs durch die Differenzierung von ES-Zellen über eine Epiblasten-Zellen ähnliche Zwischenstufe generiert. Die in dieser Arbeit hierfür etablierten ES-Zelllinien besitzen zum einen den Keimzell-spezifischen Reporter *Blimp1mVenus* und zum anderen sind sie vom Genotyp *Tfap2c*^{-/-} oder *Tfap2c*^{WT}. Diese Zellen unterscheiden sich dabei nicht in Bezug auf Morphologie und Wachstumsverhalten bei Kultivierung in DMEM-Medium (+FCS und LIF) auf mitotisch inaktiven embryonalen Fibroblasten. Auch eine Überführung der Zellen in Serum-freies 2i-Medium ließ keine Unterschiede zwischen den ES-Zelllinien erkennen. Des Weiteren zeigten die cDNS-Microarray Analysen (Kapitel 3.9), dass bei Verlust von *Tfap2c* in ES-Zellen nur wenige Gene (n = 26 bei einem FC > 1,5 in Log2) differenziell exprimiert sind, was darauf hindeutet, dass *Tfap2c* keine essenzielle Rolle bei der Aufrechterhaltung des ES-Zellschicksals besitzt. Anzumerken ist hier, dass lediglich 10% der ES-Zellen *Tfap2c* exprimieren (Kuckenberget al., 2010), was ebenfalls dafür spricht, dass es für die Aufrechterhaltung des ES-Zell-Status keine Rolle spielt.

Ein Vergleich der *Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs zeigt, dass die Expression der beiden Keimzell-Marker *Prdm14* und *Blimp1* bei Verlust von *Tfap2c* nicht dereguliert ist. Es konnte in den PGCLCs beider Genotypen (*Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT}) eine Expression dieser Gene mittels FACS und RT-PCR detektiert werden. Dies entspricht publizierten Ergebnissen, welche zeigen, dass nach Verlust von *Tfap2c* in der murinen Keimbahn eine Spezifizierung der Keimzellen stattfindet (Weber et al., 2010).

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Genexpression migratorischer und post-migratorischer Keimzell-Marker wie *Stella*, *Dazl*, *Rhox4a/5/6/9*, *Dmrt1* und *c-Kit* in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs reprimiert ist (Kapitel 3.9). Zusätzlich konnte eine ChIP-Analyse der PGCLCs zeigen, dass konservierte Bindestellen in den Promotorregionen der Gene *Dmrt1*, *c-Kit* und *Nanos3* von *Tfap2c* gebunden werden (Kapitel 3.10). Weitere publizierte ChIP-Analysen mit anschließender Microarray- oder Sequenzierungs-Analyse identifizierten *Tfap2c* Zielgene in murinen Trophoblast-Stammzellen (Kidder und Palmer, 2010), humanen Brustkrebszellen (Woodfield et al., 2010) und nach *Tfap2c* Überexpression in der embryonalen Karzinomzelllinie P19 (Magnúsdóttir et al., 2013). Ein Vergleich dieser Analysen zeigt, dass die Gene *Dmrt1* und *Nanos3* in allen Zellsystemen als direkte

Diskussion

Tfap2c Zielgene identifiziert werden konnten. *Nanos3* wird während der Keimzell-Entwicklung ab dem Tag E8.75 exprimiert und ein Verlust führt zur Apoptose der Keimzellen (Suzuki et al. 2008; Tsuda et al. 2003). Der Doublesex und Mab3 Transkriptionsfaktor *Dmrt1* ist in den Keimzellen ab dem Tag E10.5 exprimiert und reguliert die Expression von Pluripotenz-Markern und den mitotischen Arrest der Keimzellen (Krentz et al., 2009). Die Keimzellen von *Dmrt1*^{-/-}-Mäusen entwickeln sich während der Migration normal, gehen aber nicht in den mitotischen Arrest. Pluripotenz-Marker bleiben zudem weiterhin in den Keimzellen männlicher Tiere exprimiert (Krentz et al., 2009). Basierend auf den in dieser Arbeit erbrachten Ergebnissen, könnte die direkte Bindung des Transkriptionsfaktors Tfap2c an die Promotorregion von *Dmrt1* und dessen Regulation an der Initiation des mitotischen Arrests beteiligt sein und für die Repression der Pluripotenz-Gene in männlichen Keimzellen verantwortlich sein.

Eine Studie von Nakaki et al. beschreibt die *in vitro* Generierung von Keimzellen aus ES-Zellen durch Überexpression der Faktoren *Blimp1*, *Prdm14* und *Tfap2c*. Nach erfolgter Überexpression wurde in diesen Zellen eine globale transkriptionelle Analyse durchgeführt. Einige Gene wiesen dabei eine Heraufregulation der Expression auf, welche sie als sogenannte „Core-PGC“-Gene zusammenfassten. Ein Vergleich dieser Analyse mit der in dieser Arbeit durchgeführten globalen cDNS-Microarray-Expressionsanalyse zeigt, dass 50 der 75 „Core-PGC“-Gene in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs dereguliert sind (Kapitel 3.11). Von diesen 50 Genen, zeigen 47 eine mindestens 2-fache Expressionsreduktion in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs. Nur drei der „Core-PGC“-Gene zeigen eine heraufregulierte Genexpression in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs. Dies sind *Id4*, welches eine wichtige Rolle bei der Zellzyklus-Kontrolle spielt (Yun et al., 2004), das junctionale Adhäsionsmolekül *Jam2* (Su et al., 2012) und *D330028D13Rik*, welches ein Gen der Fam221 Familie mit unbekannter Funktion ist. Dieser Vergleich mit der Studie von Nakaki et al. macht deutlich, dass Tfap2c eine essenzielle Rolle in der Aufrechterhaltung des Keimzell-Status besitzt, da 50 der 75 als „Core-PGCs“ bezeichneten Gene bei einem Verlust von *Tfap2c* in PGCLCs dereguliert sind.

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit zudem eine Herunterregulation von *Cxcr4* in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs gezeigt werden. *Cxcr4* ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, welcher an der Oberfläche der Keimzellen lokalisiert ist und den Liganden *Cxcl12* bindet. *Cxcr4/Cxcl12* sind während der Migration der Keimzellen und speziell für die

Diskussion

Besiedlung der Gonaden erforderlich. Die Funktion von *Cxcr4/Cxcl12* zeigt viele funktionelle Parallelen zum *c-Kit* Liganden (*SCF*) und dessen Rezeptor *c-Kit* auf, welcher ebenfalls eine reduzierte Genexpression in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs aufweist (Gilbert et al., 2009; Molyneaux, 2003). Während der Migration interagieren die Keimzellen welche *c-Kit* exprimieren mit den *SCF* exprimierenden Sertoli-Zellen. Der dadurch aktivierte Signalweg verhindert Apoptose in den Keimzellen. Neben dieser Funktion besitzt der *c-Kit/SCF*-Komplex auch eine Funktion bei der Proliferation und Migration der PGCs (Gu et al., 2009).

Des Weiteren konnte bei der cDNS-Microarray Analyse eine reduzierte Genexpression von *Cxcr7* in den *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs beobachtet werden, welcher ebenfalls ein *Cxcl12* Rezeptor ist. In Zebrafischen konnte gezeigt werden, dass durch Bindung des Liganden *Cxcl12* an den Rezeptor *Cxcr7* die Liganden Expression reduziert wird. Hierdurch entsteht ein chemokines Gefälle in Richtung der Genitalanlagen, welches entscheidend ist für die Migration der Keimzellen zu den Genitalfalten (Boldajipour et al., 2008; Naumann et al., 2010). Dies verdeutlicht, dass *Cxcl12/Cxcr4*, *Cxcl12/Cxcr7* und *SCF/c-Kit* eine Rolle bei der Migration und dem Überleben der Keimzellen spielen und *Tfap2c* hierbei deren Genexpression während der Keimzell-Entwicklung reguliert. Bei Störungen dieser Signalwege kann es zu einer fehlerhaften Keimzell-Migration kommen, was wiederum zur Bildung von extragonadalen Keimzelltumor-Vorläuferläsionen des Typ I führen könnte (Gilbert et al., 2011; Runyan et al., 2006; Schneider et al., 2001; Ueno et al., 2004).

Weiter konnten Gene der *Rhox*- (Reproductive Homeobox Genes on X chromosome) Familie unter den deregulierten Genen ermittelt werden. In der Maus sind 33 *Rhox*-Gene bekannt, die sowohl während der Embryogenese als auch im adulten Tier in den reproduktiven Geweben exprimiert werden (Wilkinson et al 1990, Pitman et al 1998, Rao et al 2002). Es konnte gezeigt werden, dass *Rhox5* defiziente männliche Mäuse eine verminderte Spermienzahl aufweisen und subfertil sind (MacLean et al. 2005). *Rhox5* wird pränatal in den primordialen Keimzellen und postnatal in den Sertoli Zellen exprimiert. Es wird vermutet, dass *Rhox5* das Überleben der Keimzellen über Regulation von Sertoli-Zell spezifischen Genen regelt, welche für Proteine kodieren, die am Zell-Überleben und an der Apoptose beteiligt sind (MacLean und Wilkinson, 2010). Die genaue Funktion von *Rhox5* in den Keimzellen ist bis zu diesem Zeitpunkt allerdings noch unklar (MacLean und Wilkinson, 2010).

Diskussion

Zwei weitere RhoX-Familienmitglieder, welche nach *Tfap2c* Verlust in PGCLCs dereguliert sind, sind *Rhox6* (Psx1) und *Rhox9* (Psx2). Sie werden ab dem Tag E10.5 in den Keimzellen und der Plazenta exprimiert (Takasaki et al, 2000 Liu et al, 2011).

Zudem konnten auch im Menschen *RHOX*-Gene identifiziert werden. Die humanen *RHOXF1* und *RHOXF2/2B*-Gene werden in Keimzellen sowie den Hoden und Eizellen exprimiert (Song et al., 2013). Dies weist auf eine konservierte Rolle dieser Gen-Familie bei der Keimzell-Entwicklung, aber auch der weiteren sexuellen Differenzierung hin. Außerdem deutet eine Deregulation der *Rhox*-Gene nach *Tfap2c* Verlust darauf hin, dass einige dieser Gene durch den Transkriptionsfaktor *Tfap2c* während der Keimzell-Entwicklung reguliert werden.

Eine Vielzahl von Genen (*Cdk16*, *Chdh*, *Ceacam10*, *Phf13*, *Immp2l*, *Sept4*, *Spa17* und *Tes*), welche an der Spermatogenese beteiligt sind, zeigen ebenfalls eine Reduktion der Genexpression bei *Tfap2c* Verlust in PGCLCs, was zeigt, dass *Tfap2c* insbesondere bei der Differenzierung der primordialen Keimzellen in Gonozyten eine Rolle zu spielen scheint.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Differenzierung und Spezifizierung von PGCs *in vitro* bei beiden Genotypen (*Tfap2c*^{-/-} und *Tfap2c*^{WT}) stattfindet, jedoch in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs die weitere Differenzierung in Gonozyten gestört ist und in den Keimzellen dagegen ein somatisches Differenzierungsprogramm aktiviert wird. Zudem konnte in dieser Arbeit erstmals die direkte Bindung von *Tfap2c* an die Keimzell-spezifischen Gene *Dmrt1* und *Nanos3* in Keimzell-ähnlichen Zellen gezeigt werden.

4.2 *Tfap2c* reguliert das somatische Differenzierungsprogramm in Keimzellen

In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass in *Tfap2c* defizienten Keimzell-ähnlichen Zellen die mesodermalen Gene *Hoxb1*, *Hoxa1*, *Brachyury* und *Snai1* hochreguliert werden. Deshalb wurde vermutet, dass Keimzellen bei einem *Tfap2c* Verlust die mesodermale Differenzierung initiieren (Weber et al., 2010). Die Ergebnisse des cDNS-Microarrays zeigen, dass nicht nur Gene der mesodermalen Differenzierung in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs hochreguliert werden, sondern auch Gene wie *Cited2*, *Gli2*, *Neurod1*, *Sfrp1* und *Sfrp2*. Dies zeigt, dass *Tfap2c* neben der Repression mesodermaler Marker auch Gene während der Keimzell-Migration

Diskussion

reprimiert, welche an der Neuralrohrentwicklung (*Cobl*, *Epha2*, *Enah*, *Gli2*, *Sfrp1*, *Sfrp2*) und der Neurogenese (*Cited2*, *Chd7*, *Gbx2*, *Hoxb1*, *Lrp2*, *Mcf2*, *Neurod1*, *Zfp423*) beteiligt sind. Das Secreted frizzled-related Protein 1 (*Sfrp1*) konnte als direktes Zielgen von *Tfap2c* identifiziert werden. *Sfrp1* reguliert den BMP-Signalweg im Neuralrohr, welches für den korrekten Neuralrohrschluss und die dorsale Zell-Segregation entscheidend ist (Misra und Matise, 2010).

