

**Analyse AP-2 gamma konditional defizienter Mäuse
und
Analyse von AP-2 alpha Zielgenen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

D I S S E R T A T I O N

von Diplom-Biologin
Julia Ehlermann

aus
Karlsruhe

2003

Dekan: Prof. Dr. M. Metzler

Referent: PD Dr. H. Schorle

Korreferent: Prof. Dr. P. Herrlich

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2003

Danksagung

PD Dr. Hubert Schorle
Prof. Dr. Peter Herrlich

Barbara Ehlermann
Dieter Ehlermann
Mathilde Hau-Liersch
Inge Heim
Andrea Jacob
Dr. Richard Jäger
Manfred Kasper
Markus Schmid
Tanja Schüler
Helmut Türk
Susi Weber

Zusammenfassung

AP-2 alpha, AP-2 beta und AP-2 gamma Knockout-Studien deuten darauf hin, dass jedes AP-2 Protein eine individuelle Funktion während der Mausentwicklung besitzt, obwohl die einzelnen AP-2 Proteine vor allem zu Beginn ihrer Expression gemeinsam exprimiert werden. AP-2 gamma defiziente Tiere sterben am Tag E8,5 der Embryonalentwicklung aufgrund eines Plazentadefekts. In diesen konventionellen Knockout-Tieren lässt sich die Funktion von AP-2 gamma während der späteren Embryonalentwicklung nicht analysieren. Möglich wird dies erst durch eine konditional defiziente AP-2 gamma Knockout-Linie, in der durch gewebespezifische Expression der Cre-Rekombinase gewebespezifische Knockout-Tiere erzeugt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Verwenden der transgenen MORE-Mauslinie Epiblast spezifische Knockout-Tiere und durch Verwenden der transgenen Wnt1-Cre-Rekombinase-Mauslinie Neuralleisten spezifische Knockout-Tiere erzeugt. Die AP-2 gamma Epiblast spezifischen Knockout-Tiere zeigten verschiedene Defekte. Alle Tiere hatten einen Keimzelldefekt und waren steril. In den Weibchen findet man keine Follikeln oder Oozyten. In den Männchen konnte gezeigt werden, dass die Spermatogonien mit dem Einsetzen der Spermatogenese durch Apoptose absterben. Ein Teil der männlichen Tiere entwickelte zusätzlich einen primären Neuralrohrschlussdefekt, eine Spina bifida. Der posteriore Neuroporus schließt sich nicht und Neuroepithel proliferiert nach Außen. Im Gegensatz zu den AP-2 gamma Epiblast spezifischen Knockout-Tiere zeigten die AP-2 gamma Neuralleistenzellen spezifischen Knockout-Tiere zeigten keinen Phänotyp.

Um die redundante Funktionen von AP-2 alpha, beta und gamma zu untersuchen wurden doppelt defiziente Tiere erzeugt und analysiert. AP-2 alpha beta doppelt defiziente Tiere starben am Tag E12,5 der Embryonalentwicklung und zeigten schwere Retardierungen im Rumpfbereich. AP-2 alpha gamma und AP-2 beta gamma doppelt defiziente Tiere konnten nicht isoliert werden. Bei der Verpaarung für AP-2 alpha gamma doppelt defiziente Tiere trat jedoch bereits bei AP-2 gamma Knockout-Tieren, die außerdem nur ein funktionelles Allel für AP-2 alpha besaßen, ein Neuralrohrschlussdefekt im Kopfbereich auf. Diese Ergebnisse belegen, dass die einzelnen AP-2 Transkriptionsfaktoren teilweise den Verlust eines AP-2 Proteins kompensieren können.

In einem weiteren Projekt wurde durch eine subtraktive Hybridisierung (SSH) ausgehend von den Köpfen eines Wildtyp und eines AP-2 alpha Knockout-Tieres 52 Gene isoliert, die differentiell exprimiert werden. Die Expressionsmuster von vier dieser AP-2 alpha Zielgenen wurden analysiert und es konnte gezeigt werden, dass sie in den AP-2 alpha Knockout-Tieren früher oder verstärkt exprimiert werden. Alle vier Gene (KLF4, EFEMP-1, Stra13 und Mtd) sind beteiligt an Zellzyklus-Kontrolle, Differenzierung und Apoptose. Die Ergebnisse aus der subtraktiven Hybridisierung lassen den Schluss zu, dass AP-2 alpha die Expression von Differenzierungs-Genen hemmt und die Expression von Wachstums-Genen ermöglicht.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	1
ZUSAMMENFASSUNG.....	3
INHALTSVERZEICHNIS	5
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	9
EINLEITUNG	11
Die Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren.....	11
Biochemische Eigenschaften	11
AP-2 alpha.....	13
AP-2 beta.....	14
AP-2 gamma.....	14
AP-2 delta.....	17
AP-2 als Genregulator	17
Die Rolle von AP-2 Proteinen in Differenzierung und Apoptose.....	17
Gewebe und Organe.....	18
Neuralrohr und Neuralrohrschluss.....	18
Neuralleiste.....	20
Neuralrohrdefekte.....	20
Gonadenentwicklung	22
Hoden	22
Testis descendens.....	25
Spina bifida und Cryptorchidismus	27
Ovar	27
Infertilität	29
Knockout-Mäuse und transgene Tiere	30
Zielgene von AP-2 alpha	32
ZIELSETZUNG	35

MATERIAL UND METHODEN	37
Abkürzungen.....	37
Material.....	38
Bezugsquellen von Materialien, Reagenzien und Chemikalien	38
Vektoren, Oligonukleotide, cDNA-Bibliotheken, Antikörper, Northern Blot.....	41
Bakterien, Maus-Linien	43
Lösungen, Medien, Puffer.....	43
Methoden	48
Präparation kompetenter Bakterien	48
Transformation von Bakterien	48
Plasmidpräparation im kleinen Maßstab ("Mini-Präp")	48
Plasmidpräparation im großen Maßstab ("Maxi-Präp", Quiagen-Methode)	48
Analytischer und präparativer Verdau von Plasmid-DNA	49
Phenol- Chloroform- Extraktion von Nukleinsäuren aus proteinhaltigen Lösungen	49
Ethanol-Präzipitation von DNA	49
Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	49
Agarose-Gelelektrophorese von DNA	50
Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	50
Herstellung radioaktiv markierter Sonden.....	50
Northern Blot.....	51
Ethanol-Präzipitation von DNA für ISH	51
Digoxigenin-Markierung von RNA	51
Fixierung und Aufbewahrung von Embryonen für <i>in Situ</i> Hybridisierungen.....	51
Totalpräparat <i>in Situ</i> Hybridisierung.....	52
<i>In Situ</i> Hybridisierung auf Paraffin-Schnitten	53
Präparation genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Schwanzspitzen	54
RNA-Isolierung für RT-PCR.....	54
RT-PCR	55
PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion).....	55
Zucht von Mäusen	56
X-Gal Färbung	56
Skelettanalyse: Knochen und Knorpelfärbung.....	56
Isolierung von Embryonen	57
Fixierung von Embryonen, Mäusen und Organen	57
Einbetten von Embryonen und Geweben in Paraffin.....	57
Herstellung von histologischen Schnitten	58
Färbung von histologischen Schnitten mit Hämatoxylin/Eosin (HE).....	58
Färbung durch endogene alkalische Phosphatasen.....	58

TUNEL-Färbungen	58
Karmingefärbtes Totalpräparate von Mausbrustdrüsen	59
Knochen-Knorpel-Färbung	59
Elektronenmikroskopie	60
ERGEBNISSE	61
Gewebsspezifischer AP-2 gamma KO	61
Der Epiblast spezifische Phänotyp (MORE-KO)	61
Aktivität der Cre-Rekombinase unter dem Mox2-Promotor	62
Loop-out-Reaktion in konditionalen AP-2 gamma Tieren	63
Effizienz der Loop-out-Reaktion	65
Spina bifida.....	66
Neurologische Ausfälle	73
Hodendefekt und Cryptorchidismus	76
Verlust des Keimepithels.....	78
Apoptose im Hoden.....	82
Elektronenmikroskopische Analyse des Hodendefekts	84
Defekt im Ovar	86
Brustdrüsen von AP-2 gamma defizienten Tieren	88
Defekt in der Trachea.....	90
Geschlechtsspezifischer Phänotyp	91
Statistik.....	92
Zusammenfassung: KO ^{MORE} -Knockout-Tiere	93
Wnt1-Knockout.....	94
Doppelt defiziente Tiere.....	96
AP-2 alpha beta Doppel-Knockout-Tiere	97
Tiere aus der AP-2 alpha gamma Doppel-Knockout-Verpaarung	98
Zielgene von AP-2 alpha	102
Von AP-2 alpha reprimierte Gene	104
Differenzielle Expression von Mtd1, Stra13, KLF4 und EFEMP-1	104
EFEMP-1	106
KLF4	111
DISKUSSION.....	115
Der gewebsspezifische KO	115
Phänotyp in Hoden und Ovar	115
Keimzellen.....	115

Defekt in der Spermatogenese.....	116
Apoptose im Hoden.....	116
Fortschreitende Degeneration des Keimepithels	118
Hodenhochstand und Verlust der Keimzellen	119
Defekte im Ovar.....	120
Brustdrüse von KO ^{MORE} -Tieren	121
Spina bifida	121
Mausmutanten mit Spina bifida	122
AP-2 gamma KO ^{MORE} -Tieren im Vergleich mit der „curly tail“ Mutante	123
Entstehung von Neuralrohrdefekten.....	123
Entstehung des „curly tail“	124
Geschlechtsspezifische Spina bifida	125
Spina bifida und Cryptorchidismus	126
Motorische Defizite in Tieren mit Spina bifida	127
KO ^{Wnt1} -Tiere.....	128
Doppelt defiziente Tiere	129
Zielgene von AP-2 alpha.....	132
AUSBLICK.....	135
LITERATURVERZEICHNIS.....	136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Proteinstruktur von AP-2.....	11
Abbildung 2 Alignment der drei AP-2-Proteine	12
Abbildung 3 Gamma-KO.....	15
Abbildung 4 Regionen des Neuralrohrschlusses.....	19
Abbildung 5 Aufbau Hodenkanälchen.....	23
Abbildung 6 Spermatogenese.....	24
Abbildung 7 Testis descendens	26
Abbildung 8 Ovar	28
Abbildung 9 Loop out Reaktion.....	30
Abbildung 10 Unterschiedliche Allele bei der Generierung eines konditionalen KO-Allels.....	32
Abbildung 11 Schema der Suche nach AP-2 alpha Zielgenen	33
Abbildung 12 Verpaarungsschema für Epiblast spezifische Phänotyp (MORE-KO)	62
Abbildung 13 MORE-Cre Rekombinase Expression	63
Abbildung 14 Genotypisierung	64
Abbildung 15 Effizienz der Loop-out-Reaktion.....	66
Abbildung 16 Neugeborene mit Spina bifida.....	67
Abbildung 17 Spina bifida in Embryonen E9,5.....	68
Abbildung 18 Embryonen mit Spina bifida und curly tail	70
Abbildung 19 Spina bifida bei älteren Tieren	71
Abbildung 20 Querschnitt durch Spina bifida.....	72
Abbildung 21 Wirbelkörper	73
Abbildung 22 Vergleich der Motorik	74
Abbildung 23 Knorpel-Knochenfärbung von neugeborenen Tieren.....	75
Abbildung 24 Knochen-Knorpel-Färbung von Beckengürtel und Wirbelsäule.....	76
Abbildung 25 Phänotyp im Urogenitaltrakt.....	77
Abbildung 26 Histologische Schnitte durch adultes Hodengewebe	79
Abbildung 27 Vorläuferzellen der Keimzellen PGC.....	80
Abbildung 28 Beginnende Spermatogenese in 4 Tage alten Tieren	81
Abbildung 29 Apoptose-Nachweis in adulten Hodengewebe	83
Abbildung 30 Hoden im EM	85
Abbildung 31 Ovar	87
Abbildung 32 Apoptosenachweis im Ovar	88
Abbildung 33 Brustdrüsen.....	89
Abbildung 34 Tracheadefekt.....	90

Abbildung 35 Geschlechtsbestimmung mittels PCR.....	92
Abbildung 36 WNT1-Cre Expression in R26R-Mäusen.....	95
Abbildung 37 Wnt1-PCR und Loop-out-Effizienz in den DRGs	96
Abbildung 38 AP-2 alpha beta Doppel-KO-Tiere	97
Abbildung 39 Verpaarungsschema AP-2 alpha gamma doppelt defizienter Tiere	99
Abbildung 40 Embryonen aus der AP-2 alpha gamma Verpaarung (E12,5)	100
Abbildung 41 Embryonen aus der AP-2 alpha gamma Verpaarung (E10,5)	101
Abbildung 42 Tabelle der isolierten „full length“ Klone	103
Abbildung 43 Expressionsmuster der 4 isolierten Zielgene	105
Abbildung 44 RT-PCR WT-KO ^{MORE} -Vergleich	105
Abbildung 45 Northern Blot von EFEMP-1 während der Embryonalentwicklung.....	108
Abbildung 46 EFEMP-1: <i>In Situ</i> Hybrisisierung.....	109
Abbildung 47 EFEMP-1: <i>In Situ</i> Hybridisierung am Tag E15,5.....	110
Abbildung 48 Northern Blot von KLF4 während der Embryonalentwicklung.....	111
Abbildung 49 KLF4 <i>in Situ</i> Hybridisierung.....	112
Abbildung 50 KLF4 <i>in Situ</i> Hybridisierung auf Schnitten am Tag E15,5	113

Einleitung

Die Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren

Biochemische Eigenschaften

Zu Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren zählt man heute vier Gene, AP-2 alpha (Williams, Admon et al. 1988), AP-2 beta (Moser, Imhof et al. 1995) AP-2 gamma (Oulad-Abdelghani, Bouillet et al. 1996) und AP-2 delta (Zhao, Satoda et al. 2001). Alternativ werden sie mittlerweile auch als TCFAP A, B, C und D bezeichnet, wobei TCF für "transcription factor" steht.

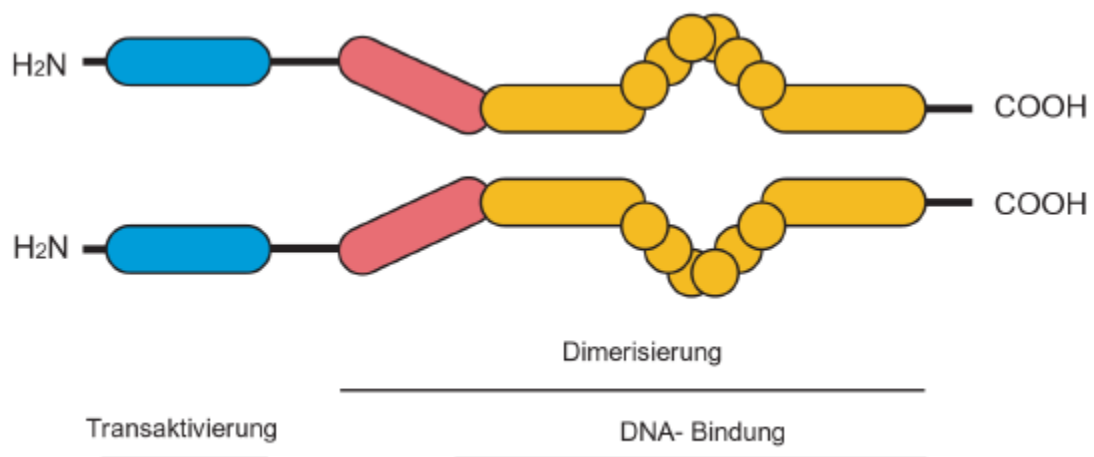


Abbildung 1 Proteinstruktur von AP-2

(nach Oulad-Abdelghani, 1996)

Die AP-2 Proteine gliedern sich in drei funktionelle Domänen: 1. N-terminale prolinreiche Transaktivierungsdomäne (blau), 2. eine C-terminale Dimerisierungsdomäne, die aus einem für diese Proteine charakteristischem Helix-Spanne-Helix-Motiv (gelb) besteht und 3. eine DNA-Bindedomäne, die sich aus der Dimerisierungsdomäne und einer zentralen basischen Region zusammensetzt (rot).

Alle Proteine dieser Familie besitzen ein Molekulargewicht von 52 kDa, erkennen und binden an die palindromischen Erkennungssequenz 5'-GCCN_(3/4)GGC-3' an DNA (Mitchell, Wang et al. 1987). In späteren Studien wurden zahlreiche alternative AP-2-Erkennungssequenzen publiziert. AP-2 kann mit ähnlicher Affinität an die Motive 5'-GCCN_{3/4}GGG-3', 5'-GCCN₃GGC-3' und 5'-GCCN₄GGC-3' binden (Mohibullah, Donner et al. 1999). Man geht mittlerweile davon aus, dass die einzelnen Dimere an verschiedenste GC-reiche Motive binden können, z.B. weicht die AP-2 Bindestelle im SV40 Enhancer mit dem Motiv 5'-CCCAGGC-3' deutlich von oben beschriebene Konsensussequenz ab. In Struktur- und Funktionsanalysen wurde

gezeigt, dass AP-2-Moleküle sowohl als Homodimere oder auch Heterodimere an die unterschiedlichen Erkennungssequenzen binden und Genexpression transaktivieren können.

Parallel zu diesen Studien gelang der Nachweis von AP-2-Homologen, auch in anderen Spezies wie *X. laevis* (Krallenfrosch, xAp-2) (Snape, Winning et al. 1991), *D. melanogaster* (Fruchtlfliege, dAP-2) (Bauer, McGuffin et al. 1998) und in *G. gallus gallus* (Huhn, cAP-2) (Shen, Wilke et al. 1997).

Die AP-2 Transkriptionsfaktoren haben einen für diese Familie charakteristischen Aufbau, sie bestehen aus drei funktionellen Domänen (Abbildung 1). Als Dimerisierungsmotiv wurde dabei eine basische Helix-Spanne-Helix-Struktur (bHLH) am C-Terminus der Proteine beschrieben. Ein Teil dieser Region vermittelt gleichzeitig die DNA-Bindung (Williams und Tjian 1991). Die Transaktivierung wird durch eine Prolin- und Glutamin-reiche Sequenz am N-Terminus der Proteine vermittelt. Diese funktionelle Domäne ist innerhalb der einzelnen AP-2-Proteinen am geringsten konserviert (Abbildung 2). Die Transaktivierungsdomäne fehlt bei dem Drosophila AP-2 Homolog sogar gänzlich.

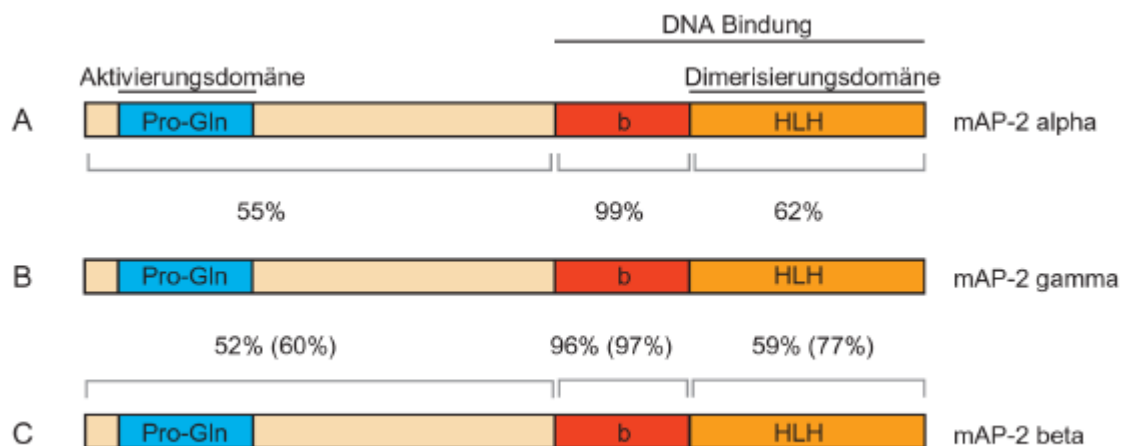


Abbildung 2 Alignment der drei AP-2-Proteine

(nach Oulad-Abdelghani 1996)

Schematisches Alignment der AP-2 Proteine. Es sind die Prozente der Übereinstimmungen zwischen AP-2 gamma (B) und AP-2 alpha (A) bzw. zwischen AP-2 gamma und AP-2 beta (C) angegeben. Die Prozentangabe in Klammern bezieht sich auf die Übereinstimmung zwischen AP-2 alpha und AP-2 beta.

AP-2 alpha

AP-2 alpha wurde als erster Transkriptionsfaktor der AP-2 Genfamilie beschrieben. Er wurde als Protein entdeckt, dass sowohl im SV40-Virus (Mitchell, Wang et al. 1987) als auch im humanen Metallothionin IIa-Gen (Imagawa, Chiu et al. 1987) an spezifische Enhancerelemente bindet. Das humane AP-2 alpha Gen liegt auf dem Chromosom 6, das murine Gen auf Chromosom 13 (Williamson, Bosher et al. 1996).

Das Expressionsmuster von AP-2 alpha wurde in der Maus intensiv untersucht, Hauptexpressionsorte sind während der Embryonalentwicklung die migrierenden Neuralleistenzellen und später deren Derivate. AP-2 alpha wird aber auch in einer Reihe von anderen Geweben exprimiert. Die Expression beginnt im Embryo am Tag E8,5 in der Neuralfalte und dem lateralen Kopfmesenchym. Zu diesem Zeitpunkt dreht sich der Embryo, das Neuralrohr beginnt sich zu schließen und erste Neuralleistenzellen wandern aus dem Neuralrohr aus. Vor dem Tag E8,5 ist dieses AP-2 alpha nur im extraembryonalen Gewebe (Trophoblasten) zu finden (Mitchell, Timmons et al. 1991). Am Tag E9,5 ist AP-2 alpha im Oberflächenectoderm, in den Kiemenbögen und den Vorläufern der Cranialganglien exprimiert. Schwache Expression findet man im Mesonephros, Pericard, Aorta, Schwanzspitze und Gliedmaßenknospenmesenchym. Am Tag E10,5 kommt eine Expression in den dorsalen Wurzelganglien und im Rückenmark hinzu (Mitchell, Timmons et al. 1991). Am Tag E12,5 hat sich die Expression fokussiert, man findet AP-2 alpha immer noch im Oberflächenectoderm und im Gesichtsmesenchym, in der Zunge, in den Zahnanlagen, und cranialen Ganglien und den dorsalen Wurzelganglien, später zusätzlich in der Niere, in den Speicheldrüsen und in den Haarfollikeln (Moser, Ruschoff et al. 1997). Im adulten Tier wird AP-2 alpha nur noch auf niedrigem Niveau in der Niere, im Kleinhirn und auf sehr niedrigem Niveau im Thymus exprimiert. Die stärkste Expression findet man am Tag E11,5, danach nimmt die Expression stetig ab.

Anhand von Knockout-Studien war es möglich zu untersuchen welche essentiellen Funktionen AP-2 alpha während der Embryonalentwicklung erfüllt. AP-2 alpha defiziente Tiere sterben perinatal, sie zeigen eine schwere Cranioabominoschisis (gr. schisis, Spalte). Die Neuralfalte schließt sich im Kopfbereich nicht, das Neuralrohr bleibt offen und das Gehirn entwickelt sich nach Außen und überwächst Teile des Gesichtschädels. Im Gesichtsbereich findet man ebenfalls starke Deformationen, da sich die Mittellinie nicht schließt. Knochen und Knorpel sind fehlgebildet, die cranialen Ganglien sind hypoplastisch. Der Mittelliniendefekt setzt sich im Bereich des Thorax und des Abdomens fort, die inneren Organe werden nicht in die Körperhöhlen eingeschlossen und entwickeln sich außerhalb des Embryos (Schorle, Meier et al. 1996; Zhang, Hagopian-Donaldson et al. 1996).

AP-2 beta

AP-2 beta zeigt eine Homologie von 76% zu AP-2 alpha. Beide Proteine zeigen in vitro sehr ähnliche oder gleiche DNA-Binde- und Transaktivierungseigenschaften (McPherson und Weigel 1999). Ihr Expressionsmuster überlappen sich in der Maus während der frühen Embryonalentwicklung, AP-2 beta ist vor dem Tag E8,0 nur im Trophoblasten exprimiert. Im Embryo findet man die erste Expression an E8,0 im lateralen Kopfmesenchym und in der Neuralfalte (Moser, Pscherer et al. 1997). Bis zu dem Tag E10,5 sind beide Gene im Mittelhirn, im Nachhirn, in den dorsalen Wurzelganglien, in einem Teil des dorsalen Rückenmark, im Gesichtsmesenchym, in den 1. Kiemenbögen und Oberflächenectoderm coexprimiert. Am Tag E11,0 verstärkt sich die Expression von AP-2 beta im Bereich des Mittelhirns, während die Expression von AP-2 alpha sich abschwächt. In der dorsalen Wurzelganglien hingegen verstärkt sich die AP-2 alpha Expression, während die Expression von AP-2 beta endet. Im Gesichtsmesenchym sind beide Gene weiterhin coexprimiert. Ab Tag E13,0 findet man AP-2 beta zusätzlich noch in der Niere in den Epithelien der distalen Tubuli und des Sammelrohrs (Moser, Pscherer et al. 1997). Das humane AP-2 beta Gen liegt auf dem Chromosom 6 wie auch AP-2 alpha, das murine Gen auf Chromosom 1 (Williamson, Bosher et al. 1996).

Auch in diesem Fall wurde zur Analyse der Genfunktion eine Knockout-Maus erzeugt. Diese hat, obwohl AP-2 beta ein ähnliches Expressionsmuster wie AP-2 alpha zeigt, einen völlig anderen Phänotyp als das AP-2 alpha Knockout-Tier. AP-2 beta Knockout-Tiere entwickeln ab dem Tag E16,5 einen Nierendefekt, in der Niere bilden sich viele Zysten. Im Nierenepithel kommt es verstärkt zu Apoptose. Die meisten Tiere sterben direkt nach der Geburt. Tiere, die ein bis zwei Wochen älter werden, entwickeln eine Hypokalziämie, Hyperphosphatämie und Hyperurämie (Moser, Imhof et al. 1995). Beim Menschen kennt man eine Missense-Mutation im AP-2 beta Gen. Diese Char-Syndrom-Patienten (Char 1978) exprimieren eine dominant negative Form von AP-2 beta (Zhao, Weismann et al. 2001).

AP-2 gamma

AP-2 gamma ist 1995 zum ersten Mal von Oulad-Abdelghani unter dem Namen AP-2.2 beschrieben worden. Es wurde aus der murinen P19 embryonalen Carcinoma Zelllinie isoliert. In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass AP-2 gamma bereits kurz nach Retinsäurebehandlung induziert wird (Oulad-Abdelghani, Bouillet et al. 1996). Das humane AP-2 gamma Gen liegt auf dem Chromosom 20, das murine Gen auf Chromosom 2.

Die Expression von AP-2 gamma beginnt in der Maus am Tag E7,0 im extraembryonalen Gewebe. Es wird im Chorion, in der ektoplazentalen Höhle und in den Riesenzellen des Trophoblasten exprimiert (Chazaud, Oulad-Abdelghani et al. 1996). Trophoblastenzellen bilden

eine Gruppe von spezialisierten Zellen, die Leitfunktionen während der Implantation und der Plazentabildung übernehmen. AP-2 gamma ist der erste bekannte Transkriptionsfaktor der in allen Trophoblastenzellen während der gesamten Plazentaentwicklung exprimiert wird, daher wird ihm eine Schlüsselrolle in der Plazentaentwicklung zugesprochen. Werling konnte zeigen, dass der Verlust von AP-2 gamma zu einem Plazentadefekt führt (Abbildung 3), der Embryo stirbt bis zum Tag E9,0 ab (Werling und Schorle 2002). AP-2 gamma reguliert die Expression des murinen Adenosin-Deaminase (ADA) Gens, das im Purin-Stoffwechsel eine Rolle spielt (Shi und Kellems 1998). Es wurde gezeigt, dass in den AP-2 gamma defizienten Tieren die Expression von ADA stark verringert ist. Fehlen des Enzyms bewirkt eine ansteigende Konzentration des Zellgiftes Desoxyadenosin, was letztendlich zum Absterben der Zellen führt (Werling und Schorle 2002). ADA defiziente Mäuse sterben wie auch die AP-2 gamma defizienten an einem Plazentadefekt (Migchielsen, Breuer et al. 1995).

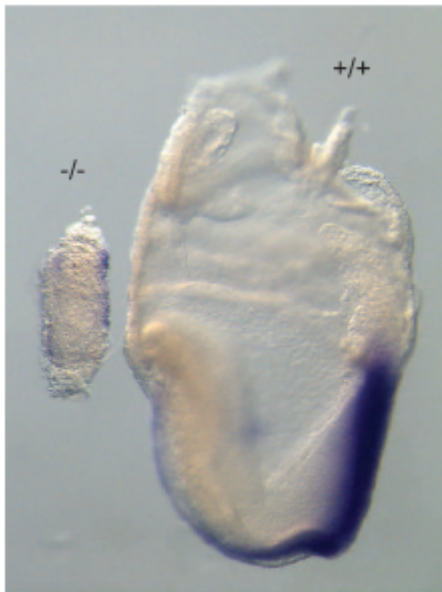


Abbildung 3 Gamma-KO

KO-Embryo und WT-Embryo E8,0; der KO-Embryo ist retardiert (Werling und Schorle 2002). Die Blaufärbung markiert die Expression von *brachyury*, einem mesodermalen Marker.

Im Embryo beginnt die Expression am Tag E7,5 in der Region zwischen der Neuralplatte und dem Oberflächenektoderm, am Tag E8,0, an dem der Neuralrohrschluss beginnt, beschränkt sie sich auf den Rand der Neuralgrube und auf das benachbarte Mesenchym der Kopffalte, dass die ersten migrierenden Neuralleistenzellen enthält. Am Tag E8,5 wird AP-2 gamma zusätzlich im frontonasalem Mesenchym exprimiert, dass hauptsächlich aus Neuralleistenzellen besteht, die aus dem Vorderhirn stammen. Man findet zusätzlich Expression in den Neuralleistenzellen, die aus dem 2ten und 4ten Rhombomere aus- und in

das Mesenchym einwandern. Außerdem ist AP-2 gamma im Oberflächenektoderm des Kopfes am rostralsten Punkt exprimiert. In der späteren Embryonalentwicklung manifestiert sich die Expression im Gesichtsbereich, hinzu kommt Expression im Gehirn und in der Gliedmaßenknospe.

Im sich entwickelnden Gesicht findet man die Expression von AP-2 gamma vor allem im Mesenchym um das Stomadaeum (primitive Mundhöhle). Es wird auch in den Cranialnervenanlagen exprimiert, während man z.B. in den dorsalen Wurzelganglien keine Expression findet. Die Expression im Gesicht bleibt während der weiteren Entwicklung erhalten, beschränkt sich aber immer mehr auf eingegrenzte Strukturen. So wird am Tag E11,5 Expression im maxillären und mandibulären Prozeß gefunden, im Bereich der Mundhöhle in epithelialen Verdickungen aus denen sich die Zahnknospen entwickeln und im Bereich der zukünftigen Zunge. Zusätzlich findet man AP-2 gamma auch noch im Bereich der Nasengrube, genauer im Mesenchym, das die Nasenhöhle umschließt. Im Gehirn ist es erst im Vorderhirn exprimiert, später noch im Telenzephalon, in Teilen des Dienzephalon und Myelenzephalon (Chazaud, Oulad-Abdelghani et al. 1996). AP-2 gamma wird nicht nur in Teilen des Gehirn exprimiert, sondern man findet es auch noch nach dem Auswandern der Neuralleistenzellen, im dorsalen Rückenmark.

Im Mesenchym der vorderen Gliedmaßenknospen findet man AP-2 gamma Expression ab dem Tag E9,5 und mit der Aussprossung der hinteren Gliedmaßenknospen auch dort. In der weiteren Entwicklung beschränkt sich die Expression erst auf die Progressionszone direkt unterhalb der Randleiste (AER). Ab Tag E12,5 findet man keine Expression mehr in den Gliedmaßenknospen.

Ein weitere Expressionsort ist das Urogenitalsystem, hier kann man AP-2 gamma ab Tag E11,5 im Hodengewebe nachweisen. Da man außerdem Expression in einigen wenigen primordiale Keimzellen gefunden hat kurz bevor diese ihren Bestimmungsort in der Genitalleiste erreichen, wurde postuliert, dass AP-2 gamma exprimiert wird, wenn diese Zellen ihre Migration beenden und mit der Differenzierung zu Keimzellen beginnen. Später findet sich AP-2 gamma Expression zusätzlich in der Epidermis und dem Mesenchym der Genitalknospe, im Epithel der Harnröhre und des Mastdarm (Chazaud, Oulad-Abdelghani et al. 1996).

Im adulten Tier wird AP-2 gamma in einer Reihe von Organen und Geweben gefunden. Es wird in der Lunge, Hoden und in den wachsenden Follikeln des Ovar exprimiert. Außerdem findet man AP-2 gamma in der Epidermis der Haut, in den Epithelien von Vagina und Cervix, im Urethra, in der Blase, in der Samenblase und in der Prostata, in der Zunge, im Pharynx, im Larynx, im Ösophagus, in der Trachea und den Hauptbronchien, im Magen und im Auge (Oulad-Abdelghani, Bouillet et al. 1996).

AP-2 delta

Bei Untersuchungen des Char-Syndroms (AP-2 beta Missense-Mutation mit dominant negativem Effekt) wurde 2001 das vierte AP-2 Gen entdeckt (Zhao, Weismann et al. 2001). Das humane AP-2 delta liegt nur 40kb von dem humanen AP-2 beta Gen entfernt. Mittels Sequenzvergleichen wurde dieses neue AP-2 auch in Maus und Ratte entdeckt, in der Maus wurde es im embryonalen und adulten Gehirn nachgewiesen. Das Protein besteht aus 452 Aminosäuren und hat hohe Homologie zur DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne der anderen AP-2 Proteine. Im Vergleich mit den anderen AP-2 Proteine zeigt AP-2 delta eine andere DNA-Bindeaffinität (Zhao, Weismann et al. 2001), während AP-2 alpha, beta und gamma eine identische oder sehr ähnliche Bindeaffinität zu AP-2 Bindestellen haben (McPherson und Weigel 1999). Die N-terminale Transaktivierungsdomäne unterscheidet sich stark von den Transaktivierungsdomänen der anderen AP-2 Proteine, einige für die Transaktivierung kritischen Aminosäuren sind verändert oder fehlen. Es wird daher spekuliert, dass das neue AP-2 delta sich auch in vivo in Bezug auf Transaktivierung und Interaktion mit Coaktivatoren von den anderen Familienmitgliedern unterscheidet (Zhao, Weismann et al. 2001).

AP-2 als Genregulator

Man kennt mittlerweile einige Gene, die von AP-2 Proteinen reguliert werden. In einer Reihe in vitro Experimenten konnte gezeigt werden, das z.B. ADA (Adenosin Deaminase) (Shi und Kellems 1998), das humane Methallothionin IIa Gen (Mitchell, Wang et al. 1987), Keratin-Gene (Fuchs und Byrne 1994), das human ILGBP-5 (insulin-like-growth-factor-binding-protein-5) (Duan, Plisetskaya et al. 1995), Dopamine beta-Hydroxylase (Greco, Zellmer et al. 1995), HER-2/neu (Bosher, Totty et al. 1996); p21 WAF/CIP (Zeng, Somasundaram et al. 1997) und TGF alpha (Wang, Johansson et al. 1997) von AP-2 Proteinen aktiviert werden. Es sind nur wenige Gene bekannt, die von AP-2 Proteinen reprimiert werden. Zu diesen Genen gehört c-Myc (Gaubatz, Imhof et al. 1995) und MCAM/Muc18 (Jean, Gershenwald et al. 1998).

Die Rolle von AP-2 Proteinen in Differenzierung und Apoptose

Durch den Verlust von AP-2 alpha kommt es in KO-Tieren zu Apoptose in den cranialen Ganglien. Der Verlust von AP-2 beta führt zu Apoptose in den entsprechenden KO-Tieren. Unter anderem durch die Analyse von AP-2 defizienten Tieren bestätigt sich, dass AP-2

Proteine eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Differenzierung, Proliferation und Apoptose spielen.

Schon früher konnte gezeigt werden, dass z.B. c-myc, Regulator der Zellproliferation, mit AP-2 um DNA-Bindung konkurriert. In Promotorstudien von Prothymosin alpha und Ornithincarboxylase (Gaubatz, Imhof et al. 1995) wurden gezeigt, dass das E-Box-Bindeelement für myc/max oder max/max Dimere mit einem AP-2 Bindemotiv überlappt. Dies führt zu einer sterischen Behinderung der Transkriptionsfaktoren. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es zu einer direkten Wechselwirkungen den Transkriptionsfaktoren im Bereich ihrer DNA-Bindedomänen kommt. Das c-myc-Protein ist ein wichtiger Regulator der Zellproliferation und induziert den Eintritt von Zellen in die G1-Phase des Zellzyklus. Während des Zellzyklus werden daraufhin D-Cycline exprimiert. Es konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass AP-2 alpha auch im Promotor von Cyclin D2 durch sterische Kompetition eine Aktivierung durch c-myc hemmt. Die Bindemotive von AP-2 und c-myc überlappen sich auch hier (Matsushime, Roussel et al. 1991).

Diese Ergebnisse konnten durch Untersuchungen an den AP-2 beta KO-Tieren bestätigt werden, in diesen Tieren werden eine Reihe von Zielgenen von c-myc, unter anderem auch Cyclin D2, hochreguliert (Hilger-Eversheim, Moser et al. 2000). Andere Untersuchungen konnten zeigen, dass AP-2 Proteine über Inhibition von p21 in den Zellzyklus eingreifen können. p21 ist ein Zellzyklusinhibitor. AP-2 hemmt in Zellkulturexperimenten das Wachstum von Krebszellen über eine Aktivierung von p21 (Imagawa, Chiu et al. 1987; Luscher, Mitchell et al. 1989). Der Promotor von p21 enthält ein AP-2 Bindemotiv, wird dieser Bereich mutiert, kann p21 nicht mehr durch AP-2 aktiviert werden.

Man kann also zusammenfassen, dass AP-2 Proteine in die Zellzyklusprogression durch die Interaktion mit c-myc und durch die Aktivierung von p21 eingreifen können.

Gewebe und Organe

Neuralrohr und Neuralrohrschluss

Nervenzellen gehören zu den ältesten spezialisierten tierischen Zelltypen. Sie sind gleichermaßen wichtig für Würmer, Fliegen und Säuger. Ihre Morphologie und Morphogenese ist einzigartig. Nervenzellen werden in komplexer Ordnung angelegt, man unterscheidet auf der einen Seite, das zentrale Nervensystem (ZNS), das das Rückenmark und das Gehirn beinhaltet, zum anderen das periphere Nervensystem (PNS), zu dem alle peripheren Nerven zählen.

Während der Embryonalentwicklung verdickt sich das Ektoderm in einem zentralen Streifen zur Neuralplatte, diese faltet sich zunächst apikal ein, wird zur U-förmigen Neuralgrube und dann zur Neuralfalte. Die Neuralfalte rollt sich schließlich zum Neuralrohr und löst sich vom Ektoderm ab. Der Neuralrohrschluss findet im Embryo am verschiedenen Stellen zeitversetzt statt, so dass sich das Neuralrohr in einigen Bereichen schon geschlossen hat, während an anderen Stellen die Neuralgrube noch geöffnet ist (Le Douarin 1999). In der Maus existieren vier unabhängige Regionen der cranio-caudalen Achse, in denen die Auffaltung der Neuralrinne und der Schluss des Neuralrohrs jeweils *de novo* initiiert wird. In Abbildung 4 sind die Bereiche im Maus-Embryo schematisch dargestellt. Die Regionen vier unabhängigen Neuralrohrschlussregionen werden mit Zone A-D bezeichnet. Die Stellen, an denen das Neuralrohr sich zuerst schließt, werden mit Initiationspunkt 1-4 bezeichnet. Die Verschmelzung der Neuralfalte schreitet von Initiationspunkt 1 und 2 in bidirektionaler Richtung fort und von Initiationspunkt 3 in caudaler Richtung fort.

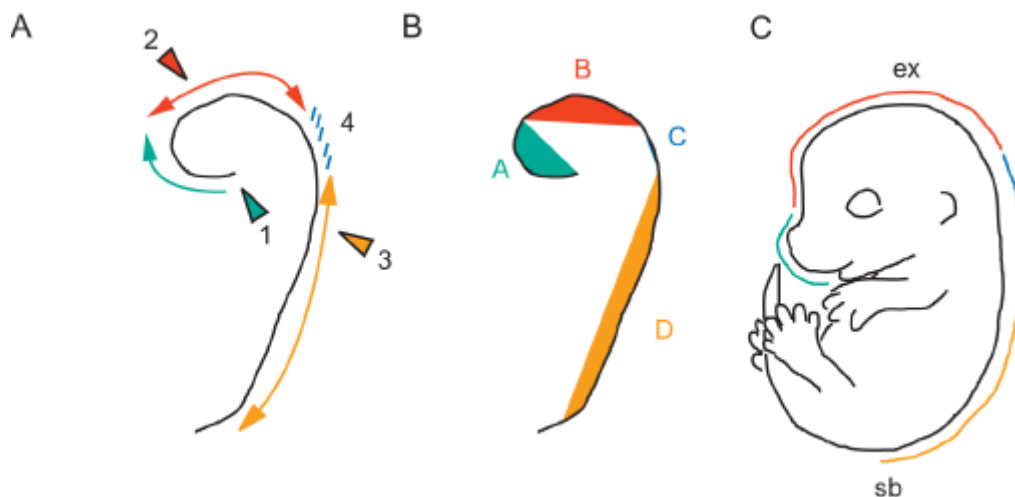


Abbildung 4 Regionen des Neuralrohrschlusses

(nach Harris und Juriloff, 1999) **A:** *De novo* Initiationspunkte (1- 4) des Neuralrohrschlusses entlang der anterior-posterioren Körperachse während der Embryonalentwicklung E8,0- E9,0 Pfeile deuten die Richtung des Fortschreitens an; **B:** Vier unabhängige Regionen des Neuralrohrschlusses während der Embryonalentwicklung E8,0- E9,0; **C:** Relative Position der Regionen A-D im E15,0 Embryo;

PNP: posteriorer Neuroporus; ex: Exenzephalie; sb: Spina bifida;

Bei dieser Art des Neuralrohrschlusses spricht man auch von primärer Neurulation. Der Begriff sekundäre Neurulation wird für die Entstehung des Neuralrohrs dorsal der posterioren Neuroporus verwendet. In diesem Bereich bildet sich das Neuralrohr aus direkt aus der Schwanz- oder Endknospe heraus. Da sich das Neuralrohr unter dem geschlossenen

Ektoderm in caudaler Richtung vorschiebt, spricht man auch von Kanalisation (Blatter, Lafeber et al. 1997).

Das Neuralrohr besteht zu Beginn der Entwicklung aus einem einschichtigen Epithel, daraus entstehen sowohl Neuronen als auch unterstützende assoziierte Gliazellen des ZNS. Im Verlaufe dieser Differenzierung wird das Rohr mehrschichtig und besteht dann aus verschiedenen Zelltypen. Verschließt sich das Neuralrohr nicht vollständig im Laufe der weiteren Entwicklung kommt es zu Neuralrohrdefekten.

Neuralleiste

Zum Zeitpunkt des Neuralrohrschlusses lösen sich aus dem dorsalsten Bereich des Neuralrohrs einige Zellen ab und wandern aus dem Neuralrohr aus. Diese Zellpopulation wird als Neuralleistenzellen bezeichnet. Sie differenzieren in verschiedenste Gewebe. Im Bereich des Rumpfs kennt man zwei Hauptwanderwege. Vorläuferzellen der Melanozyten wandern auf dorsolateralem Weg durch das dermale Mesoderm unter der Dermis in die Peripherie des Embryos, anschließend ins Ektoderm und kolonisieren die Haut und die Haarfollikel, wo sie zu Melanozyten differenzieren. Die zweite Zellpopulation wandert auf ventralem Weg durch die anterioren Regionen des Somiten (Diese Region des Somiten bildet den Knorpel der Wirbelkörper) und bildet später Nerven und Ganglien des PNS, medulläre Nebennierenzellen und Schwann-Zellen (Anderson, Groves et al. 1997).