Ein von Magnúsdóttir et al. 2013 beschriebenes transkriptionelles Netzwerk in Keimzellen zeigt, dass *Blimp1*, *Prdm14* und *Tfap2c* gemeinsam die Spezifizierung der Keimzellen und den Erhalt der Keimzell-Population regulieren. Dabei binden *Blimp1* und *Prdm14* direkt an die Promotorregion von *Tfap2c*. *Blimp1* induziert die initiale *Tfap2c* Genexpression, wohingegen *Prdm14* die Expression anschließend verstärkt. Mittels ChIP-Analyse und anschließender Sequenzierung in der embryonalen Karzinomzelllinie P19, welche *Blimp1*, *Prdm14* und *Tfap2c* überexprimiert, identifizierten sie 1393 direkte Zielgene von *Tfap2c*. Ein Vergleich dieser 1393 Zielgene mit denen in dieser Arbeit ermittelten deregulierten Gene zeigt, dass 159 Gene sowohl direkt in P19 Zellen von *Tfap2c* gebunden werden als auch in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs dereguliert sind. Einige dieser 159 Gene, können der somatischen Differenzierung (*Bcl11a*, *Chd7*, *Gli2*, *Mtap1b*), der Keimzell-Entwicklung (*Dmrt1*, *Hk1*, *Phf13*, *Stella*) und der Pluripotenz (*Fgf4*, *Msi2*, *Tdgf1*) zugeordnet werden. Interessanterweise wirkt *Tfap2c* hierbei nicht nur repressiv auf die Expression von Genen (*Bcl11a*, *Chd7*, *Gli2*, *Mtap1b*, *Fgf4*, *Msi2* und *Tdgf1*) sondern induziert auch die Expression einiger Gene (*Dmrt1*, *Hk1*, *Phf13* und *Stella*). Dies konnte ebenfalls in der P19 Karzinomzelllinie beobachtet werden, dabei zeigte sich, dass *Tfap2c* gemeinsam mit *Blimp1* oder *Prdm14* an regulatorische Regionen binden kann (Magnúsdóttir et al., 2013). Dabei führt eine Ko-Lokalisation von *Tfap2c* und *Blimp1* an regulatorische Regionen überwiegend zu einer Reduktion der Genexpression. Hingegen führt eine gemeinsame Bindung von *Tfap2c* und *Prdm14* vorwiegend zur Induktion der Genexpression, wie es bei den Keimzell-spezifischen Genen *Nanos3* und *Stella* beobachtet werden konnte (Magnúsdóttir et al., 2013).

Die geringe Anzahl von 159 gemeinsamen Genen kann auf den unterschiedlichen experimentellen Vorgehensweisen beruhen, welche als *in vitro* Systeme zur Untersuchung der Keimzell-Entwicklung genutzt wurden. Magnúsdóttir et al. nutzten die embryonale Karzinomzelllinie P19 welche aus Zellen des Epiblasten (E7.5)

generiert wurde und die Eigenschaften von Epiblast-Zellen aufweist und somit nicht in allen Aspekten Keimzellen gleicht.

Das für die mesodermale Differenzierung verantwortliche Gen *Brachyury* konnte nicht als *Tfap2c* reguliertes Gen identifiziert werden. Dies steht im Widerspruch zu früheren Studien von Weber et al. 2010, welche in *Tfap2c*^{-/-}-EBs eine Hochregulation von *Brachyury* nachwiesen. Allerdings zeigen neue Studien, dass *Brachyury* durch den Wnt3/b-Catenin-Signalweg aktiviert wird, welcher wiederum durch BMP4/Smad-Signale aktiviert wird. Während der Embryonalentwicklung konnte gezeigt werden, dass *Brachyury* die Expression von *Blimp1* und *Prdm14* aktiviert und dies zur Spezifizierung der Keimzellen führt (Aramaki et al., 2013). Aufgrund dieser Ergebnisse ist *Brachyury* vor Beginn der *Tfap2c* Expression aktiv und ein Verlust von *Tfap2c* in den in dieser Arbeit generierten PGCLCs zeigt keine Auswirkungen auf die Expression von *Brachyury*.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass *Tfap2c* bei der Repression somatischer Gene und hier insbesondere bei der Repression von mesodermalen Markern und Neurogenese-assoziiierter Gene beteiligt ist.

4.3 Heraufregulation epigenetischer Marker in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs

Während der Migrationsphase (E8.0 – E11.5) der Keimzellen finden extensive globale Demethylierungsprozesse und Histon-Modifikationen statt (Seki et al. 2007). Die globalen Demethylierungsprozesse führen zur Hypomethylierung der DNS und insbesondere zur Demethylierung von Imprinting Genen wie H19. Dies wird zum einen durch Repression der *de novo* DNS-Methyltransferasen *Dnmt3a/b*, *Dnmt3l* und *Uhrf1* etabliert. Zum anderen führt der Verlust von 5mC, welches durch Oxidation der Tet1 – 3 Proteine in 5hmC konvertiert wird ebenfalls zur Demethylierung der DNS (Kato et al. 2007; Bostick et al. 2007; Kurimoto et al. 2008; Hajkova et al. 2002; Yamaguchi et al. 2013). Weiter führt die Reduktion der Genexpression der Histon-Methyltransferasen *G9a* und *GLP* zu einem Verlust der reprimierenden Histon-Modifikationen H3K9me1 und H3K9me2. Hingegen nimmt ab dem Tag E8.25 die H3K27-Trimethylierung zu, welche ebenfalls reprimierend auf die Genexpression wirkt (Saitou et al., 2012).

Der in dieser Arbeit durchgeführte cDNS-Microarray zeigt, dass bei *Tfap2c* Verlust *de novo* Methylasen wie *Dnmt3b* und *Dnmt3l* neben *Uhrf1* und *Tet2* hochreguliert sind.

Diskussion

Zudem konnte eine Expression der Histon-Demethylasen *Kdm6b* und *Jmjd3* in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs nachgewiesen werden, wohingegen die Untereinheit *Phf19* des Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) herunterreguliert ist. Des Weiteren konnten die in dieser Arbeit durchgeführten ChIP-Analysen zeigen, dass eine Bindung von *Tfap2c* an die Promotorregionen von *Dnmt3b* und *Dnmt3l* in PGCLCs erfolgt.

Die hier erbrachten Ergebnisse geben Hinweis darauf, dass *Tfap2c* an der Etablierung der DNS-Demethylierung beteiligt sein könnte. Die Reduktion der Genexpression der *de novo* Methylasen *Dnmt3b*, *Dnmt3l* und von *Uhrf1* und *Tet1* ist essenziell in migrierenden Keimzellen, um eine Hypomethylierung der DNS zu gewährleisten. Interessanterweise, sind auch *Prdm14* und *Blimp1* an der Repression dieser Gene beteiligt. *Prdm14* und *Blimp1* binden und regulieren die epigenetischen Modifikatoren *Kdm6b*, *Dnmt3b* und *Uhrf1* (Magnúsdóttir et al., 2013). Der Prozess der globalen DNS-Demethylierung scheint somit durch *Blimp1* und *Prdm14*, aber auch, wie diese Arbeit zeigt, durch *Tfap2c* etabliert zu werden.

Der Nachweis, dass durch den Verlust von *Tfap2c* eine Hypermethylierung der DNS vorliegt, konnte anhand des untersuchten Beispiels des *H19* Genlokus nicht erbracht werden. In *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs wurde eine Methylierung von 92% der CpGs festgestellt und bei *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs eine 91% CpG-Methylierung. Der in dieser Arbeit untersuchte Zeitpunkt der PGCLC Differenzierung (Tag 4) entspricht aufgrund des ermittelten Genexpressionsmusters dem Entwicklungsstadium von PGCs *in vivo* zu Beginn der ersten Migrationsphase. Die Analysen von Hayashi et al. erfolgten mit PGCLCs, welche über sechs Tage differenziert wurden und zeigen eine 35,2% Methylierung im *H19* Lokus (Hayashi et al., 2011). Dieser ermittelte Verlust der Methylierung im *H19* Lokus, weist auf den Beginn der Löschung des Imprintingmusters hin, welcher in migratorischen und post-migratorischen Keimzellen stattfindet (Verona et al., 2008).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass die Tag 4 PGCLCs den Prozess der Imprinting-Löschung noch nicht initiiert haben. Zur Untersuchung des epigenetischen Status sollten deshalb spätere Differenzierungs-Zeitpunkte und die globale Methylierung der PGCLCs analysiert werden, um Veränderungen zwischen den Genotypen (*Tfap2c*^{WT} und *Tfap2c*^{-/-}) feststellen zu können. Zudem sollten weitere Imprinted-Gene, als auch Gene die eine Deregulation in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs aufweisen, aber nicht direkt über *Tfap2c* reguliert werden, wie z.B. *Eras* untersucht werden.

Diskussion

Nach Erreichen der Genitalfalten wird in den Keimzellen die DNS-Methylierung neu etabliert. Dies geht einher mit der Herunterregulation von *Tfap2c* am Tag E12.5. Die ermittelten Ergebnisse in dieser Arbeit in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs zeigen, dass ein Verlust von *Tfap2c* möglicherweise ein Ausbleiben der DNS-Demethylierung zur Folge hat und dadurch die globale Genexpression dereguliert ist. Dies könnte zur Bildung von entarteten Keimzellen beitragen und wiederum zu Keimzelltumor-Bildung. Zwischen der Methylierung der DNS und der Keimzelltumor-Inzidenz besteht ein Zusammenhang, da der globale Verlust der DNS-Methylierung während der Keimzell-Migration zum Zeitpunkt der kritischen Phase der Keimzelltumor-Bildung stattfindet (Stevens, 1967). Interessanterweise, konnten verschiedene Studien eine Expression von *DNMT3A* und *DNMT3B* in humanen embryonalen Karzinomen nachweisen (Almstrup et al., 2005; Biermann et al., 2007; Skotheim et al., 2005), was die Hypothese bestärkt, dass es zum Ausbleiben einer Herunterregulation epigenetischer Regulatoren nach *Tfap2c* Verlust in Keimzellen kommt und dies zur Keimzelltumor-Bildung führen kann.

Darüber hinaus sollten Untersuchungen bezüglich der Histon-Modifikationen durchgeführt werden, da die Histon-Demethylasen *Kdm6b* und *Jmjd1c* in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs dereguliert sind. *Kdm6b* kodiert eine H3K27 Demethylase (Agger et al. 2007). Die beiden H3K27 und H3K9 repressiven Histon-Modifikationen sind zu Beginn der Migration nicht methyliert, genauer wird H3K9 demethyliert und H3K27 erst im Verlauf der Migration trimethyliert (Saitou et al., 2012). Des Weiteren ist die PRC2 Untereinheit *Phf19* an der Trimethylierung von H3K27 beteiligt (Ballaré et al., 2012). Möglicherweise, sind diese Faktoren an der Etablierung der Histon-Modifikationen in migrierenden Keimzellen beteiligt und deren Expression könnte dabei durch *Tfap2c* reguliert werden, da bei *Tfap2c* Verlust diese Faktoren dereguliert sind. In *Tfap2c*^{WT} PGCs wäre es möglich, dass *Tfap2c* einerseits die Expression der *Kdm6b* Histon-Demethylase hemmt, aber andererseits die Expression der PRC2 Untereinheit *Phf19* aktiviert und dadurch eine Trimethylierung von H3K27 in migrierenden Keimzellen etabliert werden kann.

4.4 *Tfap2c* reguliert die Pluripotenz in Keimzellen

Im Verlauf der Embryonalentwicklung wird in den Keimzellen während der Migration das Pluripotenz-Netzwerk wiederhergestellt.

Diskussion

Die Ergebnisse des in dieser Arbeit durchgeführten cDNS-Microarrays zeigen bei einem Verlust der *Tfap2c* Expression in PGCLCs eine Hochregulation der Pluripotenz-assoziierten Gene *Eras*, *Fgf4*, *Foxd3*, *Gbx2*, *Jam2*, *Klf4*, *Msi2*, *Nr0b1* und *Tdgf1*. *Fgf4*, *Jam2* und *Klf4* konnten dabei als direkte Zielgene von *Tfap2c* identifiziert werden.

Das ES-Zellen spezifische Ras-ähnliche Gen *Eras* konnte mit der Bildung von Teratomen in ES-Zellen in Zusammenhang gebracht werden (Takahashi et al., 2003). Einige der heraufregulierten Pluripotenz-assoziierten Gene in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs, sind Oct3/4 abhängige Gene: *Jam2*, *Klf4*, *Foxd3*, *Nr0b1* und *Tdgf1* (Sharov et al., 2008). Eine Hochregulation von Pluripotenz-assoziierten Markern ist ein Charakteristikum der Vorläuferzellen muriner Keimzelltumore (Western et al., 2008). Eine erhöhte Expression von *Fgf4* konnte unter anderem in Keimzelltumoren nachgewiesen werden (Kosaka et al., 2009). Die hier ermittelte Heraufregulation von Pluripotenz-assoziierten Markern nach Verlust von *Tfap2c* in PGCLCs, könnte eine Entartung der Keimzellen und Bildung von Keimzelltumoren zur Folge haben.

Weiter konnte gezeigt werden, dass *Fgf4* während der Migrations-Phase nicht von den Keimzellen selbst, sondern von umliegenden Zellen exprimiert wird und erst nach Besiedelung der Gonaden die *Fgf4* Expression in den Keimzellen einsetzt. Die Gruppe um Kawase et al. vermutet, dass FGF Signale an der Proliferation der Keimzellen während und nach der Kolonisierung der Gonaden beteiligt sind (Kawase et al., 2004). Eine heraufregulierte *Fgf4* Expression während der Migration in den Keimzellen könnte die erhöhte Proliferationsrate erklären, welche in den *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs beobachtet wurde (siehe Kapitel 4.6).