Im Bereich des Kopfes wandern die craniale Neuralleistenzellen aus, sie besiedeln die Gesichtsregion, zum einen den nasalen Bereich, zum anderen die Kiemenbögen (Noden 1983). Diese besondere Subpopulation der Neuralleistenzellen wirken hier außer an der Bildung der Ganglien und Nerven an der Bildung von Knochen und Knorpelstrukturen mit (Chai, Jiang et al. 2000).

Neuralrohrdefekte

Beim Menschen sind dysraphische Missbildungen (?gr. raphe, Naht) ein großes medizinisches und soziales Problem. Unter dem Dysraphiesyndrom fasst man Fehlbildungen infolge mangelhafter Rückenmarksanlage und Störungen des Schließungsprozesses (Raphenbildung) des Neuralrohrs zusammen. Schließt sich das Neuralrohr im caudalen Bereich während der Embryonalentwicklung nicht und bilden sich ein Spaltwirbel spricht man Spina bifida (^lat. spina, Dorn, Stachel; ^lat. bifidus, zweigeteilt). Normalerweise verschmelzen die beiden Bogenanteile der Wirbel zu einem Ring, der das Wirbelloch nach hinten begrenzt. Im

Wirbelloch selbst liegt das Rückenmark, umgeben von den Rückenmarkshäuten. Bei der Spina bifida bleibt der Bogenschluss eines oder mehrerer Wirbel aus. Die Spina bifida ist häufiger im Bereich der Lendenwirbelsäule und des Kreuzbeins als im Bereich der Brust- oder Halswirbelsäule anzutreffen. Kommt es zu einem fehlerhaften Neuralrohrschluss im Bereich des Kopfes spricht man von Exenzephalie, beim Menschen degeneriert das Gewebe beim Kontakt mit dem Amnionwasser und es entwickelt sich eine Anenzephalie.

Die Folgen einer Spina bifida sind vom Ausmaß der Schädigung des Rückenmarks abhängig und reichen von geringen Beeinträchtigungen der Gehfähigkeit bis hin zu Querschnittslähmungen mit Störungen der Blasen- und Darmfunktion. Hinzu kommen meistens noch weitere Defekte z.B. im Urogenitaltrakt (Ferrara, Rossodivita et al. 1998). Die Behandlung der Spina bifida richtet sich nach der Art und dem Ausmaß der Fehlbildung. Durch eine operative Behandlung können die Überlebenschancen deutlich gebessert werden, neurologische Beeinträchtigungen und Spätkomplikationen lassen sich jedoch häufig nicht vermeiden.

Neuralrohrverschlussstörungen treten in Deutschland mit einer Wahrscheinlichkeit von 1-2:1000 Geburten auf, man beobachtet jedoch in verschiedenen geographischen Regionen Anhäufungen dieser Defekte (Dolk, De Wals et al. 1991). Die eigentlichen Auslöser dieser Entwicklungsstörung sind nicht bekannt. Es wurde allerdings herausgefunden, dass ein Mangel an Folsäure bzw. eine Störung im Folsäurestoffwechsel, die Entstehung einer Spina bifida wie auch einer Anenzephalie begünstigen. Aus der Epilepsiebehandlung ist bekannt, dass Frauen, die wegen eines Anfallsleidens in der Schwangerschaft Antiepileptika einnehmen, ein erhöhtes Risiko (etwa 1%) für eine Spina bifida bei ihrem Kind haben. Genetische Faktoren sind an der Ausbildung einer Spina bifida ebenfalls beteiligt, was sich unter anderem durch familiäre Prädispositionen bestätigt. Eine präkonzeptionelle Verabreichung von Multivitaminen (Rose, Cooke et al. 1983) und Folsäure (Cornel und Erickson 1997; Williams, Mai et al. 2002) kann das Risiko reduzieren.

Neuralrohrdefekte treten häufiger bei weiblichen Foeten auf als bei männlichen. Diese Prädisposition für Neuralrohrdefekte ist aber abhängig von der betroffenen Region oder Höhe des Defekt. Frauen leiden wesentlich häufiger an Craniorachischisis (?gr. rachis: Rückgrat; ?gr: schisis Spaltung), Spina bifida unter Beteiligung des Thorax, cervikale Spina bifida, Anenzephalie und Enzephalozöle (bruchartiger Vorfall von Hirngewebe durch einen Defekt des Schädels), während Männer häufiger von tiefer Spina bifida betroffen sind (Seller 1995). Neuralrohrdefekte können heute pränatal diagnostiziert werden. Durch Ultraschalldiagnostik können 80% der Neuralrohrschlussdefekte entdeckt werden (Shurtleff 1986). Durch die Bestimmung von Alphafetoprotein im Serum der Schwangeren ist es möglich bei etwa 70% der

Fälle eine offene Spina bifida zu erkennen, wird Alphafetoprotein im Fruchtwasser bestimmt erhöht sich der Prozentsatz des Nachweis sogar auf 90-95% (Brock und Scrimgeour 1972).

Mittlerweile kennt man auch einige Tiermodelle für Neuralrohrdefekte, die jedoch meist nur bestimmte Aspekte dieser multifaktoriellen Erkrankung abdecken; z.B die curly tail Mutante (van Straaten und Copp 2001), der Pax3-Knockout (splotch-Mutante) (Payne, Shibasaki et al. 1997) oder durch Retinsäure bzw. Valproinsäure induzierte Spina bifida (Ehlers, Sturje et al. 1992).

Gonadenentwicklung

Die Organentwicklung vollzieht sich bei den Säugetieren mit sehr unterschiedlicher Geschwindigkeit, während einige Organe schon im Embryo funktionsfähig sein müssen und sich deshalb früh entwickeln, gehören die Gonaden zu den sich sehr spät entwickelnden Organen. Zu Beginn ihrer Entwicklung erscheinen die Gonaden als paarige, längsverlaufenden Genitalleisten. In dieses Gewebe wandern die primordialen Keimzellen von der Basis der Allantois aus und migrieren zwischen Tag E8,5 und Tag E11,5 an der Darmwand und am Mesenterium (Bauchfellfalte in der Nerven und Gefäße verlaufen) entlang bis sie letztendlich die Genitalleiste erreichen. Hier bilden sie zusammen mit den somatischen Gonadenzellen das Gonadengewebe. Zu diesem Zeitpunkt ist das Geschlecht phänotypisch nicht zu unterscheiden, man bezeichnet dieses Stadium auch als indifferentes Stadium (Morrish und Sinclair 2002).

Daraufhin endet die gemeinsame Entwicklung von Hoden und Ovar. Während sich im Hoden die Vorläuferzellen zu Spermatogonien entwickeln, werden im Ovar aus den Gonozyten (Urkeimzellen) Oogonien gebildet, aus denen im Verlauf der Oogenese die Eizellen hervor gehen

Hoden

Der Hoden besteht hauptsächlich aus den Tubuli seminiferi (Samenkanälchen), im adulten Zustand besteht jedes Samenkanälchen (Abbildung 5) aus Keimepithel, dessen Zellen sich während der Reifung immer mehr ins Lumen schieben, und den Sertoli-Zellen, die Stütz- und Nährfunktionen haben. Zwischen den Tubuli seminiferi liegen Blutgefäße und Gruppen von interstitiellen Zellen, die hauptsächlich aus Leydig-Zwischenzellen bestehen (Kühnel). Diese Zellen produzieren Androgene, insbesondere Testosteron.

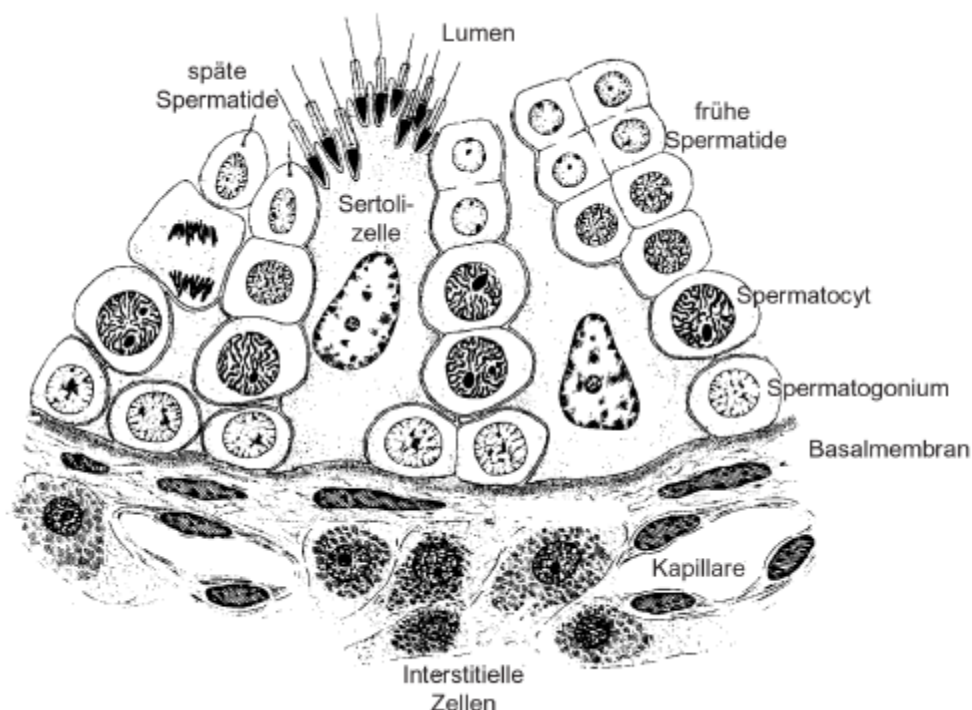


Abbildung 5 Aufbau Hodenkanälchen

(nach L.C. Junqueira, J. Carnero, Th. Schiebler)

Schema zu Aufbau des Hodenkanälchens und des interstitiellen Gewebes. Ausgehend von den Spermato gonien, die an der Basalmembran liegen, findet die Spermato genese in Richtung des Lumens statt.

Im Keimepithel findet die Spermato genese statt, aus den diploiden Spermato gonien werden haploide männliche Gameten (Spermato zoen) gebildet (Abbildung 6). Man unterscheidet der Reihenfolge nach die Spermato zyto genese, die Reifeteilung (Meiose) und die Differenzierungsperiode (Spermio genese). Während der Spermato zyto genese teilen sich die Spermato gonien mitotisch und erzeugen nicht nur weitere Spermato gonien, sondern auch Zellen, die sich zu primären Spermato zyten differenzieren. Spermato gonien vom Typ A (dunkel) stellen die Stammzellen dar. Ihre mitotischen Teilungen erzeugen viele Spermato gonien vom Typ A (dunkel) und einige Spermato gonien vom Typ A (blass). Die Typ-A-Zellen kann man anhand ihrer unterschiedlich stark gefärbten Kerne unterscheiden. Aus diesen Spermato gonien vom Typ A werden Spermato gonien vom Typ B und schließlich Spermato zyten. Während der weiteren Reifung zum Spermato zyten verliert die Keimzelle auch den Kontakt zur Membran des Tubulus seminiferi und schiebt sich in Richtung des Lumens. Hier treten die primären Spermato zyten in die Meiose ein, es erfolgt die 1. Reifeteilung und die gebildeten sekundären Spermato zyten entwickeln sich durch die 2. Reifeteilung zu Spermato den. Diese Spermato den sitzen lumennah und differenzieren letztendlich zu den Spermato zoen (Husmann und Levy 1995).

Die Spermatogenese der Maus ist vergleichbar mit der Spermatogenese des Menschen. Mäusen sind 6 Wochen nach der Geburt geschlechtsreif, ihre Keimzellen differenzieren aber 4 Tag nach der Geburt in Spermatogonien. Beim Menschen beginnt die Differenzierung zu Spermatogonien bereits vor der Geburt, die eigentliche Spermatogenese beginnt aber erst mit dem Einsetzen der Pubertät (Cooke und Saunders 2002). Beim Menschen dauert ein Produktionszyklus von der Spermatogonie zum reifen Spermium 75 Tage, in der Maus 35 Tage. Diese Zyklen laufen zeitlich versetzt in den einzelnen Hodenkanälchen ab, so dass kontinuierlich reife Spermien gebildet werden. Nur zu Beginn der ersten Spermatogenese entwickeln sich in allen Hodenkanälchen im gleichen Zyklus Spermien.

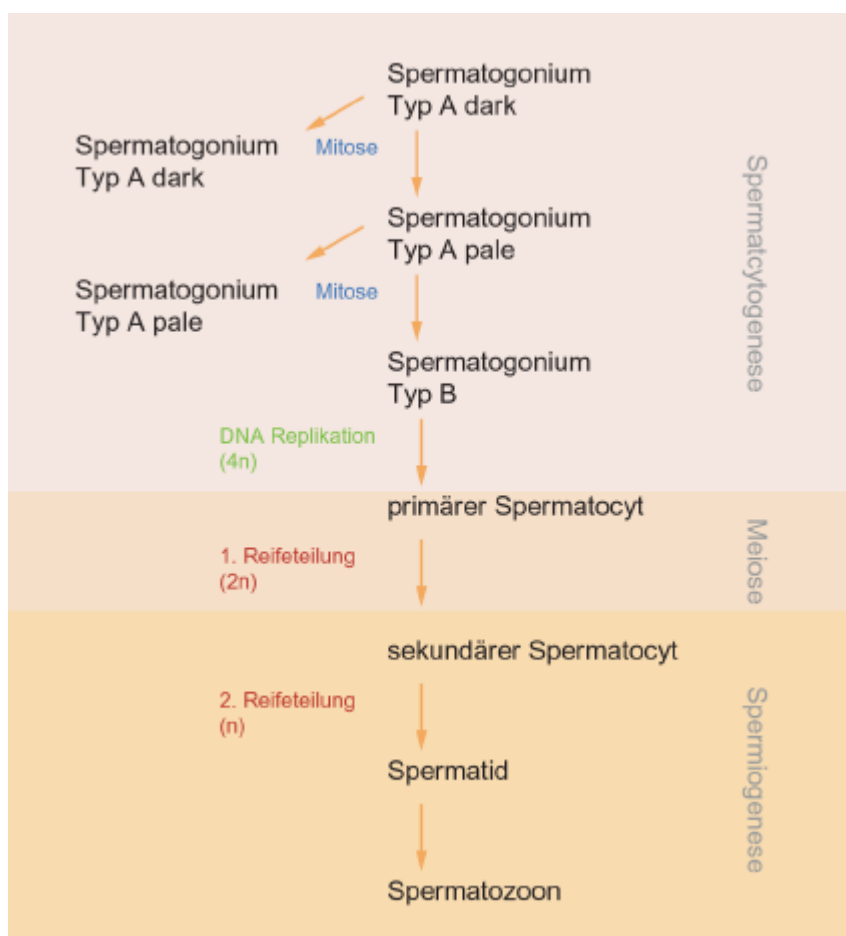


Abbildung 6 Spermatogenese

Schematische Darstellung der Spermatogenese (nach Lowe)

Sertoli-Zellen wurden ursprünglich nur als Stützzellen bezeichnet, heute weiß man, dass sie multifunktional sind und stützende, phagozytäre und sekretorische Aufgaben erfüllen. So phagozytieren sie unter anderem fehlentwickelte Spermien. Sertoli-Zellen sind große,

zylindrische Zellen, die auf der Basalmembran sitzen und mit ihrem apikalen Pol weit ins Tubuluslumen hineinragen. Diese Zellen umschließen die unterschiedlich weit entwickelten Keimzellen und versorgen diese mit Nährstoffen. Sertoli-Zellen werden von keinem der Faktoren geschädigt, die die empfindlichen Keimzellen treffen können. Sie degenerieren z.B. nicht, wenn sie erhöhter Körpertemperatur ausgesetzt sind und können deshalb im nicht deszendierten Hoden überleben (Husmann und Levy 1995).

Testis descendens

Bei den meisten Säugetieren, so auch Maus und Mensch, erfolgt ein Absinken des Hodens (Testis descendens) in die Skrotaltaschen, die am Boden der Bauchhöhle gebildet werden. Während der Entwicklung wandern die Hoden aus ihre ursprünglichen Position an der hinteren Rumpfwand caudal- und ventralwärts. Das Absinken des Hodens gliedert sich in zwei Hauptabschnitte, in die transabdominale und inguinosaakrale Phase (?lat. inguinalis, zur Leistengegend gehörig). Zwei Ligamente kontrollieren das Absinken. Das Gubernaculum testis (caudales Keimdrüsenband) zieht den Hoden in das Skrotum, wohin gegen das craniale Aufhängeband (CSL, cranial suspensory ligament) im männlichen Embryo verkümmert (Hutson, Hasthorpe et al. 1997; Barteczko und Jacob 2000). Das CSL fixiert im weiblichen Embryo die Eierstöcke im retroperitoneal Raum.

Während der transabdominalen Phase (in der Maus Tag E15,5- E17,5) verbleiben die Hoden in der Leistengegend obwohl sich der Abdominalraum vergrößert. Im Gegensatz dazu wandern die Ovarien in Relation mit dem wachsenden Bauchraum nach cranial. Während der inguinosaakralen Phase (Abbildung 7) wächst das Gubernaculum, verkürzt sich und zieht zusammen mit dem Cremastermuskel die Hoden ins Skrotum. Während diese Phase beim Menschen bei Geburt abgeschlossen ist, findet er bei Mäusen erst zwei bis drei Wochen post partum statt (Hutson, Hasthorpe et al. 1997).

Beim Menschen gehört der angeborene Hodenhochstand zu einem der häufigsten Fehlbildungen, Cryptorchidismus betrifft zwischen 1-3% der männlichen Neugeborenen (Hutson, Hasthorpe et al. 1997). Unterbleibt eine chirurgische Intervention oder ein spontanes Absinken folgt nicht nur Infertilität, sondern es besteht zusätzlich ein 5- 10fach erhöhtes Risiko eine testikuläre Malignität zu entwickeln (Kogan, Gupta et al. 1987). Die Keimzellentwicklung ist postnatal gestört, aus den Keimzellen entwickeln sich keine Spermatogonien Typ A (Huff, Hadziselimovic et al. 1991). Die sich nicht weiterentwickelnden Keimzellen verharren eine Weile im Hoden, degenerieren dann und führen so zu einer reduzierten Zellzahl im Hoden. Es wird vermutet, dass persistierende Keimzellen die Ursache für Karzinome nach Erreichen des Erwachsenenalters sind (Skakkebaek, Berthelsen et al. 1987; Huff, Fenig et al. 2001).

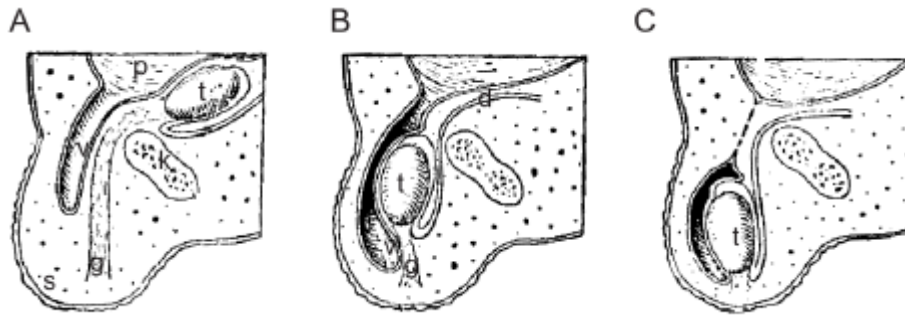


Abbildung 7 Testis descendens

Descensus testis bei Säugern (nach Romer, Parson), Sagittalschnitte: Als Leitstruktur des Testis descendus dient das Gubernaculum. Mit dem Absinken bildet sich der Processus vaginalis, der sich vom Coelom abkapselt. Der Leistenkanal verwächst.

g: Gubernaculum; k: Knochen; t: Hoden; s: Skrotum; p: Peritonealhöhle; v: Prozessus vaginalis; d: Ductus deferens

Cryptorchidismus kann durch unterschiedlichste Ätiologie hervorgerufen werden. Bei Ausbleiben oder Störung der geschlechtsspezifischen Differenzierung kommt es zur Verweiblichung der Gonaden, fehlerhafter Regression des Müllerschen Gangs oder Entwicklung des Wolfschen Gangs (Foster, Brennan et al. 1992; Bashir und Wells 1995). Dies führt über verschiedenste Prozesse zur verminderten Ausprägung eines männlichen Phänotyps. Entwickelt sich das Gubernaculum nicht, wird der Hoden nicht in die Leistengegend gezogen und dort fixiert (Heyns und Hutson 1995). Degeneriert das CSL (Craniales Aufhängeband) im männlichen Embryo nicht, verbleiben die Hoden intraabdominal (Husmann und Levy 1995). Ein weiterer Grund für Hoden descendens kann fehlender oder mangelhaft ausgeprägter Abdominaldruck sein, durch den Abdominaldruck werden die Hoden durch den Leistenkanal in das Skrotum gepresst (Frey und Rajfer 1984). Während der transabdominalen Phase spielt Druck keine Rolle, so dass ein Defekt der mangelndem intraabdominellen Druck führt (z.B. Gastroschisis bzw. Bauchdeckendefekt) sich erst in der inguinotransversalen Phase bemerkbar macht (Kaplan, Koyle et al. 1986).

Man kennt auch einige endokrine Störungen bei denen es zu Hodenhochstand kommt, so führt eine komplette Androgenresistenz, vermehrte Östrogenproduktion oder mangelhafte Bildung von MIS (Muellerian inhibiting substance, anti-Müllersches Hormon) zu maldescendens Testis (Hutson, Hasthorpe et al. 1997).

Eine andere Hypothese spricht dem genitofemoralem Nerv (GFN) zusammen mit Androgenen eine Rolle bei der Ausbildung von maldescens testis zu. Dieser Nerv entspringt in der Region

L1-2 dem Rückenmark und ist bei Nagern geschlechtsspezifisch dimorph. Er innerviert unter anderem den Cremastermuskel. Werden Androgene medikamentös geblockt, wird der geschlechtsspezifische Dimorphismus dieses Nerven blockiert (GFN Dysplasie) und betroffene Tiere entwickeln einen Hodenhochstand (Cain, Kramer et al. 1994; Goh, Middlesworth et al. 1994).

Tiermodelle, bei denen es zu Cryptorchidismus kommt, findet man sowohl bei einigen transgenen Mäusen als auch in Knock-out Studien; z.B. Ins13-KO-Tiere (Insulin-like factor3)(Emmen, McLuskey et al. 2000), transgene Hoxa10-Tiere (Satokata, Benson et al. 1995), Androgenrezeptor defiziente Tiere (TFM Mäuse (He, Kumar et al. 1991)) und GREAT-Tieren (Gorlov, Kamat et al. 2002).

Spina bifida und Cryptorchidismus

In den meisten Fällen tritt eine Spina bifida nicht alleine auf, man findet meistens eine Reihe weiterer kongenitaler Defekte; unter anderem tritt eine Spina bifida zusammen mit Cryptorchidismus auf (Tveter und Fjaerli 1975). In einer Studie mit 345 männlichen Spina bifida Patienten konnte gezeigt werden, dass 23% von Hodenhochstand betroffen waren. Cryptorchidismus war in 19% der Patienten mit tiefer Spina bifida (unterhalb L4) zu finden, während bei Patienten mit hohem Lumbaldefekt sogar 36% betroffen waren (Hutson, Beasley et al. 1988). Dieser Zusammenhang konnte in Experimenten mit Ratten erhärtet werden.

In anderen Untersuchungen an Patienten bei denen Cryptorchidismus assoziiert mit Meningomyelocele (häufigste Form der Spina bifida, Vorwölbung von Rückenmark und Meningen) auftrat wurde unter anderem gezeigt, dass bei diesen Patienten der Hormonstatus normal ist, der Cremastermuskelreflex fehlt (Ferrara, Rossodivita et al. 1998). Dieser Reflex wird über den genitofemorale Nerv vermittelt.

Ovar

Jedes Ovar geht, wie auch der Hoden, aus zwei verschiedenen Anteilen hervor, nämlich einem ortsständigen und einem eingewanderten Anteil. Die ortsständigen Anteile bilden das Follikelepithel und das Stroma ovarii (Bindegewebe). Das Follikelepithel leitet sich vom Coelomepithel und Stroma ovarii vom Mesenchym der Genitalleiste ab. Die eingewanderten Anteile des Ovars liefern die Geschlechtszellen, diese Zellen vermehren sich nach der Einwanderung stark durch Mitose und die neu entstandenen Zellen werden als Ovogonien bezeichnet. Die meisten Ovogonien gehen zugrunde, während die verbleibenden Ovogonien

sich wieder erneut vermehren. Durch Größenwachstum gehen dann letztendlich aus den Ovogonien die primäre Oozyten hervor.

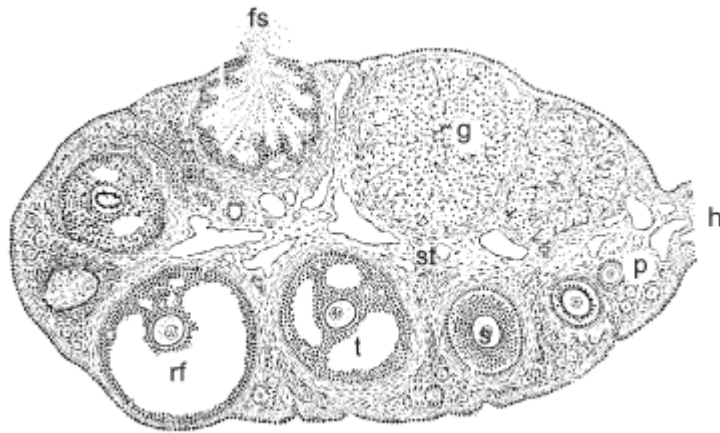


Abbildung 8 Ovar

Abbildung eines reifen Ovars (nach Lowe), es liegen verschiedene Reifestufen der Follikel dicht nebeneinander. p: Primärfollikel; s: Sekundärfollikel; t: Tertiärfollikel; rf: Graafschen Follikel; g: Corpus luteum; fs: gesprungener Follikel; h: Hilum ovarii;

Während der Ovogenese werden die Eizellen auf die Befruchtung vorbereitet. In ihrem Verlauf wird der diploide Chromosomensatz durch Meiose auf haploid reduziert. Der Ablauf der Meiose erstreckt sich im Gegensatz zu Spermatogenese über einen langen Zeitraum, er beginnt in der Embryonalzeit und endet erst nach erfolgter Imprägnation (Besamung). Parallel zur Entwicklung der Oozyten wird vom Oberflächenepithel das Gewebe gebildet, welches später die Eizelle umhüllt. Vom Coelomepithel über der Genitalleiste wachsen Keimstränge in das darunter gelegene Mesenchym ein. Diese primären Keimstränge schließen einen großen Teil der in die Ovarialanlagen eingewanderten Keimzellen ein. In den Keimsträngen teilen sich die Keimzellen und werden zu Ovogonien. Die primären Keimstränge werden jedoch zusammen mit den darin enthaltenen Keimzellen abgebaut. In der Fetalperiode bilden sich dann die sekundäre Keimstränge, die die Keimzellen, die nicht von den primären Keimsträngen eingeschlossen worden sind, einschließen. Die Keimzellen teilen sich erneut und bilden Ovogonien, die Keimstränge gliedern sich wieder auf und umfassen die sich bildenden primären Oozyten. Das Endergebnis sind Primordialfollikel, die aus einer in der Meiose arretierten Oozyte und dem aus umgestalteten Coelomepithel gebildeten Follikelepithel besteht. Keimzellen, die nicht in Keimstränge aufgenommen wurden, und Ovogonien, die nicht Teil eines Primordialfollikels wurden, sterben ab (Simpson und Rajkovic 1999).

Primordialfollikel entwickeln sich über die Zwischenstadien Primärfollikel, Sekundärfollikel und Tertiärfollikel (Bläschenfollikel) zum präovulatorischen Graafschen Follikel. Dabei wird das Endstadium des reifen Follikels nur von sehr wenigen Primordialfollikeln erreicht, man findet im

Ovar (Abbildung 8) immer viele Primär- und Sekundärfollikel, während nur wenige Tertiärfollikel angetroffen werden (Burns, Owens et al. 2002).

Die Primordialfollikel bestehen aus der primären Oozyte, die von einer flachen Schicht Follikelepithelzellen umgeben ist. Diese flache Schicht verdickt sich, bildet einen Spalt zwischen Oozyte und Epithel, die Zona pellucida wird gebildet. Im Sekundärfollikel hat sich die Zona pellucida vollständig gebildet und die Oozyte ist gewachsen, im Tertiärfollikel hat sich das Follikelepithel weiter verdickt und ist mehrschichtig geworden (Matzuk, Burns et al. 2002). Der reife Follikel wölbt sich schließlich aufgrund seiner Größe aus dem Ovar hervor und erscheint als durchsichtiges Bläschen. Nach dem Eisprung wird der Rest des geplatzten Follikels in den Gelbkörper umgewandelt (Corpus luteum), dessen Aufgabe es ist Progesteron und Östrogene zu sezernieren (Hartshorne 1997).

Infertilität

Viele unterschiedliche umweltbedingte, verhaltensbedingte oder genetische Faktoren können die Fertilität einschränken. Beim Menschen sind 10-16% der Paare von Infertilität betroffen (Cooke und Saunders 2002) Häufig handelt es sich dabei nicht um ein völliges Fehlen von Keimzellen, sondern es sind zu wenig Keimzellen vorhanden oder es kommt zu einer fehlerhaften Gonadenentwicklung. Aufgrund der komplexen Zellinteraktionen zwischen Keimzellen und somatischem Gewebe sind die bekannten pathologischen Defekte häufig noch nicht geklärt. Außerdem werden bei Untersuchungen von Infertilität sehr individuelle sekundäre Defekte beobachtet, so dass meistens der Grunddefekt nicht zu analysieren ist.

So können beim Mann z.B. Defekte in einem einzelnen testikulären Zelltyp zu Veränderungen des gesamten Gewebes führen. Ein sogenanntes „Sertoli-cells-only“-Syndrom (SCO), bei dem nur noch die Sertolizellen in den Hodenkanälchen zu finden sind, kann durch Defekte in der Funktion der Sertoli-Zellen und daraus resultierenden Verlust an Keimzellen, durch einen Defekt der Keimzellen selbst oder einem Defekt im interstitiellen Gewebe hervorgerufen werden. Auch bei der Frau können Defekte der Keimzellentwicklung, der Follikelreifung oder des somatischen Keimdrüsengewebes zu Infertilität führen.

Da die Keimzellentwicklung und Reifung im Menschen mit der der Maus vergleichbar ist und beide Spezies histologisch und entwicklungsbiologisch gut untersucht sind, eignet sich das Maus-Tiermodell gut für die Analyse von Keimzelldefekten. Man kennt eine Reihe von Knockout-Studien die sich mit Infertilität beschäftigen. So zeigt z.B. die Gcd-Maus (Germ cell

deficient) einen Verlust der Keimzellen am Tag E11,5 oder die Msh4-KO-Maus, defizient in dem mutS Homolog 4 (DNA-Reparatur), einen Defekt während der Meiose.

Knockout-Mäuse und transgene Tiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit einer Reihe transgener Tierlinien und Knockout-Tierlinien gearbeitet, außer den AP-2 alpha, beta und gamma Knockout-Linien, der konditionale AP-2 gamma Linie und der transgenen Cre-Rekombinase-Linien unter dem Wnt1- oder Mox2-Promotor.

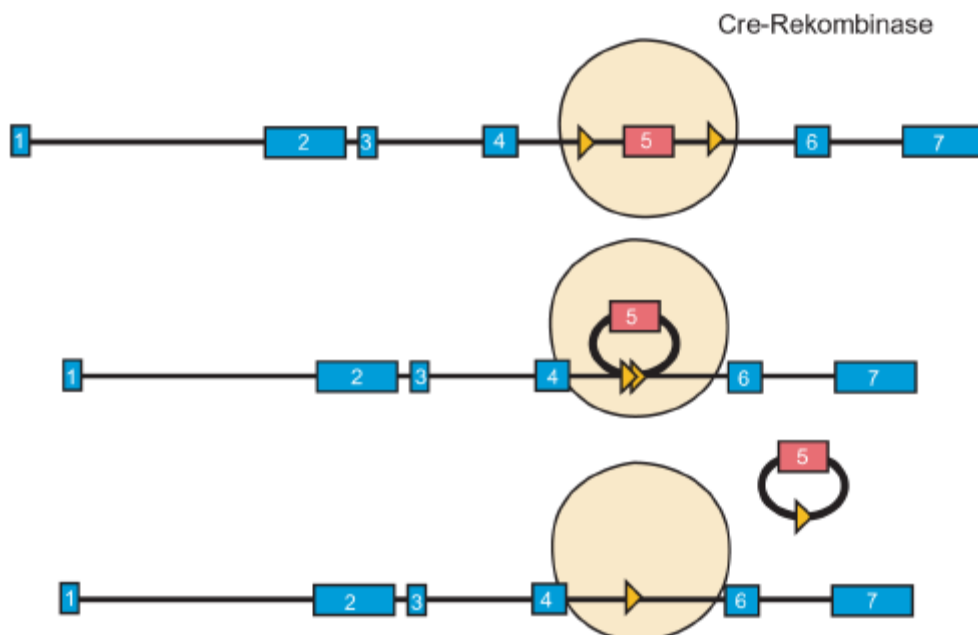


Abbildung 9 Loop out Reaktion

Loop-out-Reaktion am Beispiel des konditionalen AP-2 gamma Allels (Werling und Schorle 2002): Die Cre-Rekombinase erkennt beide LoxP-Sequenz und schneidet die Sequenz zwischen den LoxP-Stellen aus, im Fall von AP-2 gamma wird das 5. Exon entfernt.

Konstitutive Knockout-Linien werden durch das sogenannte Gen-Targeting erzeugt. Bei dieser Methode wird ein für die Funktion des Gens entscheidender Bereich zerstört. In den meisten Fällen ersetzt man diesen Bereich durch eine Selektionskassette, die bei Zellkulturarbeiten nützlich ist. Bei AP-2 alpha (Schorle, Meier et al. 1996) und AP-2 beta (Moser, Pscherer et al. 1997) wurde das Exon 5 bzw. Exon 4, das jeweils für DNA-Bindung mitverantwortlich ist,

zerstört. Es kann anschließend nur noch eine trunkierte RNA gebildet werden und es entsteht kein funktionelles Protein.

Die konstitutive und die konditionale AP-2 gamma Linien (Werling und Schorle 2002) wurden über eine weiterentwickelte Gen-Targeting Methode erzeugt (Kwan 2002). In diesem Fall wird ein Exon bzw. ein funktioneller Bereich nicht direkt zerstört, sondern zunächst von 2 LoxP-Stellen flankiert. LoxP-Stellen sind 43bp lange Sequenzen, die von dem Enzym Cre-Rekombinase erkannt werden. Sind im Genom zwei LoxP-Stellen vorhanden und flankieren diese einen Genbereich, kommt es zu einer Loop-out-Reaktion. Bei der Loop-out-Reaktion wird durch Übereinanderlagerung der beiden LoxP-Stellen zunächst eine Schlaufe erzeugt und diese anschließend entfernt (Abbildung 9). Das Cre-Rekombinase/LoxP-Stellen-System stammt von dem Bacteriophagen P1 (Lakso, Sauer et al. 1992; Orban, Chui et al. 1992).

In Abbildung 10 sind die unterschiedlichen Allele vor und nach der Loop-out Reaktion im Fall des AP-2 gamma Locus gezeigt. In Abbildung 10A ist das WT-Allel dargestellt, es besteht aus 7 Exonen. Im konditionalen Allel wurde das 5.Exon von zwei LoxP-Stellen flankiert (Abbildung 10B). Findet eine Loop-out-Reaktion statt, wird das 5. Exon entfernt. Es entsteht ein KO-Allel, in dem eine LoxP-Stelle erhalten bleibt (Abbildung 10C). Im Fall der konstitutiven AP-2 gamma KO-Linie wurde die Loop-out-Reaktion bereits in der Zellkultur vor der Generierung der Mauslinie erzeugt. In Zellkulturexperimenten wird die Cre-Rekombinase durch transiente Transfektionen in die Zellen eingebracht. *In vivo* bringt man die prokaryotische Cre-Rekombinase mit Hilfe transgener Tiere in die Zellen ein.

Mittlerweile gibt es eine Reihe von transgenen Tieren, die die Cre-Rekombinase unter einem spezifischen Promotor exprimieren. Je nach Promotor wird die Cre-Rekombinase zu einem bestimmten Zeitpunkt in bestimmten Geweben exprimiert. Nur in Geweben in denen die Cre-Rekombinase aktiv ist, findet eine Loop-out-Reaktion statt. Man erhält folglich gewebespezifische Knockout-Tiere.

In der Wnt1-Cre-Mauslinie wird die Cre-Rekombinase unter dem Wnt1-Promotor exprimiert. Dieser Promotor ist in den Neuralleistenzellen aktiv, kurz bevor diese das Neuralrohr verlassen und in den Gesichtsbereich oder den Körperbereich auswandern. Verwendete man diese Tierlinie erzeugt man das KO-Allel nur in diesen Neuralleistenzellen (Chai, Jiang et al. 2000). In diesen KO -Tieren entsteht der Knockout-Phänotyp ausschließlich in dieser einen Zellpopulation und kann so unabhängig von anderen Effekten, die in einem konstitutiven KO-Tier auftreten können und die sich gegenseitig sekundär beeinflussen, untersucht werden.

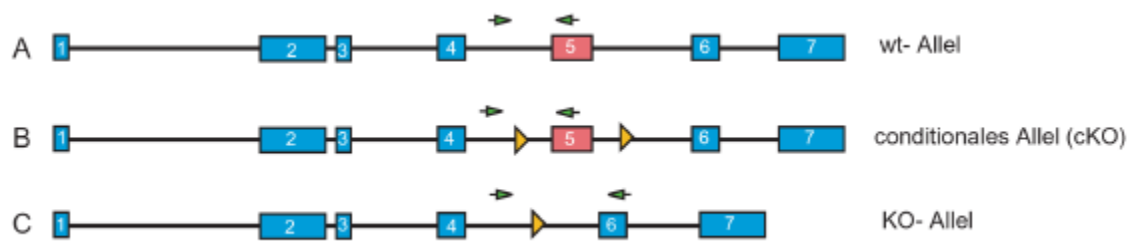


Abbildung 10 Unterschiedliche Allele bei der Generierung eines konditionalen KO-Allels

Das konditionale AP-2 gamma Allel (Werling und Schorle 2002): Der Genlokus besteht aus 7 Exons, im konditionalen Allel wurden zwei LoxP-Stellen eingefügt (orange/ Dreieck), das 5. Exon wird flankiert und wird beim KO-Allel durch die Loop-out-Reaktion entfernt. Die grünen Pfeile symbolisieren die Primer für die Genotypisierung mittels PCR.

In der zweiten verwendeten MORE-Mauslinie (Mox2-Cre-Rekombinase) wird die Cre-Rekombinase unter dem Mox2-Promotor exprimiert. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Cre-Rekombinase unter dem Mox2-Promotor (MORE) in allen embryonalen Geweben aktiv ist, obwohl das endogene Mox2-Gen während der Embryonalentwicklung nur in epithelialen Somiten und später im Sclerotom und Gliedmaßenmuskulatur exprimiert wird (Tallquist und Soriano 2000). Unter Verwendung dieser Cre-Rekombinase kann der plazentale Phänotyp in den AP-2 gamma Knockout-Tieren umgangen werden und die Funktion von AP-2 gamma in der späteren Embryonalentwicklung und im adulten Tier untersucht werden.

Zielgene von AP-2 alpha

In unserem Labor wurde von Pfisterer mit der Suchen nach Zielgenen von AP-2 alpha begonnen (Pfisterer et al. 2002). Ausgangspunkt war die RNA des Kopfes eines WT- und eines AP-2 alpha KO-Tieres am Tag E8,75. Der Zeitpunkt E8,75 wurde gewählt, da sich um diesem Zeitpunkt das Neuralrohr schließt und sich der Phänotyp der AP-2 alpha defiziente Embryo zu diesem Zeitpunkt manifestiert. Es sollte sichergestellt werden, dass später Gene isoliert werden können, die mit der Frühphase der Phänotypentstehung in Zusammenhang stehen. Es sich folglich um direkte, primäre Zielgene von AP-2 alpha handelt. Mittels der SMART cDNA Synthese-Technologie wurde aus der RNA cDNA synthetisiert und diese amplifiziert.

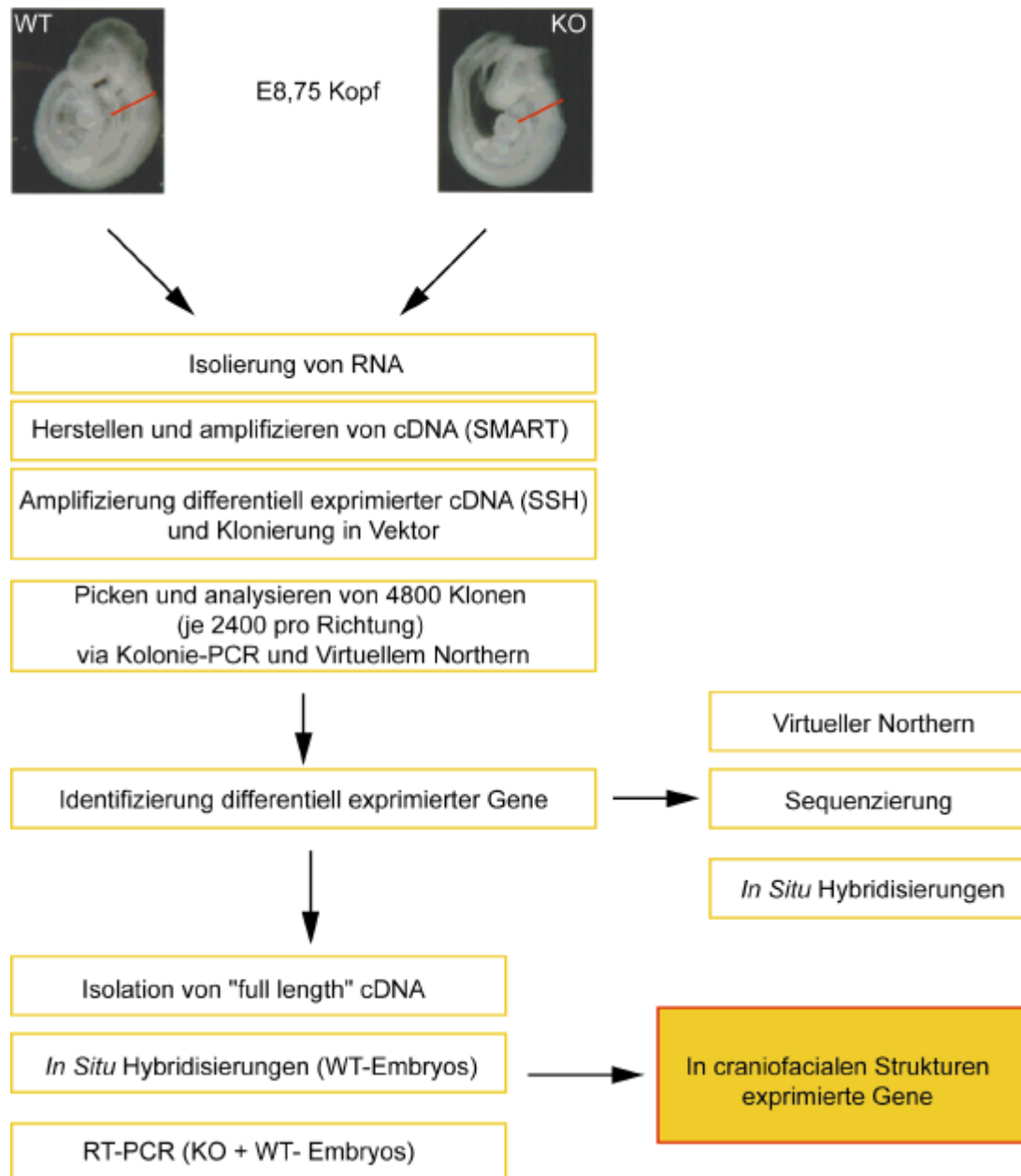


Abbildung 11 Schema der Suche nach AP-2 alpha Zielgenen

Ausgehend von der RNA aus dem Kopf eines WT- und eines AP-2 alpha KO-Tieres wurden cDNAs isoliert, die differentiell exprimiert werden. Es wurden die dazugehörigen „full length“ cDNAs isoliert und diese durch Sequenzierung, *in Situ* Hybridisierung und RT-PCR analysiert.