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte lediglich *Prdm14* als Regulator für die Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der Pluripotenz in Keimzellen identifiziert werden (Nakaki et al., 2013; Yamaji et al., 2008). Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen, dass auch *Tfap2c* an diesem Prozess beteiligt sein könnte, da in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs eine Heraufregulation Pluripotenz-assoziiierter Gene gezeigt werden konnte. *Tfap2c* scheint dabei aber nicht wie *Prdm14* ein Hauptregulator zu sein, sondern vielmehr die Funktion von *Prdm14* zu unterstützen und die Expressionslevel einiger Pluripotenz-assoziiierter Gene zu kontrollieren.

4.5 Rolle von *Tfap2c* bei der Transkriptions-Elongation

Wie zuvor beschrieben, findet während der Keimzell-Migration ein Verlust repressiver Histon-Modifikationen statt. In den Keimzellen wird dieser Verlust durch Kontrolle der RNS-Polymerase II abhängigen Elongation während der Transkription kompensiert (Seki et al., 2007).

Im Verlauf der Elongation kommt es zur Hyperphosphorylierung der Serin-Reste 2 (Ser2), 5 (Ser5) und 7 (Ser7) der Carboxyterminalen-Domäne (CTD) der RNS-Polymerase II (Saunders et al. 2006).

Die Phosphorylierung von Ser5 und Ser7 der CTD erfolgt durch Cdk7 und P-TEFb und initiiert den Elongationprozess. Hingegen wird die Phosphorylierung von Ser2 durch Cdk8, Cdk12 und Cdk13 etabliert (Ghamari et al. 2013; Heidemann et al. 2013, Jeronimo et al. 2013). Diese Phosphorylierung ist für die Fortführung der Elongation essenziell (Saunders et al. 2006). In migrierenden Keimzellen kann an Tag E8.75 eine verminderte Phosphorylierung der Ser2- und Ser5-Reste nachgewiesen werden, welches in einer verringerten Transkriptionsaktivität resultiert (Seki et al., 2007). Die in dieser Arbeit untersuchten Faktoren, welche an der Kontrolle der RNS-Polymerase II abhängigen Elongation beteiligt sind, zeigen eine Deregulation bei Verlust von *Tfap2c* auf. Die Cyclin-abhängigen Kinasen *Cdk7*, *Cdk8*, *Cdk12* und *Cdk13*, und die Cycline *Ccnt1* und *Ccnt2* sind bei *Tfap2c* Verlust heraufreguliert. *Cdk9* bildet hier eine Ausnahme, da es herunterreguliert ist. Die Expression von *Cdk7/ 8/ 12/ 13* führt zur Phosphorylierung der Serin-Reste (Ser2/ 5/ 7). Interessanterweise ist die Expression von *Hexim1* und *Hexim2* in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs herunterreguliert. Die Hexime bilden mit P-TEFb (Cdk9/Ccnt1/2) einen Komplex und stellen gemeinsam mit den 7SK Small Nuclear Ribonucleoproteinen (7SK snRNP) einen Inhibitor für P-TEFb dar. Dies resultiert in einem Abbruch der Transkriptions-Elongation (Czudnochowski et al., 2010; Okamura et al., 2012). Okamura et al. haben gezeigt, dass die 7SK snRNPs in Keimzellen an der Regulation der G1/S-Phasen Transition beteiligt sind (Okamura et al., 2012).

Aufgrund der Beobachtungen in dieser Arbeit bezüglich der globalen Genexpression in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs wird vermutet, dass bei Verlust von *Tfap2c* die Keimzellen keinen Transkriptions-Abbruch während der Elongationsphase eingehen und somit den Verlust der repressiven Histon-Modifikationen und die damit zusammenhängende induzierte Genexpression nicht kompensieren können.

Diskussion

Vermutlich findet im Gegensatz zu den *Tfap2c*^{WT} Keimzellen eine Phosphorylierung der Serin-Reste (Ser 2, 5 und 7) durch die CDKs statt und es erfolgt die Aktivierung und Fortführung der Elongation (Abbildung 38).

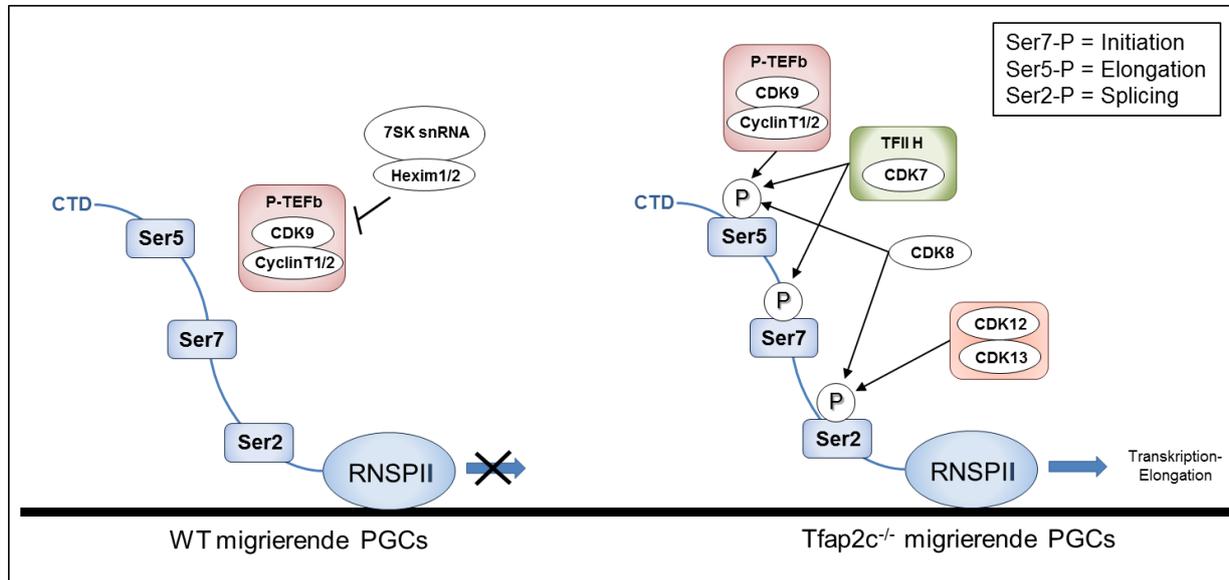


Abbildung 38: Modell der Kontrolle der Transkriptions-Elongation durch *Tfap2c* in Keimzellen. Während der Migration ist in den Keimzellen die RNS-Polymerase II (RNSPII) inaktiv, da die Carboxyterminale-Domäne (CTD) an den Serin-Resten 5 (Ser5), 7 (Ser7) und 2 (Ser2) dephosphoryliert vorliegt. Durch Inhibierung des positive Transcription Elongation Factor (P-TEFb) -Komplexes durch die 7SK snRNAs/HEXIM1/2 wird die Phosphorylierung von Ser5 gehemmt. In *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs zeigt sich eine Heraufregulation einiger Cyclin abhängiger Kinasen (CDKs) und Cyclinen (T1/2) welche für die Phosphorylierung aller Serin-Reste verantwortlich sind und somit die RNS-Polymerase II aktivieren, was schließlich zur Transkriptions-Elongation führt.

Allerdings konnte in dieser Arbeit durch immunhistochemische-Färbung der PGCLCs kein Nachweis erbracht werden, dass eine Phosphorylierung von Ser5 und Ser2 in den *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs im Gegensatz zu den *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs stattfindet (Kapitel 3.15). Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob bei *Tfap2c* Verlust eine Phosphorylierung der Serin-Reste erfolgt, sollten anstelle von Immunhistochemischen-Färbungen Western-Blot Analysen durchgeführt werden. Außerdem wäre eine Analyse von Ser7 interessant, da durch dessen Phosphorylierung die Elongation initiiert wird.

Die Ergebnisse von Okamura et al. zeigen außerdem, dass die Kontrolle der RNS-Polymerase II keinen Einfluss auf Keimzell-spezifische Gene wie *Stella* und *Blimp1* hat, hingegen aber auf Gene des Zellzyklus (Okamura et al., 2012). Eine Deregulation von Genen, die an dem Elongations-Prozess beteiligt sind, kann somit ebenfalls zu Störungen im Zellzyklus führen.

Interessanterweise konnten Magnúsdóttir et al. zeigen, dass Blimp1 an regulatorische Regionen von 2364 Genen bindet, welche ebenfalls durch eine Untereinheit von NELF (NELFA) gebunden werden (Magnúsdóttir et al., 2013). NELF und der Faktor DSIF (DRB Sensitivity Inducing Factor) blockieren die Elongation, indem sie einen Komplex mit der RNS-Polymerase II eingehen. P-TEFb phosphoryliert NELF und DSIF, und inaktiviert diese dadurch (Fuda et al., 2009). Möglicherweise könnte Blimp1 hierbei die Phosphorylierung von NELF und die damit verbundene Inaktivierung dieses Faktors verhindern. Hierdurch würde es zur Blockierung der Transkriptions-Elongation kommen und in einer Repression der Genexpression resultieren. Dies könnte zur Erklärung beitragen, wie es zur Repression der Genexpression, insbesondere somatischer Gene, in migrierenden Keimzellen kommt (Seki et al., 2007).

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse den Transkriptionsfaktor *Tfap2c* betreffend und die von Magnúsdóttir et al. beschriebenen Ergebnisse für Blimp1, geben erste Hinweise darauf, dass diese beiden Regulatoren an der Etablierung des Transkriptions-Abbruchs während der Migration beteiligt sein könnten.

4.6 Der Verlust von *Tfap2c* in Keimzell-ähnlichen Zellen führt zur Deregulation des Zellzyklus

Eine weitere wichtige Eigenschaft, welche die Keimzellen während der Migration besitzen, ist der G2-Arrest und die resultierende verminderte Zellproliferation (Seki et al., 2007).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich von den *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs im Vergleich zu den *Tfap2c*^{WT}-PGCLCs weniger Zellen im G2-Arrest befinden (Kapitel 3.13). Außerdem befindet sich eine größere Anzahl von *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs in der S-Phase des Zellzyklus. Bei Verlust von *Tfap2c* werden Zellzyklus-Kontrollgene wie *Ccnd1*, *Cdk6*, *Cdk7*, *Fez1*, *p21*, und *Plk2* hochreguliert, wohingegen *Gadd45b* und *Rgcc* herunterreguliert sind (Abbildung 39). Die Gene *Cdk7*, *Fez1*, *Gadd45b* und *Rgcc* sind bei der Kontrolle der Transition von der G2-Phase in die M-Phase involviert. *Gadd45b* und *Rgcc* fördern dabei den G2-Arrest (Saigusa et al., 2007; Zhan et al., 1999), wohingegen *Cdk7* und *Fez1* die für die G2/M-Phasen wichtige Cyclin-abhängige Kinase Cdk1 und das Cyclin Ccnb1 aktivieren (Badea et al., 2002). Möglicherweise könnte der beobachtete Verlust von Zellen in der G2-Phase bei den

Diskussion

Tfap2c^{-/-}-PGCLCs das Resultat der Deregulation dieser G2/M-Phasen essenziellen Gene sein.

Des Weiteren konnten bei *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs mehr Zellen in der S-Phase beobachtet werden. Diese Phase des Zellzyklus wird von den Cyclin abhängigen Kinasen Cdk4, Cdk6 und dem Cyclin *Ccnd1* reguliert (Sherr, 1993). Neben *Cdk6* und *Ccnd1* ist in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs auch die Expression der Serin-Threoninkinasen *Plk2* induziert. *Plk2* wird während der früheren G1-Phase exprimiert und fördert den Eintritt in die darauffolgende S-Phase (Ma et al., 2003). Während der G1-Phase des Zellzyklus sind *Plk2*, *Cdk6* und *Ccnd1* hochreguliert und die Progression am Kontrollpunkt zur S-Phase findet statt, was in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs beobachtet werden konnte.

Ccnd1 wird in den Gonozyten und Spermatogonien exprimiert und ab dem Tag E16.5 herunterreguliert. Eine fortgesetzte *Ccnd1* Expression konnte mit einer erhöhten Teratom-Wahrscheinlichkeit in Verbindung gebracht werden (Heaney et al., 2012).

In *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs ist *p21* induziert und konnte neben *Cdk6* in dieser Arbeit als direktes Zielgen von *Tfap2c* in PGCLCs identifiziert werden. *p21* inhibiert während des Zellzyklus die Aktivität der CDKs und hemmt den Zellzyklus. Durch die Inhibitor of DNA binding Proteine (ID-Proteine) 1 und 3 kann die Expression von CDK-Inhibitoren, zu denen *p21*, *p15* usw. gehören, reprimiert werden, was in einer erhöhten Proliferation resultiert (Sharma et al., 2012). Dies konnte in einer Reihe von Tumoren nachgewiesen werden, in denen eine erhöhte Expression von *Id1*, *Id2* und *Id3* beobachtet werden konnte (Ruzinova und Benezra, 2003). Hingegen resultiert eine Reduktion der *Id1* und *Id2* Expression in einem Arrest in der G2/M-Phase des Zellzyklus und führt zur Apoptose der Zellen (Di et al., 2006; Spivakov und Fisher, 2007) (Abbildung 39).