Die cDNAs wurden mit Hilfe der „SSH“-Methode (supressive subtractive hybridisation) weiterverarbeitet. Bei dieser Methode wird eine cDNA-Bibliothek von der anderen cDNA-Bibliothek subtrahiert. In diesem Fall wurde entweder die cDNAs des Wildtyps von der cDNA des KO-Tieres subtrahiert oder die cDNA des KO-Tieres von der des Wildtyp-Tieres. Das führt dazu, dass nach einem SSH nur die cDNAs der Gene übrig bleiben, die in der einen oder anderen cDNA-Bibliothek verstärkt vorhanden sind.

Man erhält letztendlich eine subtrahierte cDNA-Bibliothek in der von AP-2 alpha induzierte Gene enthalten sind und eine cDNA-Bibliothek mit von AP-2 alpha reprimierten Genen. Mit Hilfe der SSH-Methode werden nicht nur die cDNA-Pools der verschiedenen Tiere gegeneinander subtrahiert, sondern es kommt auch noch zusätzlich zu einer Anreicherung der gering exprimierten Gene. Diese Gene sind besonders interessant, da es sich bei diesen Genen unter Umständen um wenig exprimierte Transkriptionsfaktoren handelt, die eine regulative und damit grundlegenden Wirkung auf den KO-Phänotyp haben. 4800 cDNAs, 2400 cDNAs je Subtraktionsrichtung, wurden durch reversen Northern auf ein unterschiedliches Expressionsmuster in WT- und KO-Köpfen untersucht und 52 cDNAs für weitere Analysen ausgewählt (Abbildung 11).

Bei der Verwendung der SMART Technologie werden kurze cDNA-Fragment mit einer Länge von 250bp bis 300bp erzeugt. Daher war es notwendig in einer E8,5 und E10,5 Embryo cDNA-Bibliothek nach „full length“-Klonen zu suchen, die längere Fragmente oder die komplette Gensequenz enthielten. Diese längeren Fragmente benötigt man unter anderem zur Herstellung einer spezifischen Probe für *in Situ* Hybridisierungen und für die Sequenzierung.

Ziel dieses Projekts war es Gene zu isolieren, die von AP-2 alpha reguliert werden. Diese Gene sollten, da die Zielgene aus dem Kopf isoliert wurden, in craniofacialen Strukturen exprimiert werden. Ihre Expression sollte zwischen WT-Tieren und AP-2 alpha KO-Tieren Unterschiede aufweisen. Primäre Zielgene müssen außerdem ein AP-2 DNA-Bindemotiv im Promotor besitzen. Im Rahmen meiner Diplomarbeit habe ich bereits an der Isolierung dieser „full length“-Klone mitgearbeitet. Die Auswertung erfolgte unter anderem im Rahmen meiner Dissertation.

Zielsetzung

Die Transkriptionsfaktoren der AP-2 Familie werden in einer Reihe von Geweben exprimiert, vor allem zu Beginn ihrer Expression werden sie in einer Reihe von Strukturen, z.B in den Neuralleistenzellen, koexprimiert. Um die Frage zu klären welche AP-2 Familienmitglieder in welchen Organen und Strukturen welche Aufgabe übernehmen wurden bereits die Knockout-Tiere von AP-2 alpha, beta und gamma analysiert.

Die AP-2 gamma defizienten Embryonen sterben sehr früh in der Embryonalentwicklung aufgrund eines Plazentadefekts (Werling und Schorle 2002). Es war nicht möglich anhand des konventionellen AP-2 gamma KO-Tieres die Funktion von AP-2 gamma während der mittleren oder späten Embryonalentwicklung zu untersuchen. Im Gegensatz dazu konnten die Funktion von AP-2 alpha und beta in der Embryonalentwicklung anhand defizienten Tiere (Schorle, Meier et al. 1996; Zhang, Hagopian-Donaldson et al. 1996; Moser, Pscherer et al. 1997) untersucht werden. Diese Tiere sterben erst peri- oder postnatal.

In unserem Labor ist eine AP-2 gamma konditional defiziente Mauslinie erzeugt worden (Werling und Schorle 2002). Mit Hilfe dieser Tierlinie und transgener Cre-Mauslinien sollte die Rolle von AP-2 gamma in der Embryonalentwicklung analysiert werden. Es standen eine Epiblast spezifische und eine Neuralleistenzellen spezifische transgene Cre-Rekombinase Mauslinie zur Verfügung.

Mit Hilfe von doppelt defizienten Tieren sollte untersucht werden in wie weit sich die Funktionen der einzelnen AP-2 Proteine überlappen und ein Verlust eines AP-2 Transkriptionsfaktor von den anderen Familienmitgliedern kompensiert werden kann. Ein solches Überlappen der Genexpression findet man z.B. in der Gliedmaßenknospe, in der Haut und im Neuralrohr. Man vermutete bisher, dass in diesen Geweben und Organen keine Defekte in den bisher analysierten AP-2 KO-Tieren auftrat, weil der Verlust eines AP-2 Proteins durch die koexprimierten AP-2 Transskriptionsfaktoren ersetzt wurde (Hilger-Eversheim, Moser et al. 2000).

Ein weitere Bestandteil dieser Arbeit ist die Suche nach Zielgenen von AP-2 alpha. Man kennt eine Reihe von Genen, deren Promotoren eine AP-2 DNA-Bindesequenz besitzen und konnte in *in vitro* Studien zeigen, dass AP-2 alpha an diese Promotoren bindet und die entsprechenden Gene aktiviert oder reprimiert. *In vivo* liegen jedoch wenig Daten vor. Mit Hilfe der subtraktiven Hybridisierung (SSH) ist es möglich *in vivo* differentiell exprimierte Gene zu isolieren. Diese Zielgene sollten im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden.

Material und Methoden

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cKO	konditionaler Knockout
ct	curly tail, gekrümmter Schwanz
CTP	Zytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Dideoxyribonukleosidtriphosphate
E	Tage der Embryonalentwicklung
E	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
Fab	Antigen bindende Domäne (fragment antigen binding)
G	Desoxyguanylat (Guanin)
g	Erdbeschleunigung
gr.	griechisch
HWS	Halswirbelsäule
ISH	<i>in Situ</i> Hybridisierung
KO	Knockout
KOH	Kaliumhydroxid
KO ^{MORE}	gewebespezifischer KO im Epiblasten
KO ^{Wnt1}	gewebespezifischer KO in den Neuralleistenzellen und ihren Derivaten
lat.	lateinisch
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
ng	Nanogramm
o.N.	über Nacht
OD280	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280nm
p	Plasmid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaktion)

PFA	Paraformaldehyd
pH	potentium hydrogenium
pmol	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
U	Enzymeinheit (Units)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
wt oder +/+	Wildtyp homozygot positiv
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Material

Bezugsquellen von Materialien, Reagenzien und Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
AEC	Dako, Hamburg
Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Alcian Blau 8 GX	Sigma-Aldrich, München
Alizarin Rot S	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumacetat (NH ₄ Ac)	Roche, Mannheim
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	BioRad, München
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Apodetect™	qbiogene, USA
Aqua-Tex (Einbettung)	Dako, Hamburg
Bakterienschalen	Greiner, Nürtingen
Blaukappenröhrchen 15ml/ 50ml	Greiner Labortechnik, Solingen
Bleicitrat	Merck, Darmstadt
BM purpel Färbelösung	Roche, Mannheim
Boehringer Block	Roche, Mannheim

Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Cacodylat (Dimethylarsäure-Natriumsalz)	Merck, Darmstadt
cDNA-Kit mit Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
CHAPS-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propane-Sulfonate	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Deckgläschen	Bender und Hobein, Karlsruhe
Dialyseschläuche	Merck, Darmstadt
Digoxigenin RNA Markierungs Kit	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fulka, Neu-Ulm
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DNA-Marker, 1kb-DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs (Nukleotide)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosin B	Merck, Darmstadt;
Epon C	Merck, Darmstadt
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Eukitt®	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich, München
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	Sigma-Aldrich, München
Glycin	Sigma, München
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt;
Hefe-Extrakt	Merck, Darmstadt
Heparin	Sigma, München
Hybond XL Membranen	Amersham Biotec, Freiburg
Iso(2-)propanol	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kalialaun	Merck, Darmstadt,
Kaliumferricyanide	Fluka, Buchs (Schweiz)
Kaliumferrocyanide	Sigma-Aldrich, München
Karmin	Sigma-Aldrich, München
KOH	Merck, Darmstadt

Levamisol	Sigma-Aldrich, München
Lithiumchlorid (LiCl)	Serva, Heidelberg
Maleinsäure	Serva, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ -Lösung (PCR)	Invitrogen, Karlsruhe
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
Na ₂ HSO ₄	Merck, Darmstadt
(Dinatriumhydrogenphosphat)	
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt
NaH ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
(Natriumdihydrogenphosphat)	
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat ; 3M pH 4,6	Applied Biosystems
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natrium-Desoxychelate	Merck, Darmstadt
Natriumjodat (NaJO ₃)	Sigma, München, Merck, Darmstadt
NP-40 (IPEGAL)	Sigma-Aldrich, München
Objektträger	Bender und Hobein, Karlsruhe
Oligo dT	Invitrogen, Karlsruhe
Oligo dT-Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Oligonucleotide (Primer)	Genset Oligos, Paris (Frankreich)
Parafin	Shandon
PBS	GibcoBRL, Karlsruhe
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich, München
PCR-Puffer (10 x, magnesiumfrei)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße 100µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pepton	Merck, Darmstadt
Petrischalen	Greiner Labortechnik, Solinegn
PFA (Paraformaldehyd)	Merck, Darmstadt
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt
Polyoxyethylen- Sorbitan Monolaurat (Tween 20)	Merck, Darmstadt
Polyvinylpyrrolidon	Merck, Darmstadt
Propylenoxid	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Quiagen-Maxi-Präp	Quiagen, Hilden

Radioaktivität	Amersham Biotec, Freiburg
Reaktionsgefäße 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Rediprime (DNA-Markierungs- Lösung)	Amersham Biotec, Freiburg
Rediprime labelling kit	Amersham Biotec, Freiburg
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a.M. Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	Invitrogen, Karlsruhe New England Biolabs, Frankfurt a.M.
RNA-Isolations-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
RNA-Polymerasen (T7, SP6, T3)	Roche, Mannheim
RNAse-Inhibitor	Roche, Mannheim
RNAse-Zip	Merck, Darmstadt
Röntgenfilme	Amersham, Freiburg
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schafserum	Sigma-Aldrich, München
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
Sephadex G50	Amersham Biotec, Freiburg
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Tierfutter	Altromin, Bonn
Tierkäfige und Zubehör	Techniplast, Hohenpleißenberg
Tierstreu	Altromin, Bonn
Torula-RNA	Sigma-Aldrich, München
Tris	Merck, Darmstadt
Trypton	Merck, Darmstadt
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Whatman Papier	Labomedic, Bonn
X-Gal	Sigma-Aldrich, München
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zellkulturschalen	Greiner, Mannheim
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

Vektoren, Oligonukleotide, cDNA-Bibliotheken, Antikörper, Northern Blot

Anti-Digoxigenin-Antikörper,	Roche, Mannheim
Fab- Fragmente, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase	
EFEMP-Plasmid	im pCMV Sport 2 Vektor

In4down (Gamma-PCR)	5' - AAC AGG TTA TCA TTT GGT TGG GAT T -3'
Ex5up (Gamma-PCR)	5' - CAA TTT TGT CCA ACT TCT CCC TCA A -3'
Ex6up (Gamma-PCR)	5' - AAT AGT CAG CCA CCG CTT TAC TAG G -3'
Wnt1-Cre I	5' - ATT CTC CCA CCG TCA GTA CG -3'
Wnt1-Cre II	5' - CGT TTT CTG AGC ATA CCT GGA -3'
MORE For	5' - GGG ACC ACC TTC TTT TGG CTT C -3'
MORE Rev	5' - AAG ATG TGG AGA GTT CGG GGT AG -3'
MORE Cre	5' - CCA GAT CCT CCT CAG AAA TCA GC -3'
Bill	5' - AAC AGA GCG AAG TCT AAG AA -3'
Hillary	5' -AAT TGG GTT TGA TAT GCG TG -3'
New Paula	5' - CCC AAA TTC TTT TCA ATT CCC -3'
PgtpolyA-down	5' - CTG CTC TTT ACT GAA GGC TCT TT-3'
mAP2-dEx4neo	5' - TTC TGA GAA CGC CGC CCA GG -3'
mAP2-bEx4down	5' - CCT CCC AAA TCT GTG ACT TCT -3'
MTD 5	5' - CAG CGG AGA TCA TGG ACG CCT TTG AT -3'
MTD 3	5' - TCC GAA GCC AGG TAG CCA AGG TCT T -3'
KLF 3	5' - GAG GAA CTG CTG AAC AGC AGG GAC TGT -3'
KLF 5	5' - CAT GTG TAA GGC AAG CTG GTC CGA CCT -3'
EFEMP 5	5' - TGT AGC TGC CAG GAG CAT GGC AAC -3'
EFEMP 3	5' - GTT TGC TGC CAG CTG AAA CCC TGG -3'
STRA 3	5' - GGT GGG CTG ATG TCT CTG CAC TCA -3'
STRA 5	5' - GAG CCG AAT GCA GCT CTC AGA AGA -3'
Xist 1	5' -GTG TGT ATG GTG GAC TTA CCT -3'
Xist 2	5' - ACA CGC AAA TTA GAG GCA TAG -3'
ZFY 1	5' - GAT AAG CTT ACA TAA TCA CAT GGA -3'
ZFY 2	5' - CCT ATG AAA TCC TTT GCT GC -3'

Mouse Embryo Stage Seegene, Heidelberg
Northern Blot #1002-1

Bakterien, Maus-Linien

E. coli DH5a	Rekombinationsdefekter, suppressiver Stamm; <i>EndA1</i> , <i>gryA96</i> , <i>hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$), <i>lac</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , F'[<i>proAB</i> , <i>lac</i> ^d ZDM15, Tn10]; Tn10=> tet ^r
AP-2 beta ^{+/-KO}	Heterozygot für AP-2 beta, (Hintergrund Stamm 129Sv)
AP-2 gamma ^{+/-KO}	Mäuse heterozygot für AP-2 gamma im Stamm 129Sv Hintergrund
AP-2 konditional gamma ^{+/-cKO}	Mäuse heterozygot für AP-2 gamma im Stamm 129Sv Hintergrund
AP-2 alpha ^{+/-KO}	Heterozygot für AP-2 alpha, Stamm 129Sv
Mox2-Cre (MORE), heterozygot	Erhalten von P. Soriano "Epiblast-restricted Cre expression in MORE mice: a tool to distinguish embryonic vs. extra-embryonic gene function" (Tallquist und Soriano 2000)
Wnt1-cre, heterozygot	Erhalten von Sucov "Fate of mammalian cranial neural crest during tooth und mandibular morphogenesis" (Chai, Jiang et al. 2000)

Lösungen, Medien, Puffer

Präparation kompetenter Bakterien

CaCl₂-Lösung 50mM CaCl₂

Plasmidpräparation im kleinen Maßstab ("Mini-Präp")

Lösung I	50mM Glucose; 25mM Tris pH 8,0; 10mM EDTA;
Lösung II	0,2 NaOH; 1% SDS;
Lösung III	3M KAc pH 4,8;
RNAse A- Stammlösung	10mg/ml RNAse A

Plasmidpräparation im großen Maßstab ("Maxi-Präp", Quiagen-Methode)

Quiagen-Puffer P1	10mM EDTA pH 8,0; 50mM Tris-HCl; 100µg/ml RNAse A;
Quiagen-Puffer P2	200mM NaOH; 1% SDS;
Quiagen-Puffer P3	2,6M KAc pH 4,8;
Quiagen-Puffer QBT	750mM NaCl; 50mM MOPS; 15% Ethanol; 15% Triton-X 100 pH 7,0;
Quiagen-Puffer QC	1M NaCl; 50mM MOPS; 15% Ethanol; pH 7 eingestellt
Quiagen-Puffer QF	1,2M NaCl; 50mM MOPS; 15% Ethanol; pH 8,0 mit NaOH eingestellt
RNAse A- Stammlösung	10mg/ml RNAse A

Phenol- Chloroform- Extraktion von Nukleinsäuren aus proteinhaltigen Lösungen

Chloroform/	Chloroform : Isoamylalkohol (24:1 Volumen);
Isoamylalkohol	
Natriumacetat-Lösung	3M NaAc pH 4,8

Ethanol-Präzipitation von DNA

Ethanol/ NaAc	100% Ethanol : 3M NaAc (24:1 Volumen)
---------------	---------------------------------------

Agarose-Gelelektrophorese von DNA

1x TAE	40mM Tris pH 8,0; 20mM NaAc; 1mM EDTA pH 8,0;
Ethidiumbromid- Lösung	10mg/ ml
10x Probenpuffer	1x TAE; 50% Glycerol; 0,1% Bromphenolblau;
50x TAE	2M Tris; 1M NaAc; 50mM EDTA pH 8,0

Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

TE	10mM Tris pH7,4; 20mM EDTA;
Na ₂ CO ₃ /EDTA	2%Na ₂ CO ₃ 1mM EDTA

Northern Blot

Church-Puffer	7% SDS; 0,5M Na-Phosphatpuffer; 1mM EDTA;
Waschlösung I	1% SDS; 40mM Na-Phosphatpuffer; 1mM EDTA;
Waschlösung II	5% SDS; 40mM Na-Phosphatpuffer; 1mM EDTA;

RNA- Markierungs-Reaktion

10x	400mM Tris-HCl pH 8,0; 60mM MgCl ₂ ; 100mM Dithiotreit (DDT); 20mM
Transskriptionspuffer	Spermidin;
10x Digoxigenin- Markierungs-Lösung	10mM ATP; 10mM CTP; 10mM GTP; 6,5mM UTP; 3,5mM Digoxigenin-11- UTP

Fixierung und Aufbewahrung von Embryonen für *in Situ* Hybridisierungen

4% PFA-Lösung	in 1x PBS
---------------	-----------

METHODEN

1x PBS 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 0,7 mM CaCl₂; 0,6mM MgCl₂; 5mM Na₂HPO₄; 1,5mM KH₂PO₄;

Totalpräparat *in Situ* Hybridisierung

Hybridisierungs-Mix 1% Boehringer Block; 50% Formamid; 5x SSC pH7; 1mg/ml tRNA; 0,1mg/ml Heparin; 1% CHAPS; 0,1% Tween; 50mM EDTA in DEPC-H₂O;
 PBSw PBS mit 0,1% Tween;
 MAB-Puffer 100mM Maleinsäure; 150mM NaCl₂; pH7,5)
 Antikörper-Puffer 10% Ziegenserum; 1% Böhrringer Block; in PBSw
 AP1-Puffer 100mM Tris pH9,5; 100mM NaCl; 50mM MgCl₂;

In Situ Hybridsierung auf Parafin-Schnitten

1. Tag:

DEPC-H₂O (1 ml DEPC / l Lösung)
 10x PBS in DEPC-H₂O in DEPC-H₂O
 4% PFA in DEPC-PBS
 1x PBS in DEPC
 Proteinase K- 10 mg/ ml Proteinase K in DEPC-H₂O
 Stammlösung
 1M Tris pH 7,0 mit DEPC-H₂O angesetzt, anschließend autoklaviert.
 20x SSC in DEPC-H₂O
 0,5 M EDTA pH 8,0 mit DEPC-H₂O angesetzt, anschließend autoklaviert
 Proteinase K-Lösung Proteinase K in 20mM Tris/HCl pH7,0; 1mM EDTA pH8,0; +10µl/ml Proteinase K
 Tris/Glycin-Puffer Tris base 24,2g ; Glycine (Sigma G-7126) 15,0g ; DEPC-H₂O auf 2l auffüllen anschließend autoklavieren.
 100x Denhardt's 2% BSA; 2% Ficoll; 2% Polyvinylpyrrolidon;
 Lösung
 Prä-Hypbridiesierungs- 40% Formamide; 5x SSC; 1x Denhardt's; 100µg/ml salmon sperm DNA;
 Lösung 100µg /ml tRNA;
 2. Tag:
 Waschlösung I 0,5x SSC, 20% Formamide
 NTE 0,5M NaCl; 10mM Tris pH7,0 ; 5mM EDTA
 5x Maleinsäure-NaCl- Maleinsäure 34,8g; NaCl 26,1g;
 Puffer 10N NaOH to pH 7,5 (~ 50-60 ml)
 ddH₂O add 600ml
 autoklavieren!