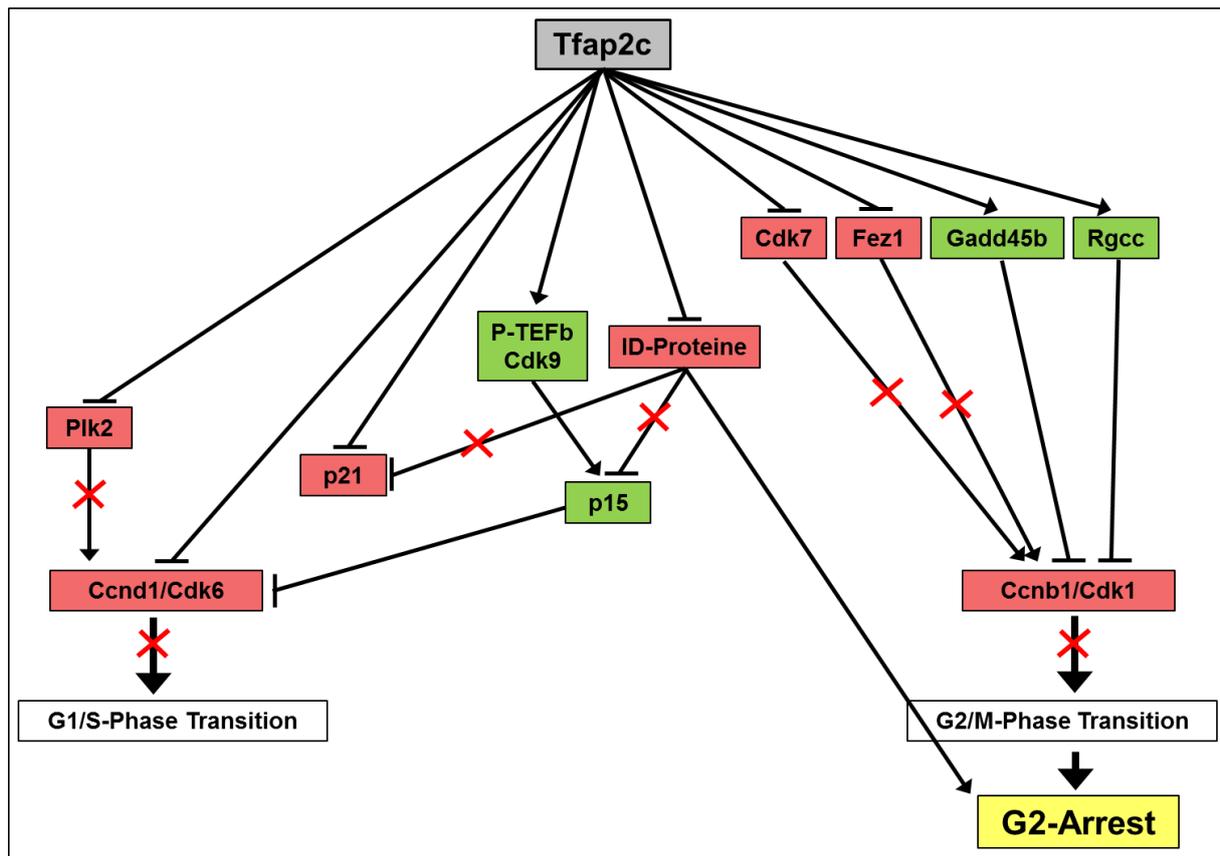


Abbildung 39: Modell zur Kontrolle des Zellzyklus durch Tfp2c in Keimzellen. Tfp2c wirkt sowohl aktivierend (grüne Kästen) als auch inhibierend (rote Kästen) auf die Genexpression einiger Gene. Die mit roten Kreuzen markierten Signalwege entfallen durch die Tfp2c-Regulation. Tfp2c kontrolliert die G1/S-Phasen und G2/M-Phasen Transition über die Expression verschiedener Faktoren, die an diesen Phasen beteiligt sind. Da keine Transition von der G2- zur M-Phase stattfindet, gehen die Keimzellen in den G2-Arrest.

Die Regulation von *p21* durch Tfp2c wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zum einen wurde gezeigt, dass Tfp2c einerseits die *p21* Expression in der Brustkrebs-Zelllinie MCF7 hemmt und andererseits in einer anderen Brustkrebs-Zelllinie MDA MB-231 die Expression aktiviert (Li et al., 2006; Williams et al., 2009b). Die hier erbrachten Ergebnisse bestärken eine inhibitorische Rolle von Tfp2c bei der *p21* Expression. Außerdem wurde beschrieben, dass *p21* nicht nur am Zellzyklus beteiligt ist, sondern auch als Regulator bei der p53-abhängigen und p53-unabhängigen Apoptose (Helt und Rancourt, 2001; Javelaud et al., 2000). Dies könnte eine Erklärung für das Ausbleiben der Apoptose bei migrierenden Keimzellen sein, welches von Weber et al. *in vivo* in *Tfp2c*^{-/-}-PGCs untersucht wurde. Ein Verlust von *Tfp2c* könnte dabei durch Induktion von *p21* in einer verringerten Apoptose der Keimzellen resultieren, welche hingegen eine Heraufregulation somatischer Marker aufweisen, was in somatischer Differenzierung der Keimzellen resultiert.

Diskussion

Die Cyclin-abhängige Kinase Cdk9, welche in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs herunterreguliert ist könnte ebenfalls bei der Kontrolle des Zellzyklus mitwirken. Okamura et al. zeigten, dass in murinen post-migratorischen (E 12.5) PGCs der Faktor P-TEFb, welcher Cdk9 als Untereinheit besitzt, herabreguliert ist. Dies führt zur Inhibierung des Cdk-Inhibitors p15, welcher die Transition von der G1- zur S-Phase inhibiert.

Die in dieser Arbeit untersuchten PGCLCs entsprechen migrierenden PGCs, welche eine niedrige Proliferationsrate aufweisen. Da eine Herunterregulation von *Cdk9* bei *Tfap2c* Verlust beobachtet werden konnte, könnte dies darauf hinweisen, dass in WT PGCLCs *Tfap2c* für die Aktivierung von *Cdk9* verantwortlich ist. Dies führt dann zur Aktivierung des Cdk-Inhibitors *p15* und wiederum zu einer verminderten Proliferation, welche in migrierenden Keimzellen beobachtet werden kann (Abbildung 39).

Die Abbildung 39 zeigt basierend auf den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen die hypothetische Regulation des Zellzyklus durch *Tfap2c* in Keimzellen. *Tfap2c* ist dabei sowohl an der Etablierung des G2-Arrestes, als auch an einer verminderten Proliferation durch Kontrolle der Transition von der G1- zur S-Phase, beteiligt.

4.7 TCam-2-Zellen zeigen Deregulation Keimzell-spezifischer Marker nach TFAP2C-Knockdown

Aufgrund ethischer und experimenteller Probleme bei der Untersuchung humaner Keimzellen wäre ein geeignetes *in vitro* Zellsystem hilfreich, um molekularbiologische Untersuchungen betreffend der Keimzellentwicklung durchführen zu können. Auf diese Weise könnte ebenso die Konservierung verschiedener Genfunktionen zwischen den verschiedenen Spezies (Maus und Mensch) untersucht werden.

Die Keimzelltumorzelllinie TCam-2 wurde als ein passendes humanes *in vitro* Zellmodell beschrieben, um Prozesse bei der Entwicklung der Keimzellen untersuchen zu können. Diese Zelllinie entstammt einem Seminom, das sich aus einem Carcinoma in situ (CIS) bildet, welches während der Migration aus einer entarteten PGC entsteht. TCam-2-Zellen weisen typische Keimzell-Charakteristika auf, wie die Expression Keimzell-spezifischer Marker und Pluripotenz-Marker (Eckert et al. 2008, de Jong et al. 2008). Des Weiteren findet man in TCam-2-Zellen die charakteristische symmetrische Dimethylierung von Arginin 3 der Histone H2A und H4, welche durch den Blimp1/Prmt5-Komplex etabliert werden (Ancelin et al., 2006). Aufgrund dieser Merkmale können TCam-2-Zellen als humanes *in vitro* System für

Diskussion

die Untersuchung der Keimzellbiologie und der Keimzelltumorentstehung herangezogen werden.

Eine Auswahl deregulierter Gene in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs wurde in TCam-2-Zellen mittels qRT-PCR nach si/shRNS vermitteltem TFAP2C-Knockdown analysiert. Keimzell-spezifische Marker wie *c-KIT* und *DMRT1* sind in TCam-2-Zellen nach erfolgreichem TFAP2C-Knockdown herunterreguliert. Des Weiteren ist die Genexpression des Pluripotenz-Markers *SOX2*, der epigenetischen Regulatoren *DNMT3B*, *DNMT3L* und *TET2* und des Homeobox Gens *HOXA5* nach si/shRNS vermitteltem TFAP2C-Knockdown induziert. Außerdem konnte auch bei den Zellzyklus-Markern *p21*, *p53*, *CCND1*, *ID1* und *ID2* eine Heraufregulation der Genexpression beobachtet werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen, welche bei den *in vitro* differenzierten PGCLCs gemacht worden sind. Allerdings stehen sie im Widerspruch zu Beobachtungen von Nettersheim et al., die bei einem siRNS-basierten Knockdown von *TFAP2C* keine Heraufregulation von *SOX2*, *DNMT3B* und *DNMT3L* zeigen konnten. Statt dessen wurde hier eine Expressionsreduktion von *DNMT3L* nach TFAP2C-Knockdown gefunden (Nettersheim et al., 2011). Eine Erklärung für diese gegensätzlichen Ergebnisse könnte darin liegen, dass in dieser Arbeit die qRT-PCR-Analysen 72 h nach erfolgter siRNS-Transfektion durchgeführt wurden, hingegen bei Nettersheim et al. die Experimente schon 48 h nach Transfektion erfolgten. Dieser Zeitraum könnte zu einer leichten Heraufregulation der Genexpression von *SOX2*, *DNMT3L* und *DNMT3B* ausreichen, welche hier beobachtet werden konnte.

Entgegen der Beobachtungen in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs zeigen die Gene *STELLAR* und *GADD45B* eine Expressionsinduktion in TCam-2-Zellen nach TFAP2C-Knockdown. Interessanterweise sind einige der hochregulierten Gene (*GADD45B*, *ID1*, *ID2*, *p21*) in die Zellzyklus-Regulation involviert und hier speziell in die Etablierung eines G2-Arrests (Taylor und Stark, 2001; Vairapandi et al., 2002; Wang et al., 1999). Dies deutet darauf hin, dass TFAP2C eine Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus spielt, diese aber in den verschiedenen Zellsystemen (murine PGCLCS und humane Seminomzelllinie) unterschiedlich ist, da *Tfap2c* den G2-Arrest in murinen PGCLCs fördert, während in den TCam-2-Zellen TFAP2C diese Gene reprimiert.

Des Weiteren wurden typische Seminom- und embryonale Karzinom-Marker in TCam-2-Zellen nach TFAP2C-Knockdown mit Hilfe qRT-PCR analysiert (Kapitel 3.17). Dabei konnte eine Heraufregulation der *OCT3/4* und der *SOX2* Expression in

Diskussion

den TFAP2C shRNS-Ansätzen nachgewiesen werden. Pluripotenz-Marker wie NANOG, OCT3/4 und SOX2 bilden ein regulatorisches Netzwerk, welches für den Erhalt der Pluripotenz und der Selbsterneuerung in ES-Zellen und anderen pluripotenten, undifferenzierten Zellen verantwortlich ist (Pan und Thomson, 2007). In klassischen Seminomen wird SOX17 anstelle von SOX2 exprimiert, wohingegen eine SOX2 Expression in embryonalen Karzinomen beobachtet werden kann, hier aber keine Expression von SOX17 (de Jong et al., 2008; Nonaka, 2009). Innerhalb des untersuchten Zeitraums konnte in den TCam-2-Zellen eine SOX2 Induktion ermittelt werden und eine Reduktion der SOX17 Expression. Die Induktion der Pluripotenz-Marker OCT3/4 und SOX2 könnte eine Kompensationsreaktion der Zellen sein, um der Differenzierung der TCam-2-Zellen durch den Verlust von TFAP2C entgegen zu wirken und die Pluripotenz der Zellen zu erhalten.

Die *de novo* Methyltransferase DNMT3B und das Methyltransferase-ähnliche Enzym DNMT3L, welches mit DNMT3A und DNMT3B interagiert und deren Aktivität fördert (Gowher et al., 2005), zeigen eine Expressionsinduktion nach siRNS vermitteltem TFAP2C-Knockdown (Kapitel 3.16), ähnlich wie in PGCLCs. TFAP2C besitzt demzufolge eine konservierte Funktion bei der Repression von *de novo* Methyltransferasen. In Seminom-Zellen liegt die DNS unmethyliert (hypomethyliert) vor, während in embryonalen Karzinom-Zellen die DNS hypermethyliert ist (Netto et al., 2008). Eine Ausnahme stellt die Seminomzelllinie TCam-2 dar, da sie teilweise eine Methylierung der DNS aufweist. Vermutlich führt der Verlust von TFAP2C in TCam-2 Zellen zur Heraufregulation der *de novo* Methyltransferasen, was in einer Hypermethylierung der DNS resultieren könnte. Dies wäre dann mit dem Methylierungsstatus embryonaler Karzinom-Zellen vergleichbar.

Zudem wurde die Expression der Spermatogenese- und Keimzell- assoziierten Gene *PRAME* und *c-KIT* untersucht, welche nach TFAP2C-Knockdown herunterreguliert sind. Dies deutet darauf hin, dass TCam-2 Zellen bei TFAP2C Verlust die Expression von Keimzell-spezifischen Markern herunterregulieren, ähnlich wie es in den *Tfap2^{-/-}*-PGCLCs beobachtet werden konnte.

Des Weiteren konnte während der Etablierung des shRNS-vermittelten Knockdowns ein hohes Zellsterben beobachtet werden. Möglicherweise führt die Reduktion der TFAP2C Expression zur Induktion apoptotischer Prozesse in TCam-2-Zellen.

Ein Teil der im cDNS-Microarray deregulierten Gene in *Tfap2c^{-/-}*-PGCLCs konnten in den TCam-2-Zellen validiert werden. Diese Ergebnisse bestätigen eine konservierte

Funktion von TFAP2C/ Tfp2c während der Keimzell-Entwicklung im Menschen und der Maus. Diese Experimente verdeutlichen erstmals, dass durch einen stabilen TFAP2C-Knockdown von 86% in der Seminomzelllinie TCam-2, die Zellen embryonale Karzinom-Marker heraufregulieren. Dies deutet darauf hin, dass durch Reduktion der *TFAP2C* Expression in TCam-2-Zellen eine Transition in embryonale Karzinom-ähnliche Zellen stattfinden könnte.

4.8 Tumorbildung in *Tfp2c* heterozygoten Mäusen

Murine Keimzelltumore haben ihren Ursprung in Embryonal Carcinoma Cells (ECC), die bereits 1967 von Pierce et al. beschrieben wurden (Pierce et al., 1967). Diese ECCs ähneln morphologisch undifferenzierten Keimzellen und die Genexpression der ECCs an Tag E16.5 entspricht dem von undifferenzierten Keimzellen. Pluripotenz-assoziierte Marker sind in diesen Zellen induziert, wohingegen die Expression von Markern differenzierter Keimzellen runterreguliert ist. Zudem proliferieren ECCs, wohingegen bei normaler Keimzell-Entwicklung die Keimzellen sich an Tag E18.5 im mitotischen Arrest befinden (Western et al., 2008).

Die ermittelten Ergebnisse sowohl in den PGCLCs als auch in TCam-2-Zellen zeigen, dass *Tfp2c*/TFAP2C bei der Zellzyklus-Kontrolle, bei der Repression von Pluripotenz-Faktoren und der Aufrechterhaltung der Keimzell-Entwicklung involviert ist. Eine Untersuchung von *Tfp2c* (*Tfp2c*^{+/-}) heterozygoten Mäusen im genetischen 129S2/Sv Hintergrund ergab, dass 82% der Männchen testikuläre Teratome ausbildeten, wobei 35% der Tumore bilateral ausgeprägt waren (Dissertation Sabine Schäfer; Schemmer et al, 2013). Des Weiteren konnten in den *Tfp2c*^{+/-}-Hoden Zellfoci gezeigt werden, die positiv für die Pluripotenz-Marker *Ssea-1*, *Sox2*, *Nanog* und *Oct3/4*, jedoch negativ für den Keimzell-Marker *c-Kit* waren. Außerdem zeigte sich eine Induktion der Expression des Zellzyklus-Regulators *p21* in *Tfp2c*^{+/-}-Hoden. Diese Zellfoci konnten aufgrund dieser Ergebnisse als Vorläuferzellen von Keimzelltumoren des Typ I identifiziert werden (Dissertation Sabine Schäfer; Schemmer et al. 2013).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass durch Reduktion der *Tfp2c* Expression in der Keimbahn männliche Mäuse testikuläre Teratome ausbilden, welche aufgrund ihrer Eigenschaften humanen frühkindlichen Keimzelltumoren des Typ I entsprechen. Dies bestärkt die Hypothese, dass es bei einer Reduktion der

Tfap2c Expression zu Störungen in der Keimzell-Entwicklung kommt und dies zur Bildung von Keimzell-Tumoren führen kann. Dabei handelt es sich betreffend der *Tfap2c* Expression um einen Dosis-abhängigen Effekt, da in homozygoten Tieren weder Keimzellen noch Keimzelltumore nachgewiesen werden konnten (Weber et al., 2010). Das bei Schemmer et al. beschriebene Mausmodell kann demnach zur Untersuchung der Rolle von *Tfap2c* zur Entwicklung des Keimzelltumortyps I herangezogen werden.

4.9 Tumorbildung in *Nanos3*- und *Dmrt1*- defizienten Mausmodellen

Die Transkriptionsfaktoren *Nanos3* und *Dmrt1* wurden als direkte Zielgene von *Tfap2c* in PGCLCs identifiziert und die qRT-PCR-Analyse zeigte eine Expressionsreduktion beider Gene in *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs. Eine Untersuchung von *Nanos3*^{+/-}-Mäusen zeigte eine Teratom-Bildung bei 45% der männlichen Mäuse, wobei 5% bilaterale Tumore aufwiesen (Schemmer et al., 2013). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Teratom-Bildung durch Verlust von *Tfap2c* im genetischen 129S2/Sv Hintergrund zum Teil über den Verlust des *Tfap2c* Zielgenes *Nanos3* vermittelt wird. Dabei ist festzuhalten, dass die Tumorinzidenz bei *Nanos3*^{+/-}-Mäusen um 37% geringer ist als bei den *Tfap2c*^{+/-}-Mäusen. Dies spricht dafür, dass noch weitere *Tfap2c* Zielgene an der Bildung der Teratome beteiligt sind.

Eines dieser *Tfap2c* Zielgene ist *Dmrt1*. Auch hier konnte sowohl bei hetero- als auch bei homozygoten *Dmrt1* Mäusen eine Teratom-Bildung beobachtet werden (Krentz et al., 2009). Außerdem beobachteten Krentz et al. in einer kürzlich publizierten Studie keine Bildung von Teratomen in heterozygoten *Nanos3* Mäusen (Krentz et al., 2013). Dies steht im Widerspruch zu unseren Beobachtungen, da wir eine 45% Teratom-Bildung nachweisen konnten (Schemmer et al., 2013). Ein Grund hierfür könnte sein, dass Krentz et al. die Tiere nicht ausreichend in den 129Sv genetischen Hintergrund zurück gekreuzt haben. Ferner haben sie 129S6/Sv:129S1/Sv Mäuse benutzt, wohingegen bei unseren Studien stattdessen 129S2/Sv-Mäuse verwendet wurden. Stammspezifische Unterschiede in der Tumoranfälligkeit könnten hierbei einen Einfluss auf die experimentellen Ergebnisse gehabt haben. Interessanterweise fanden Krentz et al. aber, dass durch Einkreuzen einer *Nanos3* Haploinsuffizienz die Tumorwahrscheinlichkeit in *Dmrt1*^{-/-} Mäusen erhöht wird (Krentz et al., 2013).

Diese Ergebnisse zeigen, dass *Tfap2c* Heterozygotie in Mäusen zur Ausbildung von Keimzelltumoren führt und dass auch eine Haploinsuffizienz der direkten *Tfap2c* Zielgene *Dmrt1* und *Nanos3* in der Bildung von Teratome resultiert (Schemmer et al., 2013).

4.10 Modell zur Rolle von *Tfap2c* in der Keimzell-Entwicklung

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse weisen auf eine Rolle von *Tfap2c* bei dem Erhalt der Keimzell-Population hin. Dabei scheint *Tfap2c* alle Aspekte der Keimzell-Entwicklung zu regulieren, statt wie zuvor angenommen, lediglich die mesodermale Differenzierung zu reprimieren (Weber et al., 2010).

In beiden benutzten *in vitro* Systemen (PGCLCs und TCam-2-Zellen) führte der Verlust von *Tfap2c* zu einer Induktion somatischer Marker, Pluripotenz-assoziiierter Gene, epigenetischer Regulatoren und Zellzyklus-Gene. Dagegen wiesen wichtige Keimzell-spezifische Marker durch den Verlust von *Tfap2c* eine Expressionsreduktion auf.

Es konnte keine Veränderung in der Expression von *Blimp1* und *Prdm14*, der Schlüsselregulatoren der Keimzell-Spezifizierung, ermittelt werden. *Tfap2c* scheint in der komplexen, genetischen Regulation der Keimzell-Entwicklung mit beiden Faktoren zu interagieren und sowohl eine repressive als auch induzierende Funktion auszuüben. Weitere Studien weisen darauf hin, dass *Tfap2c* zusammen mit *Blimp1* größtenteils reprimierend auf die Genexpression wirkt, dagegen eine Ko-Lokalisation von *Tfap2c* und *Prdm14* die Genexpression induziert (Magnúsdóttir et al., 2013). Vermutlich wirkt *Tfap2c* in diesem regulatorischen Netzwerk verstärkend sowohl bei der Repression als auch bei der Induktion von Genen durch *Blimp1* oder *Prdm14* (Abbildung 40).

Zusätzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass heterozygote Mäuse für *Tfap2c* und *Nanos3* eine erhöhte Keimzelltumor-Inzidenz aufweisen (Schemmer et al., 2013). Dies geht einher mit dem Ausbleiben der Repression von Pluripotenz-Genen und mit Induktion von Proliferations-Markern am Ende der Keimzell-Migration. Dies entspricht Beobachtungen von Pierce et al. 1967, die zeigten, dass Vorläuferläsionen von Keimzelltumoren eine fortgesetzte Proliferation und Expression von Pluripotenz-Genen aufweisen und daher in der Lage sind in alle drei Keimblätter zu differenzieren.

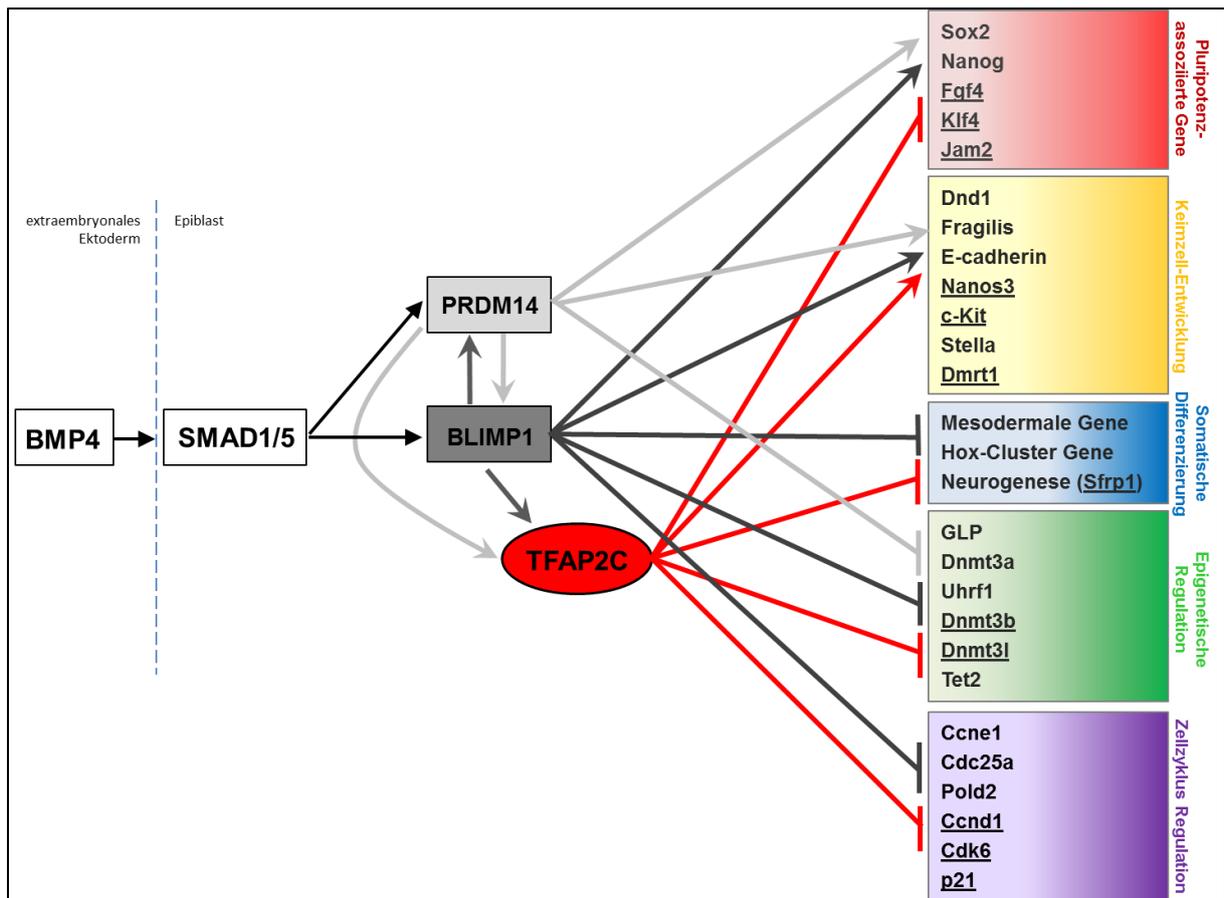


Abbildung 40: Modell zur Rolle von Tfp2c in der Keimzell-Entwicklung. BMP4 Signale induzieren ab dem Tag E6.25 über SMAD1/5 Moleküle die Expression von *Blimp1* und *Prdm14*. Dies führt zur Keimzell-Spezifizierung. Der Erhalt der Keimzell-Population wird durch die gemeinsame Regulation der drei Faktoren *Prdm14* (grau), *Blimp1* (dunkelgrau) und *Tfp2c* etabliert. Pfeile weisen auf die Aktivierung von Genen hin, während Balken auf eine Repression hinweisen. Die roten Pfeile/Balken zeigen die Rolle von *Tfp2c* bei der Keimzell-Entwicklung. Unterstrichende Gene weisen auf eine direkte Bindung durch *Tfp2c* hin.