10% BM Block	10% BM Block Reagenz in 1x Maleinsäurepuffer; auf ca. 60°C erhitzen; Pulver langsam lösen; autoklavieren.
Antikörperlösung	2% Block in Maleinsäure; 10% Schafserum; 100mM Maleinsäure NaCl; 2 ml 5x Maleinsäure-NaCl; add H ₂ O +2µl Dig- Antikörper

3. Tag

100x Twenn20/	10% Tween20 50mg/ml Levamisol
Levamisol10x	
TBS	80g NaCl; 2g KCl; 250ml 1M Tris pH7,5; add 1000ml H ₂ O

Präparation genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Schwanzspitzen

Tail-Puffer	50mM Tris pH8,0 ; 100mM NaCl ; 100mM EDTA pH8,0 ; 1% SDS ;
NaCl	5M NaCl

Bestimmung des Genotyp durch PCR

Oligonukleotid-Mix-AP-2alpha (Primer)	(15 pmol/µl je Oligonukleotid)
Magnesiumchlorid-Lösung	50 mM MgCl ₂
Taq-Polymerase	5U/µl
dNTP-Lösung	10 mM dNTP

X-Gal Färbung

Rinse+	0,1% Natrium Desoxycholat; 0,2% NP-40 (IPEGAL) 2mM MgCl ₂ in PBS
Fixationslösung	0,2% Glutaraldehyd; 2% Formaldehyd; 2mM MgCl ₂ in PBS
Stain	1mg/ml X-Gal; 5mM Kalium Ferricyanid; 5mM Kalium Ferrocyanid; in Rinse+

Skelettanalyse: Knochen und Knorpelfärbung

Alzian-Blau	150mg/ l in 80% Ethanol 20% Essigsäure
Alizarin-Rot	50mg/ l in 2% KOH

Fixierung von Embryonen, Mäusen und Organen

4% Formol	4% Formalin-Lösung in PBS
4% PFA	4% PFA in PBS

METHODEN

Bouins-Fix	15ml gesättigte Pikrinsäure, 5ml Formol (~35%), 1ml Eisessig (jeweils frisch angesetzt)
Färbung von histologischen Schnitten mit Hämatoxylin/Eosin (HE)	
Meyers Hämalaun aus Hämatoxylin	1g Hämatoxylin; 0,2g Natriumjodat; 50g Kalialaun in 1l H ₂ O gelöst; + 50g Chloralhydrat; + 1g Zitronensäure; Farbumschlag von Blau zu Violett;
Karmingefärbte Totalpräparate von Mausbrustdrüsen	
Karmin	1g Karmin; 2,5g KAl(SO ₄) in 500ml H ₂ O 10min gekocht, filtriert
Knochen-Knorpel-Färbung	
Alcian-Blau-Lösung	150mg/l Alcian Blau in 80% Ethanol; 20% Essigsäure
Alizarin Rot S	50mg/l Alizarin Rot S in 2% KOH
Elektronenmikroskopie	
Immersionslösung	3% Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylat-Puffer; pH 7,4
Cacodylatpuffer	0,1M Cacodylat pH 7,4
Nachfixierungslösung	2% OsO ₄ in 0,1M Cacodylatpuffer
Nachkontrastierungslösung	3% Uranylacetat/ Bleiacetat (gesättigt)
Sonstiges	
PBS	137mM NaCl; 2,7mM KCl; 0,7 mM CaCl ₂ ; 0,6mM MgCl ₂ ; 5mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5mM KH ₂ PO ₄ ;
20x SSC	175,3g/l NaCl; 88,2g/l Natrium-Citrat; pH 7,0
Ampicillin- Stammlösung	100mg/ml Ampicillin
Agarplatten	0,5% Hefeextrakt; 2% Pepton; 10mM NaCl; 1,5% Bacto-Agar; autoklaviert; 100µg/ml Ampicillin
1x LB Medium	0,5% Hefeextrakt; 2% Pepton; 10mM NaCl; autoklaviert (ggf. 100µg/ml Ampicillin)

Methoden

(sofern nicht anders angegeben, erfolgen alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur)

Präparation kompetenter Bakterien

100ml 1x LB Medium werden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und für ca. 3h auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert, wobei alle halbe Stunde die OD bei einer Wellenlänge von 600nm gemessen wird. Bei einer OD_{600} von ca. 0,3 bis 0,4 (Beginn der logarithmischen Wachstumsphase) werden die Zellen für 10min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 800x g für 10min sedimentiert. Der Überstand wird verworfen. Anschließend wird das Pellet in 10ml $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 20min auf Eis inkubiert. Die Bakterien werden erneut sedimentiert (10min; 4°C; 800x g) und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 15% Glycerol in H_2O resuspendiert, diese Bakteriensuspension aliquotiert und dann bei -80°C aufbewahrt.

Transformation von Bakterien

100µl kompetente Bakterien werden auf Eis aufgetaut und mit 5ng des zu transformierenden Plasmids gemischt. Das Gemisch wird 30min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt 90s bei 42°C. Anschließend werden die Bakterien nochmal 3min auf Eis inkubiert. Dann wird 1ml LB-Medium zugeben und die Bakterien 30min bei 37°C geschüttelt. Anschließend werden die Bakterien auf ampizillinhaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Plasmidpräparation im kleinen Maßstab ("Mini-Präp")

1,5ml einer 2ml E. coli-Übernachtskultur werden in Reaktionsgefäße überführt und bei 13000rpm für 30sec sedimentiert. Nach dem Absaugen des Überstands werden die Bakterien in Lösung I (150µl) resuspendiert und nach Zugabe der Lösung II (300µl) lysiert. Anschließend werden 150µl Lösung III zugegeben und die ausgefällten Zellbestandteile pelletiert (10min, 4°C, 13000rpm). Die DNA im Überstand wird mit Isopropanol gefällt und zweimal mit 80% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird in 100µl H_2O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Plasmidpräparation im großen Maßstab ("Maxi-Präp", Quiagen-Methode)

200ml 1x LB mit Ampicillin werden mit einer Bakterienkolonie geimpft und über Nacht im Schüttler wachsen gelassen. Plasmid-DNA wird zunächst durch alkalische Lyse der Bakterien präpariert. Hierzu werden diese durch Zentrifugation sedimentiert (10min, 4°C, 4000g) und anschließend mit 10ml Quiagen-Puffer P1 resuspendiert. Die Bakterien werden durch Zugabe von 10ml Quiagen-Puffer P2 unter vorsichtigem Invertieren lysiert. Neutralisation des Lysats

sowie Fällung des SDS erfolgt durch Zumischen von 10ml Quiagen-Puffer P3. Aus dem nach Zentrifugation gewonnenen Überstand wird die Plasmid-DNA säulenchromatographisch mittels Quiagen-Säulen aufgereinigt. Der Überstand wird auf die mit Puffer QBT äquilibrierte Säule gegeben, die Säule mit 30ml QC Puffer gewaschen und die DNA im Anschluss daran mit dem Puffer QF eluiert. Die DNA wird mit Isopropanol gefällt und pelletiert, mit 80% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen je nach Größe des Pellets in 200µl bis 500µl H₂O aufgenommen.

Analytischer und präparativer Verdau von Plasmid-DNA

Für analytische Zwecke wird 5µl der Mini-Präp-DNA oder 1µg der Maxi-Präp-DNA für 3h bei 37°C in einem Volumen von 20µl mit ca. 5 bis 10U des jeweiligen Restriktionsenzym im entsprechenden Restriktionspuffer inkubiert. Beim präparativen Verdau werden 20µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 70µl mit 50U des jeweiligen Restriktionsenzym im entsprechenden Reaktionspuffer über Nacht bei 37°C inkubiert.

Phenol- Chloroform- Extraktion von Nukleinsäuren aus proteinhaltigen Lösungen

Zur Entfernung von Proteinen werden die Nukleinsäuren in ihrer wässrigen Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol gemischt und anschließend die zwei Phasen durch zentrifugieren getrennt (12000x g; 5min). Proteine sammeln sich in der Interphase zwischen den Phasen. Die obere, wässrige Phase wird abgenommen und zweimal dem gleichen Volumen an Chloroform/ Isoamylalkohol durch mischen und Phasentrennung in der Zentrifuge gereinigt (12000x g; 5min). Die obere Phase wird jeweils weiter verwendet. Anschließend werden die Nukleinsäuren mit Ethanol präzipitiert.

Ethanol-Präzipitation von DNA

DNA wird aus ihrer wässrigen Lösung durch Zugabe von dem 2-3fachen Volumen an Ethanol/ NaAc bei -20°C für 30min gefällt und danach durch Zentrifugation pelletiert (12000x g; 10min). Das Pellet wird mit 80% Ethanol gewaschen und nochmals pelletiert (12000x g; 10min), danach wird es getrocknet und in H₂O aufgenommen. Ein Aliquot wird zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen bzw. die Konzentration photometrisch bestimmt.

Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Nukleinsäurenkonzentration zu bestimmen, muß die Absorption der Lösung im UV-Licht mit der Wellenlänge 260nm und 280nm gegen das reine Lösungsmittel gemessen werden. Einer Absorptionseinheit bei 260nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50µg/ml, einer RNA-Konzentration von 40µg/ml und einer Konzentration einzelsträngiger Oligonukleotide von

20µg/ml. Der Quotient der Absorption bei 260nm und 280nm ist ein Maß für die Reinheit der Probe und sollte bei DNA einen Wert von ca. 1,8, bei RNA einen Wert von ca. 2,0 annehmen.

Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Gemischen sowie der Größenbestimmung von DNA-Fragmenten werden horizontale Agarosegele verwendet. Die Agarose-Konzentration beträgt zwischen 0,8% bis 2% (in Abhängigkeit von der Fragmentgröße). Hierzu wird die Agarose in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und gelöst, nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wird Ethidiumbromid zugesetzt (0,5 µg/ ml) und das Gel gegossen. Den Proben wird 1/10 des Volumens 10x Probepuffer zugefügt. Als Laufpuffer dient 1x TAE-Puffer. Die Auftrennung erfolgt bei Feldstärken um 7V/ cm. Die Detektion der DNA-Fragmente im Gel erfolgt durch Fluoreszenz im UV-Licht (320nm).

Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Dialyseschläuche werden in ca. 7cm lange Stücke geschnitten und in Na₂CO₃ /EDTA 10min gekocht. Die Schläuche werden anschließend zwei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen und in 1mM EDTA autoklaviert. Anschließend werden sie bei 4°C gelagert.

Die Bande des DNA-Fragments wird mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in einen mit H₂O ausgespülten Dialyseschlauch überführt. Zu dem Gelstück werden 350µl TE gegeben und der Schlauch auf beiden Seiten dicht verschlossen. Anschließend wird das Fragment elektrophoretisch aus dem Gel extrahiert. Nach 45min wird die Polungsrichtung für 1min umgekehrt und schließlich die DNA-haltige Lösung aus dem Schlauch herauspipettiert, Phenol-/Chloroform extrahiert und Ethanol präzipitiert.

Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Angewandt wurde die „Random Primer“-Methode. Hierzu wird das zu markierende DNA-Fragment durch Erhitzen aufgeschmolzen und das Anhybridisieren kurzer DNA-Stücke kurzer randomisierter Sequenzen an die Einzelstränge erlaubt. Die Anhybridisierten Stücke dienen als Primer für die nachfolgende Polymerisation durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase 1 aus E. coli. in Gegenwart radioaktiv markierter NTPs werden durch deren Einbau die entstehenden DNA-Doppelstränge radioaktiv markiert. 20ng DNA werden in einem Volumen von 45µl für 5min auf 100°C erhitzt und denaturiert, anschließend für 5min bei 0°C inkubiert und in ein Rediprime-Reaktionsgefäß überführt, dieses Gefäß enthält bereits dNTPs, DNA-Polymerase und Reaktionspuffer. Zugegeben werden noch 5µl alpha-³²P dCTP (3000Ci/mol; 10mCi/ml) und der Reaktionsansatz bei 37°C für 10min inkubiert. Zur Trennung des markierten

Fragments von nicht inkorporierten Nukleotiden wird der Ansatz nach Zugabe von 50µl TE über eine Sephadex-G50-Säule aufgereinigt und diese mit 100µl TE nacheluiert.

Northern Blot

Der Blot wird 4h in Church-Puffer prähybridisiert, danach wird der Church-Puffer erneuert und die radioaktiv markierte Sonde zugegeben. Diese Sonde wird vor der Zugabe erhitzt (5min; 95°C) und danach sofort auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht, am nächsten Tag wird der Blot einmal mit Waschlösung I und dreimal mit der Waschlösung II bei 65°C gewaschen und in Folie eingepackt. Der aufgelegte Röntgenfilm wird nach 24h bis zu mehreren Tagen bei –80°C entwickelt und ausgewertet.

Ethanol-Präzipitation von DNA für ISH

DNA wird aus ihrer wässrigen Lösung durch Zugabe von dem 2-3fachen Volumen an Ethanol/NaAc bei –20°C für 30min gefällt und danach durch Zentrifugation pelletiert (12000x g; 10min). Das Pellet wird mit 80% Ethanol gewaschen und nochmals pelletiert (12000x g; 10min), danach wird es getrocknet und in 30µl DEPC-H₂O aufgenommen. 1µl des linearisierten Plasmids wird zur Kontrolle auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

Digoxigenin-Markierung von RNA

Der Ansatz besteht aus ca. 1µg des linearisierten Plasmids, 2µl Digoxigenin-Markierungs-Lösung, 2µl 10x Transskriptionspuffert und 2µl der RNA-Polymerase (T7, SP6); der Ansatz wird auf 20µl Gesamtvolumen mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Nach kurzem Mischen und Zentrifugieren wird der Ansatz bei 37°C für 2h inkubiert.

Anschließend wird das mit Digoxigenin markierte RNA-Transskript mit 5µl 4M LiCl-Lösung und 75µl kaltem 100% Ethanol bei –75°C für 30min gefällt. Die RNA wird mit 12000x g für 15min bei 4°C pelletiert, das Pellet anschließend mit 70% Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Es wird getrocknet und in 40µl DEPC-H₂O sorgfältig resuspendiert, anschließend gibt man noch 1µl RNase Inhibitor und 40µl Formamid dazu und lagert die Probe bei –20°C.

Fixierung und Aufbewahrung von Embryonen für *in Situ* Hybridisierungen

Die Embryonen für Totalpräparate werden über Nacht in 4% PFA bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag werden die Embryonen zweimal mit PBS für je 10min gewaschen und anschließend durch eine aufsteigende Methanolreihe (25%M; 50%; 75%; 100% Methanol in PBS) dehydriert.

Embryonen für Schnitte werden in Parafin eingebettet und die Schnitte unter Verwendung von DEPC-behandelten Lösungen am Mikrotom geschnitten.

Totalpräparat *in Situ* Hybridisierung

1. Tag:

Alle Arbeitsschritte erfolgen sofern nicht anders angegeben auf Eis. Die Embryonen werden in einer absteigenden Methanloreihe (100%; 75%; 50%; 25% Methanol in H₂O) rehydriert, dreimal mit PBSw für 5min gewaschen und mit 5µg/ml Proteinase K in PBSw bei Raumtemperatur inkubiert um endogene alkalische Phosphatasen zu zerstören. Die Inkubationszeit ist abhängig von der Größe der Embryonen sie liegt bei Embryonen Tag E7,5 bei 5min und kann bei Embryos Tag E12,5 bis auf 30min verlängert werden. Der Verdau wird durch 2mg/ml Glycin in PBSw gestoppt und die Embryonen erneut dreimal mit PBSw gewaschen. Sie werden mit 4% PFA, 0,2% Glutaraldehyd 15min refixiert, dreimal mit PBSw gewaschen und dann in 1ml 50% PBSw 50% Hybridisierungs-Mix überführt, die Lösung wird gegen 100% Hybridisierungs-Mix ausgewechselt, wenn die Embryonen in der Lösung abgesunken sind. Man ersetzt erneut die Hybridisierungs-Lösung und prähybridisiert die Embryonen bei 70°C für 2h im Wasserbad. Währenddessen wird die Probe vorbereitet, man erhitzt 200ng RNA Probe in 100µl Hybridisierungs-Mix

für 5min auf 95°C und kühlt diese anschließend sofort auf Eis herunter. Die Hybridisierungs-Lösung mit der Digoxigenin markierten RNA wird dem Prähybridisierungs-Mix zugegeben und die Embryonen darin bei 70°C über Nacht inkubiert.

2. Tag:

Zunächst wird die Hybridisierungs-Lösung durch 800µl frische Hybridisierungs-Mix und wäscht für 5min bei 70°C. Danach gibt man dreimal je 400µl 2xSSC pH4,5 zu, ersetzt den Mix völlig durch 2xSSC pH4,5 und wäscht zweimal in 2x SSC pH4,5. Anschließend wird mit dem MAB-Puffer gewaschen, davon zweimal 10min bei Raumtemperatur und zweimal 30min bei 70°C. Es folgen drei weitere Waschschrte mit PBSw 10min bei Raumtemperatur. Für die Inkubation mit dem Digoxigenin-Antikörper werden die Embryonen 2h bei 4°C im Antikörper-Puffer vorinkubiert und schließlich über Nacht bei 4°C mit dem Antikörper (1/10000) im Antikörper-Puffer inkubiert.

3. Tag:

Die Embryonen werden 6-mal für 45min in 0,1% BSA in PBSw gewaschen, danach zweimal für 30min mit PBSw und zweimal für 10min im AP1-Puffer (alle Schritte bei Raumtemperatur). Man ersetzt die Lösung durch BM purple-Lösung v und inkubiert die Embryonen bei Raumtemperatur oder zum Verlangsamen der Färbereaktion bei 4°C bis die Färbung sichtbar wird. Man stoppt die Färbereaktion durch mehrmaliges Waschen mit PBSw.

***In Situ* Hybridisierung auf Paraffin-Schnitten**

(Neubuser, Peters et al. 1997)

Die Schnitte werden in einem DEPC-H₂O-Wasserbad geschnitten, um Kontaminationen mit RNAsen zu vermeiden, werden Handschuhe getragen.

Glaswännchen, das Wasserbad und alle anderen Utensilien werden mit RNase-Zip behandeln.

1. Tag: Entwachsen/ Hydrieren/ Digoxigen markierte RNA

Die Schnitte werden mit Xylol zweimal je 10min deparafiniert und anschließend zweimal mit 100% Ethanol für je 5min gewaschen. Man rehydriert die Schnitte durch eine absteigende Ethanol-Reihe (95%, 80%, 70%, 50%, 30% Ethanol in DEPC-H₂O für je 1min), der zwei Rehydrierungsschritte mit PBS folgen (je 5min). Die Schnitte werden mit 4%PFA 30min fixiert und anschließend zweimal je 5min mit PBS gewaschen. Die Schnitte werden 10min lang mit der Proteinase K-Lösung angedaut, damit die RNA-Probe später besser in das Gewebe eindringen kann. Die Proteinase K wird 5min lang mit PBS abgewaschen und die Schnitte nochmals mit 4%PFA für 30min erneut fixiert. Das 4%PFA wird ebenfalls wieder mit PBS abgewaschen (2x 5min) und die Schnitte in 2xSSC zweimal für je 5min gewaschen. Anschließend werden die Objektträger in den Tris/Glycin-Puffer überführt und für mindestens 30min oder länger inkubiert, in dieser Zeit wird der Prähybridisierungslösung frisch angesetzt. Für jeden Objektträger werden 55µl Prähybridisierungslösung (als Hybridisierungslösung) benötigt. Dazu wird die Probe 1:100 mit Prä-Hyb verdünnt (~ 1ng/µl). Normalerweise setzt man für 4 Objektträger 250µl Prähybridisierungslösung an; der Hybridisierungslösung wird für 2min auf 95°C erhitzen, um die RNA zu denaturieren, und auf Eis schnell heruntergekühlt. Die Objektträger werden

mit der Prähybridisierungslösung abgespült und anschließend 55µl Hybridisierungslösung aufgetropft und der Objektträger zugedeckelt. Die Objektträger werden über Nacht in einer feuchten Kammer (DEPC-H₂O) bei 65°C inkubiert.

2. Tag: Waschen & Digoxigenin Antikörper

Die Objektträger mit Deckgläschen werden in 5x SSC stark geschüttelt bis sich die deckgläschen abgelöst haben, anschließend wird dreimal für 20min mit 5x SSC gewaschen. Anschließend wird stringent mit der Waschlösung I bei 60°C für 3h gewaschen. Die Objektträger kühlt man in frischer Lösung auf 37°C ab, dann wird mit NTE bei 37°C für 15min gewaschen. Die nicht hybridisierte RNA wird mit 10µg/ml RNase A in NTE bei 37°C für 30min verdaut, anschließend wird nochmals bei 37°C für 15min mit NTE gewaschen. Es folgt ein weiterer stringenter Waschschrift mit Waschlösung I (60 °C; 30 min) und ein Waschschrift mit 2x SSC (30min). Danach werden die Schnitte in 2% Block-Lösung für mind. 30min inkubiert während

die Antikörper-Lösung vorbereitet wird. Die fertige Lösung wird auf Eis gelagert. Dann formt man mit der Knetmasse kleine Kügelchen, mit denen man das Deckgläschen auf Abstand vom Objektträger halten kann. 500µl Antikörper-Lösung werden unter das Deckgläschen pipettiert, wobei man darauf achten muß, daß die Schnitte nicht austrocknen. Die Schnitte werden in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert.

3. Tag: Färbung

Die BM purple Färbelösung wird bei Raumtemperatur langsam erwärmt. Die Schnitte werden 6 mal mit 1x TBS gewaschen (10min), anschließend wäscht man 30min mit 0,1% Tween20, 0,5 mg/ ml Levamisol in H₂O. Die Färbelösung wird ebenfalls mit 1x Tween/ Levamisol versetzt und die Schnitte darin auf Knetfüßchen aufgeständert inkubiert. Die Färbung kann Tage bis Wochen dauern; die Färbelösung wird durch neue ersetzt, wenn Präzipitat sichtbar ist. Nach dem Färben werden die Schnitte über Nacht in PBS gewaschen und eingedeckelt.

Präparation genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Schwanzspitzen

Die Schwanzspitze wird in 710µl Tail-DNA-Puffer aufgenommen und noch 40µl Proteinase K Lösung zugegeben. Der Ansatz wird über Nacht bei 55°C inkubiert. Proteine werden durch Zugabe von 300µl 5M NaCl ausgesalzen und bei 13000rpm und 10°C für 10min abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.

Die DNA, die sich im Überstand befindet, wird durch Zugabe von 500µl Isopropanol und langsames Schütteln gefällt. Anschließend wird sie bei 13 000rpm und 10°C für 10min abzentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, daß heißt der Überstand wird vorsichtig abgekippt und der 70% Ethanol zugegeben, danach wird erneut bei 13 000rpm und 10°C für 5min zentrifugiert. Zuletzt wird das Pellet getrocknet und in 500µl H₂O bei 37°C über Nacht gelöst.

RNA-Isolierung für RT-PCR

Die RNA wird unter Verwendung des Micro-Fast Track Kit isoliert. Man verwendet pro Ansatz zwischen 110 und 200mg Gewebe. Mit dem Lysis Puffer wird das Gewebe für 15min bei 45°C inkubiert. Anschließend wird das Gewebe mehrmals zum Zerkleinern durch eine Nadel gezogen und nochmals für 10min inkubiert. 63µl 0,5M NaCl-Lösung werden zugegeben und durch Aufziehen in eine Spritze die DNA geschert. Anschließend werden die Oligo-dT-Zellulose Tabletten dazu gegeben und das Ganze 15 bis 20min leicht geschüttelt. Die Zellulose wird mit Binding-Puffer zweimal gewaschen, der Überstand jeweils verworfen. Man überführt die Suspension in die Zentrifugationssäulen und zentrifugiert bei 5000rpm je 10sec. Auf die Säule gibt man dreimal neuen Binding-Puffer und spült so die Zellulose. Anschließend wird durch Waschen mit Low salt-Puffer die nicht polyadenylierte RNA von der Zellulose gewaschen. Im

letzten Schritt wird die Poly A-RNA mit dem Elutions-Puffer von der Zellulose gewaschen und durch Zugabe von EtOH und Natriumacetat präzipitiert. Sie wird bei –20°C gelagert.