5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse zur Rolle von *Tfap2c* während der Entwicklung muriner, primordialer Keimzellen gewonnen. Dazu wurden mit Hilfe eines *in vitro* Differenzierungsprotokolls PGCLCs generiert. Des Weiteren wurde die Seminomzelllinie TCam-2 als Keimzell-Modell zur Validierung und Überprüfung der konservierten Rolle von *Tfap2c* in der Keimzell-Entwicklung verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass *Tfap2c* nicht nur an der Blockierung der somatischen Differenzierung, sondern an allen für die Keimzell-Entwicklung essenziellen Aspekten mitwirkt. Hierzu zählen die Regulation von Pluripotenz-assoziierten Genen, die Regulation der Epigenetik und des Zellzyklus und die Expression Keimzell-spezifischer Marker. Dies dient der Aufrechterhaltung des Keimzell-Schicksals.

Aufgrund der Tatsache, dass die Ergebnisse in *in vitro* differenzierten Keimzell-ähnlichen Zellen gewonnen wurden, ist es weiter notwendig diese Ergebnisse durch *in vivo* Experimente zu bestätigen. Es sollten Untersuchungen einzelner PGCs zwischen dem Tag E7.25 und E8.0 durchgeführt werden, um von Beginn der *Tfap2c* Expression bis zum Verlust der PGCs Untersuchungen vornehmen zu können. Hierzu sollten die in dieser Arbeit verwendeten *Blimp1mVenus/Tfap2c^{flox/flox}* Mäuse mit einer geeigneten Cre-Mauslinie verpaart werden. Die *Blimp1mVenus* Reporter Mauslinie weist eine Keimzell-spezifische Expression auf und könnte zur Isolation einzelner Keimzellen genutzt werden. Diese sollten dann in Hinblick auf die molekularbiologischen Regulationen *in vivo* untersucht werden.

Des Weiteren konnten in dieser Arbeit 11 Promotorregionen, welche direkt von *Tfap2c* gebunden werden, in PGCLCs identifiziert werden. Um weitere Einblicke in das regulatorische Netzwerk von *Tfap2c* zu bekommen, sollten weitere direkte Zielgene von *Tfap2c* in Keimzellen identifiziert werden. Zudem sollte die Expression der hier ermittelten deregulierten Gene in PGCLCs und auch in TCam-2 Zellen auf Proteinebene untersucht werden, um auch hier einen Unterschied und Auswirkungen bei Protein-Verlust untersuchen zu können.

6 Literaturverzeichnis

Almstrup, K., Hoei-Hansen, C.E., Nielsen, J.E., Wirkner, U., Ansorge, W., Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., and Leffers, H. (2005). Genome-wide gene expression profiling of testicular carcinoma in situ progression into overt tumours. *Br. J. Cancer* 92, 1934–1941.

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, 623–630.

Aramaki, S., Hayashi, K., Kurimoto, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Kato, Y., Shirahige, K., et al. (2013). A Mesodermal Factor, T, Specifies Mouse Germ Cell Fate by Directly Activating Germline Determinants. *Dev. Cell* 27, 516–529.

Ashburner, M., Ball, C., Blake, J., and Botstein, D. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. ...* 25, 25–29.

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. *Dev. Cambridge Engl.* 129, 2733–2747.

Badea, T., Niculescu, F., Soane, L., Fosbrink, M., Sorana, H., Rus, V., Shin, M.L., and Rus, H. (2002). RGC-32 increases p34CDC2 kinase activity and entry of aortic smooth muscle cells into S-phase. *J. Biol. Chem.* 277, 502–508.

Ballaré, C., Lange, M., Lapinaite, A., Martin, G.M., Morey, L., Pascual, G., Liefke, R., Simon, B., Shi, Y., Gozani, O., et al. (2012). Phf19 links methylated Lys36 of histone H3 to regulation of Polycomb activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1257–1265.

Barrios, F., Irie, N., and Surani, M.A. (2013). Perceiving signals, building networks, reprogramming germ cell fate. *Int. J. Dev. Biol.* 57, 123–132.

Biermann, K., Heukamp, L.C., Steger, K., Zhou, H., Franke, F.E., Sonnack, V., Brehm, R., Berg, J., Bastian, P.J., Muller, S.C., et al. (2007). Genome-wide expression profiling reveals new insights into pathogenesis and progression of testicular germ cell tumors. *Cancer Genomics Proteomics* 4, 359–367.

Boldajipour, B., Mahabaleswar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q., and Raz, E. (2008). Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 132, 463–473.

Bowles, J., and Koopman, P. (2010). Sex determination in mammalian germ cells: extrinsic versus intrinsic factors. *Reprod. Cambridge Engl.* 139, 943–958.

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, 342–352.

Carouge, D., and Nadeau, J.H. (2005). Mouse Models of Testicular Germ Cell Tumors.

Chang, H., and Matzuk, M.M. (2001). Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mech. Dev.* 104, 61–67.

Literaturverzeichnis

- Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Décimo, D., Chambon, P., and Dollé, 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, 83–94.
- Chu, G.C., Dunn, N.R., Anderson, D.C., Oxburgh, L., and Robertson, E.J. (2004). Differential requirements for Smad4 in TGFbeta-dependent patterning of the early mouse embryo. *Development* 131, 3501–3512.
- Czudnochowski, N., Vollmuth, F., Baumann, S., Vogel-Bachmayr, K., and Geyer, M. (2010). Specificity of Hexim1 and Hexim2 complex formation with cyclin T1/T2, importin alpha and 7SK snRNA. *J. Mol. Biol.* 395, 28–41.
- Depue, R.H., Pike, M.C., and Henderson, B.E. (1983). Estrogen exposure during gestation and risk of testicular cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 71, 1151–1155.
- Di, K., Ling, M.-T., Tsao, S.W., Wong, Y.C., and Wang, X. (2006). Id-1 modulates senescence and TGF-beta1 sensitivity in prostate epithelial cells. *Biol. Cell* 98, 523–533.
- Dieckmann, K.-P., and Pichlmeier, U. (2004). Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World J. Urol.* 22, 2–14.
- Ding, J., Jiang, D., Kurczy, M., Nalepka, J., Dudley, B., Merkel, E.I., Porter, F.D., Ewing, A.G., Winograd, N., Burgess, J., et al. (2008). Inhibition of HMG CoA reductase reveals an unexpected role for cholesterol during PGC migration in the mouse. *BMC Dev. Biol.* 8, 120.
- Dudley, B., Palumbo, C., Nalepka, J., and Molyneaux, K. (2010). BMP signaling controls formation of a primordial germ cell niche within the early genital ridges. *Dev. Biol.* 343, 84–93.
- Eckert, D., Buhl, S., Weber, S., Jäger, R., and Schorle, H. (2005). The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol.* 6, 246.
- Eckert, D., Nettersheim, D., Heukamp, L.C., Kitazawa, S., Biermann, K., and Schorle, H. (2008a). TCam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture. *Cell Tissue Res.* 331, 529–538.
- Eckert, D., Biermann, K., Nettersheim, D., Gillis, A.J., Steger, K., Jäck, H.-M., Müller, A.M., Looijenga, L.H., and Schorle, H. (2008b). 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.
- Enders, G.C., and May, J.J. (1994). Developmentally Regulated Expression of a Mouse Germ Cell Nuclear Antigen Examined from Embryonic Day 11 to Adult in Male and Female Mice. *Dev. Biol.* 163, 331–340.
- Ewen, K. a, and Koopman, P. (2010). Mouse germ cell development: from specification to sex determination. *Mol. Cell. Endocrinol.* 323, 76–93.
- 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, 572–583.
- De Felici, M. (2009). Primordial germ cell biology at the beginning of the XXI century. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 891–894.

Literaturverzeichnis

- Feng, W., and Williams, T. (2003). Cloning and characterization of the mouse AP-2 ϵ gene: a novel family member expressed in the developing olfactory bulb. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 460–475.
- Feng, C.-W., Bowles, J., and Koopman, P. (2013). Control of mammalian germ cell entry into meiosis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1–10.
- Fox, M.H. (1980). A Model for the Computer Analysis of Synchronous DNA Distributions Obtained by Flow Cytometry. *1*, 71–77.
- 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*, 391–398.
- Fuda, N.J., Ardehali, M.B., and Lis, J.T. (2009). Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature* *461*, 186–192.
- Gaubatz, S., Imhof, a, Dosch, R., Werner, O., Mitchell, P., Buettner, R., and Eilers, M. (1995). Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *EMBO J.* *14*, 1508–1519.
- Gee, J.M., Robertson, J.F., Ellis, I.O., Nicholson, R.I., and Hurst, H.C. (1999). Immunohistochemical analysis reveals a tumour suppressor-like role for the transcription factor AP-2 in invasive breast cancer. *J. Pathol.* *189*, 514–520.
- 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. *427*.
- Ghamari, A., van de Corput, M.P.C., Thongjuea, S., van Cappellen, W. a, van Ijcken, W., van Haren, J., Soler, E., Eick, D., Lenhard, B., and Grosveld, F.G. (2013). In vivo live imaging of RNA polymerase II transcription factories in primary cells. *Genes Dev.* *27*, 767–777.
- Gilbert, D., Rapley, E., and Shipley, J. (2011). Testicular germ cell tumours: predisposition genes and the male germ cell niche. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 278–288.
- Gilbert, D.C., Chandler, I., McIntyre, A., Goddard, N.C., Gabe, R., Huddart, R.A., and Shipley, J. (2009). Clinical and biological significance of CXCL12 and CXCR4 expression in adult testes and germ cell tumours of adults and adolescents. *94–102*.
- Ginsburg, M., Snow, M.H., and McLaren, a (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Dev. Cambridge Engl.* *110*, 521–528.
- Giwerzman, A., and Giwerzman, Y.L. (2011). Environmental factors and testicular function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *25*, 391–402.
- Gowher, H., Liebert, K., Hermann, A., Xu, G., and Jeltsch, A. (2005). Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J. Biol. Chem.* *280*, 13341–13348.
- Grabole, N., Tischler, J., Hackett, J. a, Kim, S., Tang, F., Leitch, H.G., Magnúsdóttir, E., and Surani, M.A. (2013). Prdm14 promotes germline fate and naive pluripotency by repressing FGF signalling and DNA methylation. *EMBO Rep.* *14*, 629–637.

- Gu, Y., Runyan, C., Shoemaker, A., Surani, A., and Wylie, C. (2009). Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Development* 136, 1295–1303.
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., and Surani, M.A. (2002). Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.* 117, 15–23.
- Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* 146, 519–532.
- Heaney, J.D., Anderson, E.L., Michelson, M. V, Zechel, J.L., Conrad, P. a, Page, D.C., and Nadeau, J.H. (2012). Germ cell pluripotency, premature differentiation and susceptibility to testicular teratomas in mice. *Development* 139, 1577–1586.
- Heidemann, M., Hintermair, C., Voß, K., and Eick, D. (2013). Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 55–62.
- Helt, C., and Rancourt, R. (2001). p53-dependent induction of p21Cip1/WAF1/Sdi1 protects against oxygen-induced toxicity. *Toxicol. ...* 222, 214–222.
- Heyting, C., Dettmers, R.J., Dietrich, A.J., Redeker, E.J., and Vink, A.C. (1988). Two major components of synaptonemal complexes are specific for meiotic prophase nuclei. *Chromosoma* 96, 325–332.
- 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, 8521–8530.
- Huang, S., Jean, D., Luca, M., Tainsky, M. a, and Bar-Eli, M. (1998). Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *EMBO J.* 17, 4358–4369.
- Hübner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L.K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strauss, J.F., Boiani, M., and Schöler, H.R. (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* (80-). 300, 1251–1256.
- Huyghe, E., Matsuda, T., and Thonneau, P. (2003). Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J. Urol.* 170, 5–11.
- Irizarry, R. a, Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249–264.
- Javelaud, D., Wietzerbin, J., Delattre, O., and Besanc, È. (2000). Induction of p21 Waf1/Cip1 by TNFa requires NF-kB activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. *Oncogene* 1, 61–68.
- De Jong, J., Stoop, H., Gillis, A.J.M., van Gurp, R.J.H.L.M., van de Geijn, G.-J.M., Boer, M. de, Hersmus, R., Saunders, P.T.K., Anderson, R.A., Oosterhuis, J.W., et al. (2008).

Literaturverzeichnis

Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications. *J. Pathol.* 215, 21–30.

Kaatsch, P. (2004). [German Childhood Cancer Registry and its favorable setting]. *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz* 47, 437–443.

Kidder, B.L., and Palmer, S. (2010). Examination of transcriptional networks reveals an important role for TCFAP2C, SMARCA4, and EOMES in trophoblast stem cell maintenance. *Genome Res.* 20, 458–472.

Kosaka, N., Sakamoto, H., Terada, M., and Ochiya, T. (2009). Pleiotropic function of FGF-4: its role in development and stem cells. *Dev. Dyn.* 238, 265–276.

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, 2474–2479.

Krentz, A.D., Murphy, M.W., Kim, S., Cook, M.S., Capel, B., Zhu, R., Matin, A., Sarver, A.L., Parker, K.L., Griswold, M.D., et al. (2009). The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 22323–22328.

Krentz, A.D., Murphy, M.W., Zhang, T., Sarver, A.L., Jain, S., Griswold, M.D., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2013). Interaction between DMRT1 function and genetic background modulates signaling and pluripotency to control tumor susceptibility in the fetal germ line. *Dev. Biol.* 1–13.

Kuckenberger, P., Buhl, S., Woynecki, T., Van Fürden, B., Tolkunova, E., Seiffe, F., Moser, M., Tomilin, A., Winterhager, E., and Schorle, H. (2010). The transcription factor TCFAP2C/AP-2gamma cooperates with CDX2 to maintain trophectoderm formation. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3310–3320.

Kunath, T., Saba-El-Leil, M.K., Almousailleakh, M., Wray, J., Meloche, S., and Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* 134, 2895–2902.

Kurimoto, K., Yamaji, M., Seki, Y., and Saitou, M. (2008a). Specification of the germ cell lineage in mice. *Cell Cycle* 7, 3514–3518.

Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Shigeta, M., Yamanaka, K., and Saitou, M. (2008b). Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev.* 22, 1617–1635.

Lawson, K. a, Dunn, N.R., Roelen, B. a J., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V.E., Korving, J.P.W.F.M., and Hogan, B.L.M. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* 13, 424–436.

Li, H., Goswami, P.C., and Domann, F.E. (2006). AP-2γ Induces p21 Expression, Arrests Cell Cycle, and Inhibits the Tumor Growth of Human Carcinoma Cells¹. *Neoplasia New York* 8, 568–577.

Looijenga, L.H., and Oosterhuis, J.W. (1999). Pathogenesis of testicular germ cell tumours. *Rev. Reprod.* 4, 90–100.

Literaturverzeichnis

Loots, G.G., and Ovcharenko, I. (2004). rVISTA 2.0: evolutionary analysis of transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res.* 32, W217–21.

Ma, S., Charron, J., and Erikson, R.L. (2003). Role of Plk2 (Snk) in Mouse Development and Cell Proliferation. 23, 6936–6943.

MacLean, J. a, and Wilkinson, M.F. (2010). The RhoX genes. *Reproduction* 140, 195–213.

Magnúsdóttir, E., Dietmann, S., Murakami, K., Günesdogan, U., Tang, F., Bao, S., Diamanti, E., Lao, K., Gottgens, B., and Azim Surani, M. (2013). A tripartite transcription factor network regulates primordial germ cell specification in mice. *Nat. Cell Biol.* 15, 905–915.

Matson, C.K., Murphy, M.W., Griswold, M.D., Yoshida, S., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2010). The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells. *Dev. Cell* 19, 612–624.

Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B.L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70, 841–847.

McPherson, L. a, and Weigel, R.J. (1999). AP2alpha and AP2gamma: a comparison of binding site specificity and trans-activation of the estrogen receptor promoter and single site promoter constructs. *Nucleic Acids Res.* 27, 4040–4049.

Misra, K., and Matisse, M.P. (2010). A critical role for sFRP proteins in maintaining caudal neural tube closure in mice via inhibition of BMP signaling. *Dev. Biol.* 337, 74–83.

Mitchell, P.J., Wang, C., and Tjian, R. (1987). Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* 50, 847–861.

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)]. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi.* 84, 1211–1218.

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, 2760–2769.

Molyneaux, K. a. (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* 130, 4279–4286.

Moser, M., Imhof, a, Pscherer, a, Bauer, R., Amselgruber, W., Sinowatz, F., Hofstädter, F., Schüle, R., and Buettner, R. (1995). Cloning and characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 beta. *Development* 121, 2779–2788.

Moser, M., Pscherer, a., Roth, C., Becker, J., Mucher, G., Zerres, K., Dixkens, C., Weis, J., Guay-Woodford, L., Buettner, R., et al. (1997). Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta. *Genes Dev.* 11, 1938–1948.

Nakaki, F., Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Yabuta, Y., and Saitou, M. (2013). Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. *Nature* 1–7.

Naumann, U., Cameroni, E., Pruenster, M., Mahabaleshwar, H., Raz, E., Zerwes, H.-G., Rot, A., and Thelen, M. (2010). CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One* 5, e9175.

Nayernia, K., Nolte, J., Michelmann, H.W., Lee, J.H., Rathsack, K., Drusenheimer, N., Dev, A., Wulf, G., Ehrmann, I.E., Elliott, D.J., et al. (2006). In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev. Cell* 11, 125–132.

Nettersheim, D., Gillis, A., Biermann, K., Looijenga, L.H.J., and Schorle, H. (2011). The Seminoma Cell Line TCam-2 is Sensitive to HDAC Inhibitor Depsipeptide but Tolerates Various Other Chemotherapeutic Drugs and Loss of NANOG Expression. *1042*, 1033–1042.

Nettersheim, D., Haas, N., Leinhaas, A., Bru, O., Schlatt, S., and Schorle, H. (2012). Establishment of a Versatile Seminoma Model Indicates Cellular Plasticity of Germ Cell Tumor Cells. *000*, 1–10.

Netto, G.J., Nakai, Y., Nakayama, M., Jadallah, S., Toubaji, A., Nonomura, N., Albadine, R., Hicks, J.L., Epstein, J.I., Yegnasubramanian, S., et al. (2008). Global DNA hypomethylation in intratubular germ cell neoplasia and seminoma, but not in nonseminomatous male germ cell tumors. *Mod. Pathol.* 21, 1337–1344.

Nichols, J., and Smith, A. (2009). Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4, 487–492.

Nonaka, D. (2009). Differential expression of SOX2 and SOX17 in testicular germ cell tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* 131, 731–736.

Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S.C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., et al. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436, 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. *Reprod. Cambridge Engl.* 136, 503–514.

Okamura, D., Maeda, I., Taniguchi, H., Tokitake, Y., Ikeda, M., Ozato, K., Mise, N., Abe, K., Noce, T., Izpisua Belmonte, J.C., et al. (2012). Cell cycle gene-specific control of transcription has a critical role in proliferation of primordial germ cells. *Genes Dev.* 26, 2477–2482.

Oosterhuis, J.W., and Looijenga, L.H.J. (2005). Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat. Rev. Cancer* 5, 210–222.

Oulad-abdelghani, M., Bouillet, P., Dcimo, D., Gansmuller, A., and Heyberger, S. (1996). Characterization of a Premeiotic Germ Cell-specific Cytoplasmic Protein Encoded by Stra8 , a Novel Retinoic Acid-responsive Gene DNA Library Screening and Sequencing. *135*, 469–477.

Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Chazaud, C., Dollé, 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, 338–347.

Pan, G., and Thomson, J. a (2007). Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 17, 42–49.

Literaturverzeichnis

- Pauls, K., Jäger, R., Weber, S., Wardelmann, E., Koch, A., Büttner, R., and Schorle, H. (2005). Transcription factor AP-2gamma, a novel marker of gonocytes and seminomatous germ cell tumors. *Int. J. Cancer J. Int. Du Cancer* 115, 470–477.
- Payer, B., Chuva De Sousa Lopes, S.M., Barton, S.C., Lee, C., Saitou, M., and Surani, M.A. (2006). Generation of stella-GFP transgenic mice: a novel tool to study germ cell development. *Genes. New York NY 2000* 44, 75–83.
- Pierce, G.B., Stevens, L.C., and Nakane, P.K. (1967). Ultrastructural Analysis of the Early Development of Teratocarcinomas. *J. Natl. Cancer Inst. Vol.39*, 755–773.
- Pittman, D.L., Cobb, J., Schimenti, K.J., Wilson, L.A., Cooper, D.M., Brignull, E., Handel, M.A., and Schimenti, J.C. (1998). Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol. Cell* 1, 697–705.
- Rajender, S., Avery, K., and Agarwal, A. (2011). Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutat. Res.* 727, 62–71.
- 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, 85–92.
- Richardson, B.E., and Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 37–49.
- Rosenberg, C., Van Gurp, R.J., Geelen, E., Oosterhuis, J.W., and Looijenga, L.H. (2000). Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas. *Oncogene* 19, 5858–5862.
- 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, 4861–4869.
- Ruzinova, M.B., and Benezra, R. (2003). Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol.* 13, 410–418.
- Saigusa, K., Imoto, I., Tanikawa, C., Aoyagi, M., Ohno, K., Nakamura, Y., and Inazawa, J. (2007). RGC32, a novel p53-inducible gene, is located on centrosomes during mitosis and results in G2/M arrest. *Oncogene* 26, 1110–1121.
- Saitou, M., and Yamaji, M. (2010). Germ cell specification in mice: signaling, transcription regulation, and epigenetic consequences. *Reprod. Cambridge Engl.* 139, 931–942.
- Saitou, M., Barton, S.C., and Surani, M.A. (2002). A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418, 293–300.
- Saitou, M., Payer, B., Carroll, D.O., Ohinata, Y., and Surani, M.A. (2005). Blimp1 and the Emergence of the Germ Line during Development Perspective ND ACKNOWLEDGEMENTS KEY WORDS RIB. 1736–1740.
- Saitou, M., Kagiwada, S., and Kurimoto, K. (2012). Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development* 139, 15–31.

Sato, M., Kimura, T., Kurokawa, K., Fujita, Y., Abe, K., Masuhara, M., Yasunaga, T., Ryo, A., Yamamoto, M., and Nakano, T. (2002). Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. *Mech. Dev.* 113, 91–94.

Saunders, A., Core, L.J., and Lis, J.T. (2006). Breaking barriers to transcription elongation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 557–567.

Saunders, P.T.K., Turner, J.M. a, Ruggiu, M., Taggart, M., Burgoyne, P.S., Elliott, D., and Cooke, H.J. (2003). Absence of mDazl produces a final block on germ cell development at meiosis. *Reproduction* 126, 589–597.

Schäfer, S., Anschlag, J., Nettersheim, D., Haas, N., Pawig, L., and Schorle, H. (2011). The role of BLIMP1 and its putative downstream target TFAP2C in germ cell development and germ cell tumours. *Int. J. Androl.* 34, e152–e158; discussion e158–e159.

Schemmer, J., Araúzo-Bravo, M.J., Haas, N., Schäfer, S., Weber, S.N., Becker, A., Eckert, D., Zimmer, A., Nettersheim, D., and Schorle, H. (2013). Transcription Factor TFAP2C Regulates Major Programs Required for Murine Fetal Germ Cell Maintenance and Haploinsufficiency Predisposes to Teratomas in Male Mice. *PLoS One* 8, e71113.

Schneider, D.T., Schuster, A.E., Fritsch, M.K., Pediatric, N., Cell, G., Hu, J., Olson, T., Lauer, S., and Go, U. (2001). Multipoint Imprinting Analysis Indicates a Common Precursor Cell for Gonadal and Nongonadal Pediatric Germ Cell Tumors Multipoint Imprinting Analysis Indicates a Common Precursor Cell for Gonadal. 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, 235–238.

Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., and Matsui, Y. (2005). Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev. Biol.* 278, 440–458.

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, 2627–2638.

Sharma, P., Patel, D., and Chaudhary, J. (2012). Id1 and Id3 expression is associated with increasing grade of prostate cancer: Id3 preferentially regulates CDKN1B. *Cancer Med.* 1, 187–197.

Sharov, A. a, Masui, S., Sharova, L. V, Piao, Y., Aiba, K., Matoba, R., Xin, L., Niwa, H., and Ko, M.S.H. (2008). Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. *BMC Genomics* 9, 269.

Skotheim, R.I., Lind, G.E., Monni, O., Nesland, J.M., Abeler, V.M., Fosså, S.D., Duale, N., Brunborg, G., Kallioniemi, O., Andrews, P.W., et al. (2005). Differentiation of human embryonal carcinomas in vitro and in vivo reveals expression profiles relevant to normal development. *Cancer Res.* 65, 5588–5598.

Song, H.W., Anderson, R. a, Bayne, R. a, Gromoll, J., Shimasaki, S., Chang, R.J., Parast, M.M., Laurent, L.C., de Rooij, D.G., Hsieh, T.C., et al. (2013). The RHOX homeobox gene

Literaturverzeichnis

- cluster is selectively expressed in human oocytes and male germ cells. *Hum. Reprod.* 0, 1–12.
- Spivakov, M., and Fisher, A.G. (2007). Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat. Rev. Genet.* 8, 263–271.
- Stavridis, M.P., Lunn, J.S., Collins, B.J., and Storey, K.G. (2007). A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification. *Development* 134, 2889–2894.
- Stevens, L. (1967). Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 549–552.
- Su, R.-W., Jia, B., Ni, H., Lei, W., Yue, S.-L., Feng, X.-H., Deng, W.-B., Liu, J.-L., Zhao, Z.-A., Wang, T.-S., et al. (2012). Assembly of the Tight Junction molecule 2 mediates the interaction between hatched blastocyst and luminal epithelium: induction by progesterone and LIF. *PLoS One* 7, e34325.
- Surani, M. a (2001). Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414, 122–128.
- Suyama, E., Minoshima, H., Kawasaki, H., and Taira, K. (2002). Identification of AP-2-regulated genes by macroarray profiling of gene expression in human A375P melanoma. *Nucleic Acids Res. Suppl.* 1, 247–248.
- 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, 133–142.
- Takahashi, K., Mitsui, K., and Yamanaka, S. (2003). Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. 423, 541–545.
- 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.
- Taylor, W.R., and Stark, G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803–1815.
- 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, 139–149.
- 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, 11457–11462.
- 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, 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, 1239–1241.

Literaturverzeichnis

Ueno, Tsunoda, H., Anno, I., and Ishikawa, S. (2004). Spectrum of Germ Cell Tumors : From Head to Toe 1 OBJECTIVES. 387–404.

Vairapandi, M., Balliet, A.G., Hoffman, B., and Liebermann, D. a (2002). GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J. Cell. Physiol.* 192, 327–338.