RT-PCR

Das Enzym Reverse Transkriptase ermöglicht die Synthese von cDNA aus RNA. Die erzeugte cDNA wird zur semiquantitativen PCR verwendet. Zur Synthese der cDNA wird ein Oligo dT-Primer verwendet, dieser Primer bindet an die polyA-Region der RNA und mit Hilfe der Reversen Transkriptase wird die doppelsträngige cDNA erzeugt. Man verwendet 1-5µg der aufgereinigten RNA, 1µl Oligo dT-Primer (500µg/ml) und füllt das Volumen auf 12µl auf. Der Ansatz wird 10min auf 70°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Dann werden 4µl 5x 1. Strang Puffer, 2µl DTT 0,1M und 1µl 1mM dNTPs zugegeben. Man erhitzt diesen Ansatz für 2min auf 42°C, danach wird die SuperscriptII-Polymerase zugegeben und der Ansatz 50min bei 42°C inkubiert. Die erzeugte cDNA wird bei –20°C gelagert.

PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Für eine PCR-Reaktionen wurde folgendes Pipettierschema durchgeführt:

5-10µl DNA; 1,5µl MgCl₂ 100mM; 5µl 10x PCR-Puffer; 1µl dNTP 10mM; je 1 µl Primer (15 pmol/µl); 0,5µl Taq-Polymerase (5U/µl) ; add H₂O 50µl ;

Der fertige Versuchsansatz wurde mit dem entsprechenden Programm in den Thermocycler gestellt. Dann wurde ein von den Primern abhängiges Temperaturprogramm mit 25-37 Zyklen durchgeführt, ein Zyklus besteht aus drei Temperaturschritten. Die DNA wird bei 94°C denaturiert, gefolgt von einem Primer-Annealingschritt (Temperatur zwischen 50-60°C je nach Primern), anschließend erfolgt die Komplementärstrang-Synthese bei 72°C. Anschließend wird die PCR auf 4°C abgekühlt und kann gelagert werden. Die PCR-Bedingungen sind:

AP-2 alpha-PCR	AP-2 beta-PCR	AP-2 gamma-PCR
	94°C 5min	94°C 3min
35x	30x	37x
94°C 45sec	94°C 30sec	94°C 30sec
52°C 30sec	58°C 30sec	55°C 30sec
72°C 30sec	72°C 30sec	72°C 45sec
4°C ~	4°C ~	4°C ~

MORE-PCR	Wnt1-PCR	GAPDH-PCR	Tubulin-PCR
35x	35x	30x	30x
94°C 45sec	94°C 45sec	94°C 30sec	94°C 30sec
55°C 30sec	53°C 30sec	55°C 30sec	55°C 30sec
72°C 60sec	72°C 30sec	72°C 45sec	72°C 45sec
4°C ~	4°C ~		
Efemp-1-PCR	KLF4-PCR	Mtd-PCR	Stra13-PCR
	94°C 3min		
35x	35x	35x	35x
94°C 30sec	94°C 30sec	94°C 30sec	94°C 30sec
55°C 30sec	58°C 30sec	55°C 30sec	55°C 30sec
72°C 30sec	72°C 30sec	72°C 30sec	72°C 30sec
4°C ~	4°C ~	4°C ~	4°C ~

Zucht von Mäusen

Die Tiere werden in Plastikkäfigen auf Streu gehalten und erhalten Trockenfutter und Wasser ad libitum. Der Nachtzyklus des konstanten Tag-Nacht-Rhythmus dauert von 19Uhr bis 6Uhr. Die Tiere werden zur Identifikation mit nummerierten Metall-Ohrmarken versehen; Schwanzspitzenbiopsien durch coupieren gewonnen. Die Tötung erfolgt durch cervicale Dislokation.

X-Gal Färbung

Die Embryos werden direkt nach dem Präparieren zweimal mit Rinse+ gewaschen und danach für 1h in Fixationslösung fixiert. Sie werden erneut in Rinse+ gewaschen und über Nacht in der Stain-Lösung bei 37°C inkubiert. Nach der Färbung werden die Embryonen zum Stoppen der Färbereaktion erneut mit Rinse+ oder PBS gewaschen.

Skelettanalyse: Knochen und Knorpelfärbung

Bei Embryonen (älter als E 16,5) und neugeborenen Mäusen wird zuerst die Haut abgezogen werden, um ein besseres Eindringen der Färbelösungen zu gewährleisten. Dazu werden die Tiere über Nacht gewässert und anschließend für 1- 2min in einem 65°C Wasserbad erhitzt, dadurch löst sich die Haut ab und kann einfach entfernt werden. Die Eingeweide

werden ebenfalls entfernt, benötigt man sie zum Genotypisieren, werden sie gleich nach dem Töten entnommen. Bei ältere Tiere präpariert man das Skelett grob frei.

Nach der Präparation werden die Tiere drei Tage in 100% Ethanol gelagert und anschließend für ca. 12h in Alzian-Blau inkubiert (Knorpelfärbung). Die Präparate werden mit 100% Ethanol für mind. 12h gewaschen und dann in 2% KOH überführt. Das weiche Gewebe wird verdaut und die Tiere werden allmählich durchsichtig, außerdem werden sie sehr fragil. Die Knochen werden mit Alizarin-Rot für 6h gefärbt und das Präparat anschließend nochmals unter ständiger Kontrolle des Verdaus in KOH inkubiert. Man lagert die Tiere nach der Färbung in 25% Glycerin bei Raumtemperatur.

Isolierung von Embryonen

Nach dem Töten der trächtigen Maus wird der Bauch mit 70% Ethanol gereinigt und dann ein kurzer Schnitt gemacht. Man reißt das Fell weiter auf und eröffnet dann mit einem median Schnitt das Peritoneum. Der Uterus duplex wird entnommen und in kaltem PBS der Länge nach aufgeschnitten, die Embryonen zusammen mit der Eihäuten und der Plazenta entnommen und anschließend unter dem Binokular präpariert. Die Eihäute können zur Genotypisierung verwendet werden.

Fixierung von Embryonen, Mäusen und Organen

Die Fixierung der Embryonen, der Mäuse und der Organe erfolgte je nach Weiterbearbeitung mit unterschiedlichen Fixanzen.

Für einfache histologische Untersuchungen werden die Präparate über Nacht bei 4°C in 4% Formol fixiert. Für die ISH werden die Embryonen unter den gleichen Bedingungen in 4% PFA fixiert, am nächsten Tag zweimal in PBS gewaschen und durch eine aufsteigende Methanolreihe in 100% Methanol überführt, man kann sie dann bei -20°C lagern.

Für eine verbesserte Fixierung von Hodengewebe wird als Alternative noch Bouins Fix, ein Pikrinsäure-Formol-Eisessig-Gemisch, benutzt. Die entsprechenden Gewebe werden für eine Stunde in der frisch angesetzten Lösung fixiert und anschließend mehrmals gründlich (bis zum Auswaschen der gelben Farbe) mit 80% Ethanol gewaschen. Dann erfolgt die weitere Entwässerung und die Einbettung.

Einbetten von Embryonen und Geweben in Parafin

Nach der Fixierung werden die Präparate ausgiebig gewässert und in die Einbettkassetten eingelegt. Im Gewebeeinbettautomat werden die Objekte erst durch eine Ethanolreihe (50%, 60%, 70% Ethanol, je 1h; 80%, 90%, 2x 100% Ethanol je 40min) geführt, anschließend dreimal

mit Xylol gewaschen (für 20min, 30min, 30min) und zum Schluss dreimal mit Paraplast (für 10min, 30min, 40min bei 60°C) perfundiert. Nach Ablauf des Einbettprogramms werden die Gewebeteile und Tiere in Einbettformen positioniert und mit flüssigem Parafin (60°C) übergossen, in das Wachs wird die Halterung für das Mikrotom eingegossen. Das Parafin härtet aus, die Präparate werden aus den Formen gelöst und die Parafinblöcke mit dem Skalpell zurechtgeschnitten.

Herstellung von histologischen Schnitten

Die Parafinblöcke werden ins Mikrotom eingespannt und mit einer Schnittdicke von ca. 7µm geschnitten. Die Schnitte werden in ein 40°C warmes Wasserbad gelegt und nachdem sie sich durch die Oberflächenspannung des Wassers geglättet haben auf Objektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet. Für ISH werden die Geräte von RNAsen befreit und DEPC behandelte Lösungen verwendet.

Färbung von histologischen Schnitten mit Hämatoxylin/Eosin (HE)

Die Objektträger mit den histologischen Schnitten werden zweimal mit Xylol (je 5 min) deparafiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe (je 5 min) in H₂O überführt. Anschließend werden sie für 5 min mit Meyers Hämalaun gefärbt. Vor der Eosinfärbung (1 min) werden die Schnitte unter fließendem Wasser gründlich gewässert. Nach der Eosinfärbung wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Ethanolreihe (je 5 min, RT) wieder zurück nach Xylol (2 x, je 5 min) verbracht und anschließend, nach kurzer Trocknung mit Eukitt® eingedeckelt.

Färbung durch endogene alkalische Phosphatasen

Die Objektträger mit den histologischen Schnitten werden zweimal mit Xylol (je 5 min) deparafiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe (je 5 min) in H₂O überführt. Anschließend werden die Schnitte in BMpurple für einige Stunden bis zu mehreren Tagen bis zum Erreichen einer ausreichenden Färbung gefärbt.

TUNEL-Färbungen

TUNEL-Färbungen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die histologischen Schnitte werden dreimal für 5min in Xylol deparafiniert, zweimal mit 100% Ethanol gewaschen und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (95%, 70%, 50% Ethanol in PBS) rehydriert und anschließend in PBS gewaschen. Die Schnitte werden mit 20µg/ ml Proteinase bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit H₂O gewaschen (3x je 2min). Die endogene Peroxidase wird durch Inkubation mit 3% H₂O₂ in PBS abgesättigt (5min) und danach werden

die Schnitte mit PBS gewaschen (2x 5min). Man lässt die Objektträger abtropfen und entfernt vorsichtig die auf der Oberfläche haftenden Flüssigkeitstropfen ohne das der Schnitt austrocknet, die Schnitte werden dann mit 75µl Equilibrationspuffer bedeckt und nach 10sec wird der Puffer abgesaugt und durch 55µl/cm² TdT Enzym im mitgelieferten Reaktionspuffer ersetzt. Man inkubiert in einer feuchten Kammer bei 37°C für 1h, nachher wird die Reaktion im Stop-Waschpuffer beendet. Die Objektträger werden dazu kurz in der Lösung geschüttelt und dann für 10min inkubiert. Man wäscht dreimal kurz mit PBS, überflüssige Lösung wird mit einem Papiertuch abgesaugt und der an Peroxidase gekoppelte anti-Digoxigenin Antikörper aufgetropft (65µl/cm²), die Schnitte inkubiert man für 30min in einer feuchten Kammer. Die Schnitte werden in H₂O gewaschen und AEC aufgetropft. Nach 15-20 min kontrolliert man das Fortschreiten der Färbung im Mikroskop und beendet die Färbung durch Abwaschen der Färbelösung mit H₂O. Es wird mit Haematoxyllin gegengefärbt (siehe Färbung von histologischen Schnitten mit HE). Die Schnitte werden mit Aquatex eingedeckelt.

Karmingefärbtes Totalpräparate von Mausbrustdrüsen

Die Brustdrüse wird nach dem Präparieren auf einem Objektträger flach ausgebreitet und nach kurzem Antrocknen über Nacht in 4% Formol fixiert. Das Totalpräparat wird in H₂O gewaschen und durch eine Alkoholreihe (70%, 85%, 90%, 95% Ethanol; je 15min) in 100% Alkohol überführt. Anschließend wird das Gewebe zweimal für 24h mit Aceton entfettet. Das Präparat wird über die Alkoholreihe wieder in H₂O überführt und in frisch angesetzter Karminlösung gefärbt. Das Präparat wird mit Aquatex eingedeckelt.

Knochen-Knorpel-Färbung

Um Embryonen älter als Tag E16, Neugeborene oder auch ältere Tiere zu färben muss zuerst die Haut entfernt werden. Dazu quillt man die Tiere über Nacht in H₂O, wenn man sie dann für 1 bis 2min in 65°C inkubiert, löst sich die Haut ab und sie kann leicht entfernt werden. Die Eingeweide der Tiere müssen ebenfalls entfernt werden und können für die Genotypisierung der Embryonen verwendet werden. Bei älteren Tieren präpariert man das Skelett möglichst weit frei um das Durchdringen der Tiere mit den Lösungen zu erleichtern.

Nach dem Entfernen der Haut werden die Tiere für drei Tage in 100% Ethanol gelagert und anschließend in Alcian-Blau-Lösung für 24h bei leichtem Schaukeln gefärbt. Die überschüssigen Farbstoffe werden mit 100% Ethanol für mindestens 12h ausgewaschen und die Tiere anschließend in die 2% KOH-Lösung überführt und für 6h inkubiert. Die KOH-Lösung verdaut das weiche Gewebe, und dieser Vorgang muss beobachtet werden, damit die Tiere nicht zu stark zersetzt werden und auseinanderfallen. Anschließend folgt die Knochenfärbung mit der Alizarin-Rot-Lösung, die Präparate werden darin für 6 bis 12h bei leichtem Schaukeln

gefärbt. Die überschüssige Farbe wird mit der KOH-Lösung ausgewaschen bis die Tiere durchsichtig sind. Sie werden über eine aufsteigende Glycerinreihe in 100% Glycerin überführt und darin gelagert.

Elektronenmikroskopie

Die präparierten Objekte werden in kleine Stücke geschnitten und in der Immersionslösung über Nacht fixiert. Anschließend werden sie zweimal für 15min im Cacodylatpuffer gespült und für 2h in der Nachfixierungslösung inkubiert. Sie werden erneut zweimal für 15min im Cacodylatpuffer gewaschen und durch eine modifizierte aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Die modifizierte Alkoholreihe besteht aus folgenden Schritten:

30% Ethanol für 5min; 50% Ethanol für 10min; 70% Ethanol mit 5% Uranylacetat bei 4°C für 90min; 70% Ethanol und 90% für je 10min; zweimal 96% Ethanol für 10min; dreimal 100% Ethanol für 15min;

Danach werden die Gewebe in Propylenoxyd überführt und darin dreimal für je 10min inkubiert. Über Nacht werden die Proben in einer Mischung aus Propylenoxyd und Epon C (1:1) inkubiert. Am nächsten Tag lässt man die Gewebe in Epon C einsinken (ca. 1h), sie werden in die Gießkapseln überführt und nach dem Einsinken werden die Gewebe durch Polymerisation (24h) bei 70°C in den Kunststoff eingebettet. Danach werden Ultradünnschnitte (50nm) angefertigt, diese mit der Nachkontrastierungslösung inkubiert und schließlich mit Hilfe des Elektronenmikroskop fotografiert und analysiert.

Ergebnisse

Gewebsspezifischer AP-2 gamma KO

In dem folgenden Abschnitt soll die Rolle von AP-2 gamma während der Entwicklung und im adulten Tier untersucht werden. Ausgangspunkt ist die Arbeit von Werling, der die AP-2 gamma defiziente (Werling und Schorle 2002) und konditional defizienten Tiere (Werling und Schorle 2002) hergestellt hat und die AP-2 gamma defizienten Tiere analysiert hat. Die AP-2 gamma defizienten Tiere sind aufgrund eines Plazentadefekts früh embryonal letal. Um die Funktion von AP-2 gamma in der späten Embryonalentwicklung und im ausgewachsenen Tier zu untersuchen wurden gewebsspezifische Mausmutanten erzeugt. In diesen Mutanten kann der plazentale Phänotyp umgangen werden und durch Analyse verschiedener gewebsspezifischer Mutanten die einzelnen Funktionen von AP-2 gamma unabhängig von einander untersucht werden.

Folgende Tierlinien standen zur Verfügung:

- AP-2 gamma defiziente Linie (AP-2 gamma^{wt/KO}) (Werling und Schorle 2002)
- konditionale AP-2 gamma Mutante (AP-2 gamma^{wt/cKO}) (Werling und Schorle 2002)
- transgene Cre-Rekombinase-Mauslinien unter Kontrolle des Mox2-Promotor (MORE^{wt/cre}) (Tallquist und Soriano 2000)
- transgene Cre-Rekombinase-Mauslinien unter Kontrolle des Wnt1-Promotors (Wnt1^{wt/cre}) (Chai, Jiang et al. 2000)

Der Epiblast spezifische Phänotyp (MORE-KO)

Die heterozygot transgene Cre-Mauslinien unter Kontrolle des Mox2-Promotor wurde in die AP-2 gamma heterozygot defiziente Linie (AP-2 gamma^{wt/KO}) eingekreuzt um Tiere zu erhalten, die sowohl ein AP-2 gamma KO-Allel tragen als auch das MORE-Transgen (Mox2Cre-Recombinase).

Die heterozygot konditionale AP-2 gamma Tiere (AP-2 gamma^{wt/cKO}) wurde zunächst miteinander verpaart um homozygote Tiere (AP-2 gamma^{cKO/cKO}) zu erhalten. Diese Tiere wurden letztendlich mit den AP-2 gamma heterozygoten MORE-transgenen Tieren (AP-2 gamma^{wt/KO} MORE^{wt/cre}) verpaart. Nach Mendel sollten 25% der Nachkommen sowohl das MORE-Transgen als auch ein konditionales und ein KO-Allel tragen (Abbildung 12). In Geweben mit aktiver Cre-Rekombinase, wird dann das konditionale Allel (cKO) durch die Loop-out-Reaktion zu einem KO-Allel umgewandelt und man erhält gewebespezifischen AP-2 gamma Knockout-Tiere. Dieses *in vivo* erzeugte KO-Allel bezeichne ich im weiteren Verlauf mit

(c)KO, um darzustellen, dass die Loop-out-Reaktion je nach Expression der Cre-Rekombinase nur in einem Teil der Gewebe stattgefunden hat.

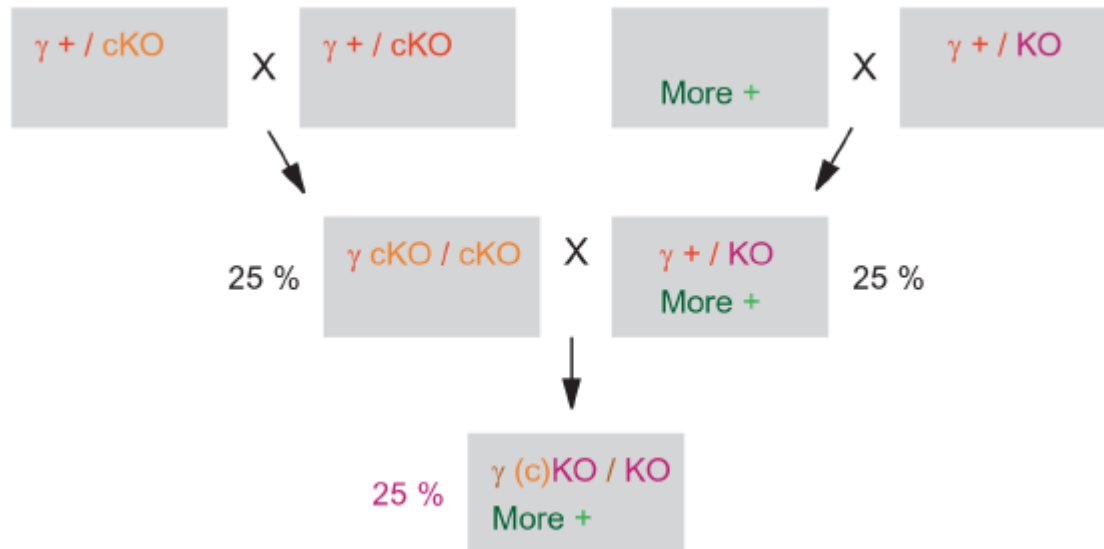


Abbildung 12 Verpaarungsschema für Epiblast spezifische Phänotyp (MORE-KO)

In erster Generation werden die konditionalen AP-2 gamma Allele auf Homozygotie gezüchtet und das MORE-Transgen in die AP-2 gamma KO-Linie eingekreuzt (F1-Generation). Je 25% der Tiere haben den zur weiteren Verpaarung benötigten Genotyp. Die Ausbeute an konditionalen KO-Tieren beträgt in der F2-Generation 25%.

cKO: konditionales Allel; KO: Knockout-Allel; (c)KO: gewebspezifisch erzeugtes KO-Allel;

Aktivität der Cre-Rekombinase unter dem Mox2-Promotor

Die Aktivität einer Cre-Rekombinase und die Effizienz der Loop-out-Reaktion lässt sich mit Hilfe der transgenen R26R Mauslinie (Rosa26-Cre-Reporter) zeigen. In dieser transgenen R26R-Tierlinie wurde in den Rosa26-Locus ein LacZ-Gen eingefügt. Das LacZ-Gen wird nur exprimiert, wenn durch die Cre-Rekombinase ein zwischen dem Rosa26-Promotor und dem LacZ-Gen liegender DNA Bereich entfernt wurde. Zellen und Gewebe, in denen eine Loop-out-Reaktion stattgefunden hat, lassen sich anschließend durch eine LacZ-Färbung nachweisen.

In der Literatur wurde beschrieben, dass die Cre-Rekombinase unter dem Mox2-Promotor (MORE) in allen embryonalen Geweben aktiv ist, obwohl das endogene Mox2-Gen während der Embryonalentwicklung nur in epithelialen Somiten und später im Sclerotom und Gliedmaßenmuskulatur exprimiert wird (Tallquist und Soriano 2000). Um die Expression der Mox2-Cre-Rekombinase zu verifizieren wurden MORE-Mäuse mit R26R-Mäusen verpaart. 25% der Tiere erhalten das Rosa26Reporter-Allel und des MORE-Transgen, in diesen Tieren findet die gewebespezifische Loop-out-Reaktion statt und kann mittels LacZ-Färbung

nachgewiesen werden. Es bestätigte sich die Ergebnisse aus der Literatur. Obwohl das endogene Mox2-Gen nur in einem Teil des Embryos aktiv ist, wird das Transgen unter dem selben Promotor im gesamten Embryo exprimiert. In Abbildung 13A ist ein Embryo Tag E12,5 gezeigt, der komplett blau gefärbt ist. Das bedeutet, dass die Cre-Rekombinase in nahezu allen embryonalen Zellen exprimiert wurde, aktiv war und eine Loop-out-Reaktion stattgefunden hat.