Verona, R.I., Thorvaldsen, J.L., Reese, K.J., and Bartolomei, M.S. (2008). The transcriptional status but not the imprinting control region determines allele-specific histone modifications at the imprinted H19 locus. *Mol. Cell. Biol.* 28, 71–82.

Wajapeyee, N., Britto, R., Ravishankar, H.M., and Somasundaram, K. (2006). Apoptosis induction by activator protein 2alpha involves transcriptional repression of Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 281, 16207–16219.

Wang, D. (1997). Transcription Factor AP-2 Controls Transcription of the Human Transforming Growth Factor-alpha Gene. *J. Biol. Chem.* 272, 14244–14250.

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, 128–135.

Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M. a, Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, a J., and Harris, C.C. (1999). GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3706–3711.

Weber, S., Eckert, D., Nettersheim, D., Gillis, A.J.M., Schäfer, S., Kuckenberger, P., Ehlermann, J., Werling, U., Biermann, K., Looijenga, L.H.J., et al. (2010). Critical function of AP-2 gamma/TCFAP2C in mouse embryonic germ cell maintenance. *Biol. Reprod.* 82, 214–223.

Werling, U., and Schorle, H. (2002a). Transcription Factor Gene AP-2γ Essential for Early Murine Development. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3149–3156.

Werling, U., and Schorle, H. (2002b). Conditional inactivation of transcription factor AP-2gamma by using the Cre/loxP recombination system. *Genesis* 32, 127–129.

Western, P.S., Miles, D.C., van den Bergen, J. a, Burton, M., and Sinclair, A.H. (2008). Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. *Stem Cells* 26, 339–347.

Williams, T., and Tjian, R. (1991). Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev.* 5, 670–682.

Williams, C.M.J., Scibetta, A.G., Friedrich, J.K., Canosa, M., Berlato, C., Moss, C.H., and Hurst, H.C. (2009a). AP-2gamma promotes proliferation in breast tumour cells by direct repression of the CDKN1A gene. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* 28, 3591–3601.

Williams, C.M.J., Scibetta, A.G., Friedrich, J.K., Canosa, M., Berlato, C., Moss, C.H., and Hurst, H.C. (2009b). AP-2gamma promotes proliferation in breast tumour cells by direct repression of the CDKN1A gene. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* 28, 3591–3601.

Williams, T., Admon, a, Luscher, B., and Tjian, R. (1988). Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev.* 2, 1557–1569.

Literaturverzeichnis

- Winger, Q., Huang, J., Auman, H.J., Lewandoski, M., and Williams, T. (2006). Analysis of transcription factor AP-2 expression and function during mouse preimplantation development. *Biol. Reprod.* **75**, 324–333.
- Woodfield, G.W., Chen, Y., Bair, T.B., Domann, F.E., and Weigel, R.J. (2010). Identification of primary gene targets of TFAP2C in hormone responsive breast carcinoma cells. *Genes Chromosom. Cancer* **49**, 948–962.
- Wu, H., and Zhang, Y. (2011). Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev.* **25**, 2436–2452.
- Yabuta, Y., Kurimoto, K., Ohinata, Y., Seki, Y., and Saitou, M. (2006). Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol. Reprod.* **75**, 705–716.
- Yamaguchi, S., Hong, K., Liu, R., Inoue, A., Shen, L., Zhang, K., and Zhang, Y. (2013). Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming. *Cell Res.* **23**, 329–339.
- 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**, 1016–1022.
- Ying, Y., and Zhao, G.Q. (2001). Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev. Biol.* **232**, 484–492.
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519–523.
- 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**, 1053–1063.
- Young, J.C., Dias, V.L., and Loveland, K.L. (2010). Defining the window of germline genesis in vitro from murine embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* **82**, 390–401.
- 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., et al. (2005). The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. *Nature* **435**, 360–364.
- Yun, K., Mantani, A., Garel, S., Rubenstein, J., and Israel, M. a (2004). Id4 regulates neural progenitor proliferation and differentiation in vivo. *Development* **131**, 5441–5448.
- Zhan, Q., Antinore, M.J., Wang, X.W., Carrier, F., Smith, M.L., Harris, C.C., and Fornace, a J. (1999). Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* **18**, 2892–2900.
- Zhao, F., Lufkin, T., and Gelb, B.D. (2003). Expression of Tfap2d, the gene encoding the transcription factor Ap-2δ, during mouse embryogenesis. *Gene Expr. Patterns* **3**, 213–217.
- 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., et al. (2009). PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits

Literaturverzeichnis

DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 304–311.

Lebenslauf

7 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name, Vorname Jana Nastasia Schemmer, geb. Anschlag

AUSBILDUNG

1990-1994 Cordula Grundschule, Borken

1994-2000 Nünning-Realschule, Borken

2000-2004 Gymnasium Remigianum, Borken

HOCHSCHULBILDUNG

Okt. 2004 – Sep. 2007 Bachelorstudium: *Biologie der Zellen* an der Universität Osnabrück

Bachelorarbeit: „Die Auswirkung der Überexpression des Rezeptors Frazzled und seines Liganden Netrin auf die Entwicklung des dorsalen Mesoderms in *Drosophila melanogaster*“ betreut durch Prof. Dr. Achim Paululat
Abschluss: Bachelor of Science (Note 2,2)

Okt. 2007 – Sep. 2009 Masterstudium: *Biologie der Zellen* an der Universität Osnabrück

Studienschwerpunkte: Genetik und Entwicklungsbiologie
Masterarbeit: „Molekulare und phänotypische Charakterisierung der Mutante Lonely heart (PMM2-182) in *Drosophila melanogaster*“ betreut durch Prof. Dr. Achim Paululat
Abschluss: Master of Science (Note 1,3)

Jan. 2010 – heute Promotionsarbeit an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn in der Abteilung Entwicklungs-pathologie
Promotionsfach: Molekulare Biomedizin

Lebenslauf

Promotionsthema „Die Regulation des genetischen und epigenetischen Netzwerkes während der murinen Keimzell-Entwicklung durch den Transkriptionsfaktor Tcfap2c“
betreut durch Herrn Prof. Dr. Hubert Schorle

WISSENSCHAFTLICHE VORTRÄGE

September 2011 EURON / THEME Meeting, Bad Honnef
„Tcfap2c target genes in mouse primordial germ cells”

WISSENSCHAFTLICHE PRÄSENTATIONEN

Oktober 2010 1st THEME Graduiertenschulen Symposium, Bad Honnef
„The role of AP-2 γ in the transcriptional network of PGCs”,
Oktober 2010 7th Workshop on CIS -Testis and Germ Cell Cancer,
Kopenhagen
“Tcfap2c target genes in germ cells and germ cell tumors”
Februar 2011 Semester - Meeting Bonner Forum Biomedizin, Bonn
“Tcfap2c target genes in mouse primordial germ cells”
Juli 2011 5th Mildred Scheel Cancer Conference, Königswinter
“Tcfap2c target genes in germ cells and germ cell tumors”
Oktober 2012 3rd THEME Graduiertenschulen Symposium, Bad Honnef
„Tcfap2c target genes in mouse primordial germ cells”
Oktober 2012 EMBO / EMBL Symposium Germline: Immortality through
Totipotency
„Tcfap2c target genes in murine primordial germ cells”
April 2013 7th International Meeting Stem Cell Network NRW, Köln
„Tcfap2c target genes in mouse primordial germ cells”
Oktober 2013 4st THEME Graduiertenschulen Symposium, Bad Honnef
„Tcfap2c – crucial regulator of the (epi)genetic network in
mouse PGCs”
Dezember 2013 5. DVR Kongress, Münster
„Tcfap2c–regulates major programs of germ cell
development and haploinsufficiency predisposes to
teratomas in male mice “

Lebenslauf

WISSENSCHAFTLICHE PREISE

Oktober 2013 4th Retreat of the International Graduate School THEME,
Bad Honnef
Preis für das Poster mit dem Titel: „Tfap2c – crucial
regulator of the (epi)genetic network in mouse primordial
germ cells”

PUBLIKATIONEN

“The role of BLIMP1 and its putative downstream target TFAP2C in germ cell
development and germ cell tumours”

S.Schäfer, J.Anschlag, D.Nettersheim, N.Haas, L.Pawig and H.Schorle; International
Journal of Andrology, 2011: 1–8

“Transcription Factor TFAP2C Regulates Major Programs Required for Murine Fetal
Germ Cell Maintenance and Haploinsufficiency Predisposes to Teratomas in Male
Mice“

J.Schemmer, M. J. Araúzo-Bravo, N.Haas, S.Schäfer, S.Weber, A.Becker, D.Eckert,
A.Zimmer, D.Nettersheim, H.Schorle; PLoS ONE 2013 8(8)

BETRUUNG VON PRAKTIKA/ ABSCHLUSSARBEITEN

SS 2008 & SS 2009	Planung und Betreuung des Studentenpraktikums <i>Entwicklungsbiologie</i> (Abteilung Zoologie der Universität Osnabrück)
WS 2011/12 & 2012/13	Betreuung des Studentenpraktikums <i>Entwicklungs- und Tumorphathologie</i> (Abteilung Entwicklungs pathologie der Universität Bonn)
SS 2010	Laborpraktikum Lana Awad
WS 2010/11	Masterarbeit Betreuung Lukas Pawig
2011-2012	Diplomarbeit Betreuung Anna Werning
WS 2012/13	Masterarbeit Betreuung Eva Riechert
WS 2012/13	Laborpraktikum Dhruva Deshpande
WS 2012/13	Laborpraktikum Pia Sommerkamp
SS 2013	Laborpraktikum Rebecca Brinkschulte

8 Anhang

Vergleich der *Tfap2c*^{-/-}-PGCLCs und den PGC "Core-Genes" in BP14A-PGCLCs (Nakaki et al. 2013)

Gen	Fold-Change in Log2
Rhox6	-6,11
Rhox9	-5,59
BC048679	-5,16
Chdh	-4,8
Stella	-4,27
Pygl	-3,62
Gpr126	-3,6
Rgcc	-3,22
Kctd15	-3,2
Mbp	-3,17
Urgcp	-3,17
Slc7a9	-3,1
Ceacam10	-2,98
Rgs16	-2,86
Hey1	-2,85
Car12	-2,59
Gng12	-2,47
Sox15	-2,44
Spnb3	-2,43
Efcab10	-2,39
Ln timer	-2,24
Npnt	-2,23
Gjb3	-2,18
Phf19	-2,17
Ap3b2	-2,05
Ralgds	-2,02
Itgb3	-1,96
Cyp1b1	-1,94
c-Kit	-1,91
Gata2	-1,87
Ckb	-1,82
Sorbs1	-1,8
Enpp4	-1,79
AU015836	-1,63
Tfap2c	-1,59
BC016495	-1,56
Brpf3	-1,44
Rnf213	-1,43
Pla1a	-1,41
Aard	-1,36
Msc	-1,3

Anhang

Gm6792	-1,28
Wdr62	-1,2
Lrrc34	-1,14
Pip5k1b	-1,14
AW551984	-1,1
Oplah	-1,03
D330028D13Rik	1,12
Id4	1,28
Jam2	2,47

Vergleich der Tfap2c^{-/-}-PGCLCs mit der CHIP-Seq Analyse zur Bestimmung von Tfap2c Binderegionen in P19 Zellen (Magnusdottir et al. 2013)

Gen
Abhd2
Abhd5
Acpl2
Adam19
Aff1
Ahnak
Aifm3
Akap2
Amhr2
Armc2
Arvcf
Ass1
Bcl11a
Btbd11
Cacna1b
Cadps2
Calm4
Camta1
Car4
Casz1
Ccdc88c
Cerk
Chd7
Chid1
Chn1
Chst8
Clcn2
Cldn5
Cln6
Col18a1
Coro2b

Cotl1
Cphx
Cpsf4l
Ctf1
Dennd1c
Dmrt1
Dopey2
Dppa3
Ebf1
Efna1
Enpp4
Epb4.1l1
Epha2
Etl4
F2r1l
Fgd6
Fgf1
Fgf4
Fgfr2
Fkbp6
Fos
Foxp4
Frmd4b
Galnt6
Gfod1
Gins2
Gli2
Grhl2
Grik3
Gulp1
Hes1
Hey1
Hk1
Hk2
Id1
Itga6
Kctd15
Klf9
Lefty2
Lmna
Lrp1
Lrrc2
Lrrc34
Mapk13
Mapt

Anhang

Mcl1
Me1
Mfge8
Mras
Msi2
Mtap1b
Myb
Myo10
Nf1
Nkain4
Nmnat2
Nmt2
Nnt
Odf2
Odz4
Otx2
Parvb
Pcgf5
Pecam1
Pgd
Phc2
Phf13
Pik3cd
Plcd3
Plce1
Plcg2
Plekhg2
Plekhg3
Pou4f2
Prickle1
Ptpn6
Rab11fip4
Rab3il1
Rab6b
Raet1a
Rai1
Ralgds
Rasgrp2
Rcan1
Rfx4
Ripply3
Rps6kl1
Scarb1
Sema4a
Slc12a8

Anhang

Slc1a5
Slc7a9
Slco4a1
Slnf9
Slit2
Smad6
Snx24
Spop
Src
St6galnac2
Stat1
Sufu
Syt7
Tbx3
Tcf3
Tcf4
Tcfef
Tdof1
Tex9
Tgif2
Thbd
Tle6
Tmem154
Tmem2
Tmem53
Tpd52
Trim8
Tsc22d1
Ttyh2
Uaca
Upp1
Vegfa
Vwf
Wwc2
Zfhx3
Zfp521
Zfp704
Zfpm1