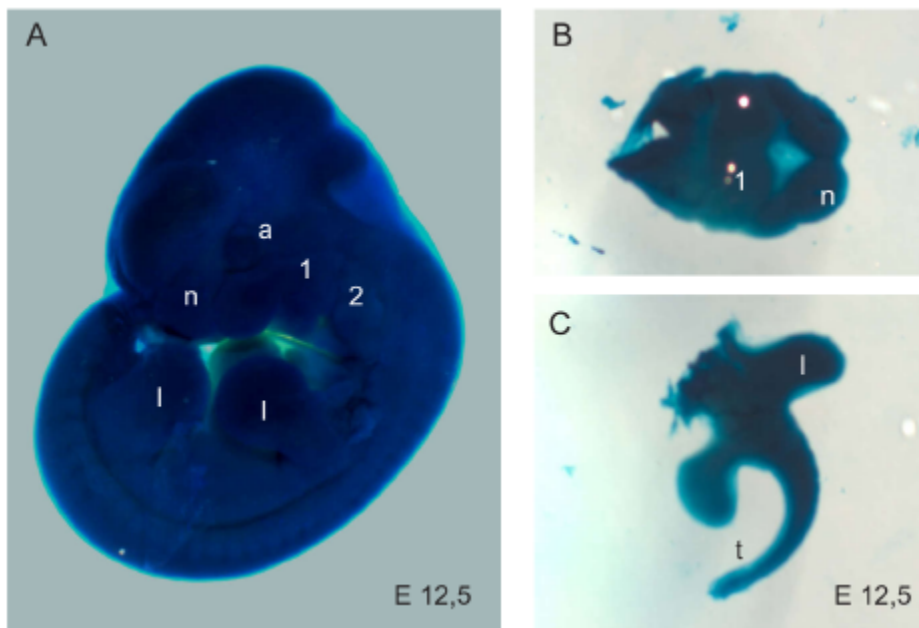


Abbildung 13 MORE-Cre Rekombinase Expression

LacZ-Färbung eines Embryo (E12,5) aus der Verpaarung von R26R x MORE-Cre-Transgenen:
A: Seitenansicht Embryo (E12,5); **B:** Querschnitt durch den Kopf im Bereich der Mundhöhle;
C: Aufsicht auf die hintere Gliedmaßen und einen Teil des Rückens l: Gliedmaßenknospe; n: fronto-nasaler Prozeß; a: Auge; 1: 1. Kiemenbogen; 2: 2. Kiemenbogen; t: Schwanz;

Loop-out-Reaktion in konditionalen AP-2 gamma Tieren

Nachdem die *mox2*-Cre-Rekombinase in allen embryonalen Zellen aktiv ist, erwartet man in Tieren des Genotyps AP-2 gamma^{cKO/KO} MORE^{wt/cre}, dass das konditionale Allel im kompletten Embryo durch die Loop-out-Reaktion in ein KO-Allel umgewandelt wurde und Epiblast spezifische KO-Tiere entstanden sind. Diese Tiere werden im weiteren Verlauf als KO^{MORE}-Tiere bezeichnet.

Alle Nachkommen aus der Verpaarung von AP-2 gamma^{WT/KO} MORE^{wt/cre} Tieren mit AP-2 gamma^{cKO/cKO} Tieren wurden durch PCR genotypisiert. Es wurde zum einen eine PCR zum Nachweis der unterschiedlichen AP-2 gamma Allele durchgeführt (Abbildung 14A) und eine PCR zum Nachweis des MORE-Transgens (Abbildung 14B).

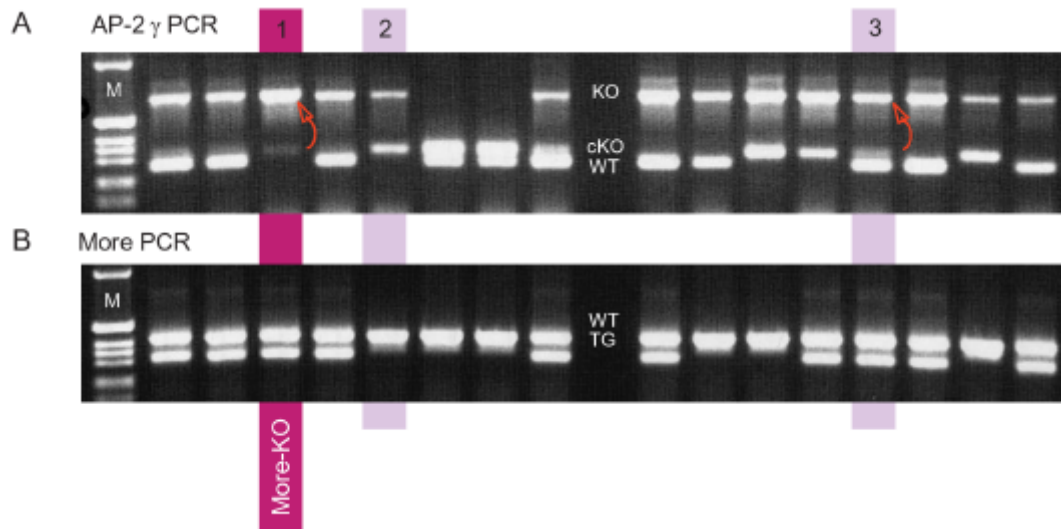


Abbildung 14 Genotypisierung

PCR zum Nachweis von AP-2 gamma Allelen und des MORE-Transgens (Gelfoto):

A: Nachweis der AP-2 gamma Allele: In der ersten Spur wurde der Größenstandart (M) aufgetragen, in den folgenden Spuren wurden die PCR-Proben aufgetragen, jede Spur entspricht einem Tier; die Bande des KO-Allels liegt bei 700bp; die Bande des cKO-Allels bei 343bp und die Bande des WT-Allels bei 300bp; der rote Pfeil stellt die Umwandlung des konditionalen Allels in ein KO-Allel dar.

B: Nachweis des More-Transgens:

In der ersten Spur wurde der Größenstandart (M) aufgetragen, in den folgenden Spuren die PCR-Proben; jede Spur entspricht einem Tier; die Bande des WT-Allels liegt bei 430bp; die Bande des transgenen Allels bei 320bp;

Die übereinander angeordneten Spuren der AP-2 gamma PCR und der MORE-PCR gehören jeweils zu einem Tier, die PCR-Ergebnisse dreier unterschiedlicher Tiere wurden farblich unterlegt.

Trägt ein Tier sowohl ein konditionales Allel als auch das MORE-Transgen, ist das konditionale Allel nicht mehr detektierbar, da es in ein KO-Allel umgewandelt wurde (roter Pfeil). Tier 1 besaß bereits ein KO-Allel, so dass es nach der Loop-out-Reaktion zwei KO-Allele hatte und daher AP-2 gamma defizient war (KO^{MORE}). Tier 2 hatte einen ähnlichen Genotyp, es hatte ebenfalls ein konditionales und KO-Allel. Es fehlte allerdings die Cre-Rekombinase, so dass in diesem Tier keine Loop-out-Reaktion stattfand, die konditionale Bande blieb erhalten. Tier 3 hingegen exprimerte die Cre-Rekombinase, aus dem cKO-Allel wurde ein KO-Allel (roter Pfeil), allerdings besaß es außerdem ein WT-Allel, dass erhalten geblieben ist. Es ist daher kein KO^{MORE} -Tier, sondern ein AP-2 gamma heterozygotes Tier. Bei diesem Tier fällt außerdem auf, dass die konditionale Bande nicht vollständig verschwunden ist, eine schwache Bande in der Größe von 343bp ist immer noch zu erkennen. Das bedeutet, dass in diesem Fall die Loop-out-

Reaktion nicht in allen Zellen stattgefunden hat, obwohl die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Mox2-Promotors in allen Zellen exprimiert wird (Abbildung 13).

Effizienz der Loop-out-Reaktion

Um die Effizienz der Loop-out-Reaktion am konditionalen AP-2 gamma Allel zu untersuchen wurden unterschiedliche Organe von KO^{MORE}-Tiere mittels PCR genotypisiert. In den meisten KO^{MORE}-Tiere oder KO^{MORE}-Organen ließ sich keine oder nur eine schwache konditionale Bande amplifizieren.

In dem KO^{MORE}-Tiere aus Abbildung 15A läßt sich zeigen, dass in allen Geweben eine Loop-out-Reaktion stattgefunden hatte, es ließ sich keine konditionale Bande mittels PCR nachweisen. Zur weiteren Bestätigung dieses Ergebnis wurde zusätzlich noch eine PCR alleine mit WT-Primern zum Nachweis des cKO- oder WT-Allels durchgeführt und die Zyklenzahl der PCR zur Erhöhung der Sensitivität um 5 Zyklen verlängert. In dieser PCR war nur in der Positiv-Kontrolle eine cKO-Bande amplifizierbar, in allen anderen Spuren wurde keine spezifische Bande amplifiziert. Folglich hat in diesem Tier die Loop-out-Reaktion vollständig stattgefunden.

Im Gegensatz dazu sind in den Tieren aus Abbildung 15B die konditionale Bande schwach erhalten geblieben, das bedeutet, dass in einem Teil der Zellen keine Loop-out-Reaktion stattgefunden hatte und diese Zellen immer noch ein funktionsfähiges konditionales AP-2 gamma Allel besitzen. In Tier 2 ist ein unterschiedliche Effizienz der Loop-out-Reaktion zu sehen. Während die Loop-out-Reaktion in der Brustdrüse komplett stattgefunden, ist in der Schwanzspitze in wenigen Zellen die konditionale Bande erhalten geblieben. Es hat in einem geringen Teil der Zellen keine Loop-out-Reaktion stattgefunden. Eine Ausnahme stellt das Tier in Abbildung 15C dar, hier wurden starke Unterschiede in der Effektivität der Loop-out-Reaktion in unterschiedlicher Gewebe festgestellt. In einigen Geweben (Lunge, Pankreas) ist nahezu keine konditionale Bande mehr nachweisbar. In anderen Geweben (Haut, Brustdrüse) jedoch hat die Loop-out-Reaktion nur selten oder gar nicht stattgefunden.

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass es im Falle des konditionalen AP-2 gamma Allels zu einer geringeren Effizienz der Cre-Rekombinase kommt. In manchen Tieren blieb in einem Teil der Zellen das funktionsfähige konditionale Allel erhalten. Man kann daher von einem mosaikartigen Genotyp sprechen. In den meisten KO^{MORE}-Tieren reicht die Effizienz der Loop-out-Reaktion aus den Großteil der konditionalen Allele in KO-Allele umzuwandeln. Eine mildere Ausprägung eines Phänotyps oder eine starke Varianz des Phänotyps kann also auch zusätzlich durch den zusätzlichenn Faktor Loop-out-Effizienz entstehen. Diese

unterschiedliche Effizienz der Loop-out-Reaktion erschwert die Einschätzung der beobachteten und analysierten Phänotypen.

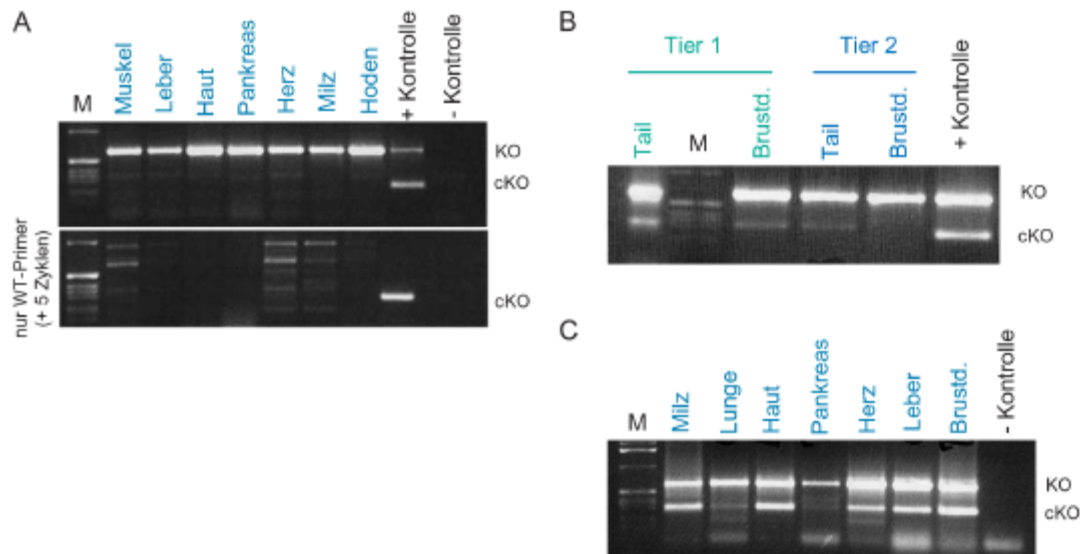


Abbildung 15 Effizienz der Loop-out-Reaktion

PCR unterschiedlicher Gewebe verschiedener Tiere **A**: PCR eines adulten KO^{MORE}-Männchens ohne Spina bifida; **B**: PCR zweier KO^{MORE}-Tiere: je Schwanzspitzenbiopsie-DNA und DNA aus der Brustdrüse; **C**: PCR verschiedener Gewebe eines KO^{MORE}-Weibchens; M: Marker; KO: Knockout-Allel; cKO: konditionals Allel;

Spina bifida

Parallel zur Genotypisierung wurden zunächst Neugeborene und adulte Tiere untersucht. Der Großteil der Tiere zeigte sich zunächst *in vivo* völlig unauffällig. Nur ein Teil der Tiere wurden bereits mit einem sichtbaren Phänotyp geboren. Diese Tiere hatten eine Spina bifida im Bereich der Lenden- und Sakralwirbelsäule. Ein Teil dieser Tiere (35%) hatte zusätzlich einen abgeknickten oder gekräuselten Schwanz, dieses Phänomen wird in der Literatur auch als „curly tail“ (ct) bezeichnet.

In Abbildung 16B sind zwei unterschiedlich stark betroffene Tiere mit Spina bifida (Tier 2 und Tier 3) gezeigt. Beide Tiere haben eine Spina bifida im Bereich der Lenden- bzw. Sakralwirbelsäule. Tier 3 ist wesentlich schwerer von der Spina bifida betroffen. Die Spina bifida beginnt höher als bei Tier 2 und sie endet auch wesentlich tiefer im Bereich des Schwanzansatzes (Abbildung 16C; roter Pfeil). Während bei Tier 2 nur ein Hautdefekt und ein Wirbeldefekt zu finden ist, sieht man bei Tier 3 in Abbildung 16C, dass die Meningen über die Länge einiger Lendenwirbel hinweg nicht geschlossen haben (gelbe Pfeile). Außerdem ist der Schwanz leicht abgeknickt (Abbildung 16B; grüner Pfeil), es handelt sich um einen sogenannten „curly tail“ (ct: gekräuselter/geknickter Schwanz).

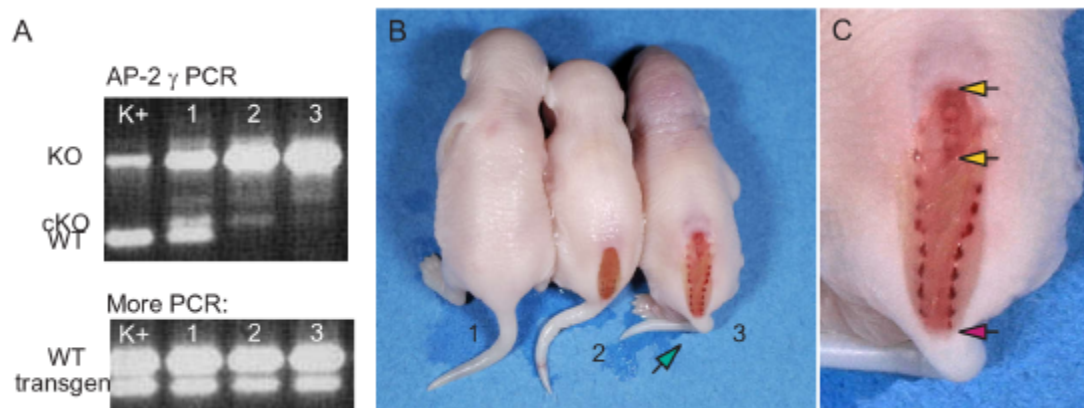


Abbildung 16 Neugeborene mit Spina bifida

A: PCR-Genotypisierung der Neugeborenen:

AP-2 gamma PCR von 3 Tieren und Kontrolle (K+); wt: Nachweis des Wildtyp-Allels; cKO: Nachweis des konditionalen Allels; KO: Nachweis des Knockout-Allels;

MORE-PCR/ Nachweis des Transgens: wt: Wildtyp-Allel; t: transgen;

B: Dorsale Ansicht der drei Neugeborenen: Tier 1 ist Kontrolle; Tier 2 und Tier 3 haben eine Spina bifida verschiedener Ausprägung; Tier 2 hat eine überwachsene Spina bifida, Bei Tier 3 ist die Spina bifida offen, es hat außerdem einen Knick im Schwanz (grüner Pfeil)

C: Aufsicht Spina bifida von Tier 3: Die Hautläsion betrifft nur den Bereich von 3-4 Lendenwirbeln (gelbe Pfeile); während sich die Spina bifida von den Lendenwirbeln bis unterhalb der Sakralwirbel (roter Pfeil) zieht;

Beide Tiere (Tier 2 und 3) haben einen AP-2 gamma^{(c)KO/KO} MORE^{wt/Cre} Genotyp (Abbildung 16A). Bei Tier 3 hat die Loop-out-Reaktion in nahezu allen Zellen der Gewebebiopsie stattgefunden, eine konditionale Bande ist nicht zu erkennen. Bei Tier 2 hingegen ist die konditionale Bande bei 350bp noch schwach zu erkennen, das bedeutet, dass die Loop-out-Reaktion nicht in allen Zellen stattgefunden hat. Das Tier mit kompletter Loop-out-Reaktion (Tier 3) ist wesentlich schwerer von der Spina bifida betroffen als das Tier mit mosaikartiger, unvollständiger Loop-out-Reaktion (Tier 2). Die unterschiedliche Effizienz der Loop-out-Reaktion kann man jedoch nicht direkt mit der Spina bifida korrelieren, da das zur Genotypisierung verwendete Gewebe aus der Bauchhaut stammt und keine genaue Aussage darüber zulässt wie effizient die Loop-out-Reaktion im Bereich der Spina bifida war. In Abbildung 15 wurde lediglich gezeigt, dass es zu einem Tiere mit nahezu kompletter Loop-out-Reaktion gibt und andere mit sehr schlechter Loop-out-Effizienz. In den meisten Fällen war es jedoch so, dass das zur Genotypisierung verwendete Gewebe eine ähnliche Loop-out-Effizienz zeigte wie andere untersuchte Gewebe.

Die Bildung der Spina bifida lässt sich auch während der Embryonalentwicklung verfolgen. In Abbildung 17 sind Embryonen Tag E9,5 dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt hat sich im WT-Embryo (A, B) das Neuralrohr bereits vollständig geschlossen und die Schwanzknospe (C) beginnt auszuwachsen. Im KO^{MORE}-Embryo hingegen hat sich das Neuralrohr nicht vollständig geschlossen, man erkennt am caudalen Enden einen aufklaffenden Bereich (D, E). In Abbildung 17F sieht man, dass es sich nicht nur um den nicht geschlossenen Neuroporus handelt, sondern dieser Bereich sich länglich gestreckt über das dorsale Ende des Neuralrohrs hinwegzieht. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich, dass es sich bei der Entwicklung der Spina bifida in den AP-2 gamma defizienten Tieren nicht nur um einen verzögerten oder inkompletten Schluss des caudalen Neuroporus handelt, sondern eine deutlich größere Region des caudalen Neuralrohrs von dem Defekt betroffen ist. Die Spina bifida in den AP-2 gamma KO^{MORE}-Embryonen entsteht durch einen fehlenden primären Neuralrohrschluss und nicht durch ein sekundäres Öffnen des primär geschlossenen Neuralrohrs.

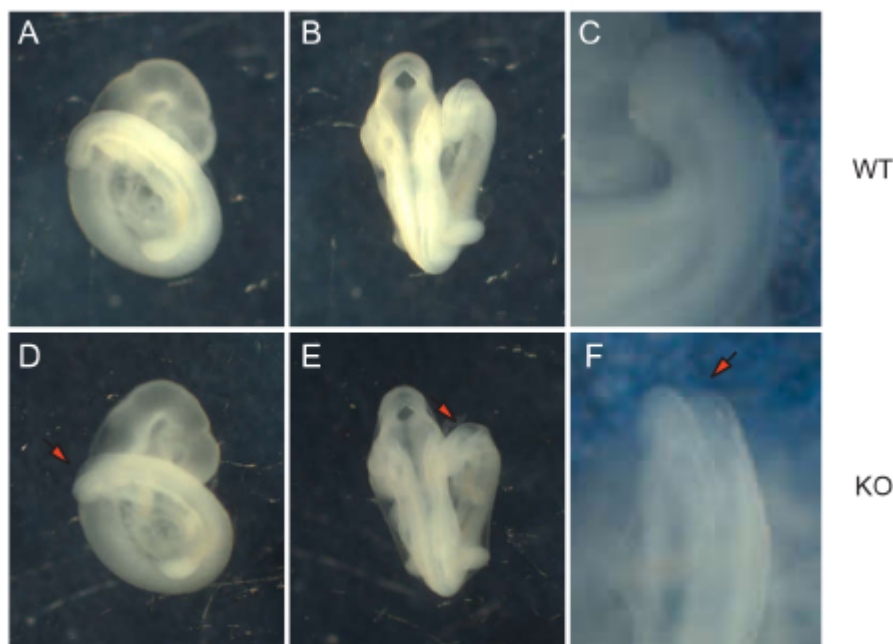


Abbildung 17 Spina bifida in Embryonen E9,5

A: Seitenansicht WT-Embryo; **B:** Dorsale Ansicht WT-Embryo; **C:** Detail: caudale Wirbelsäule und Schwanzansatz eines WT-Embryo; **D:** Seitenansicht KO^{MORE}-Embryo; **E:** Dorsale Ansicht KO^{MORE}-Embryo; **F:** Detail: caudale Wirbelsäule und Schwanzansatz eines KO^{MORE}-Embryos; der rote Pfeil in **D**, **E** und **F** weist auf das offene dorsale Ende des Neuralrohrs;

Zu späteren Zeitpunkten der Embryonalentwicklung manifestiert sich die Spina bifida und der „curly tail“ entwickelt sich gekoppelt an das Auswachsen der Schwanzknospe. Durch die Proliferation des Neuralrohr stülpt sich im nicht geschlossenen Bereich das Neuroepithel nach

Außen. Dieses nach Außen wachsen kennt man auch von den AP-2 alpha defizienten Tieren, bei denen es durch den fehlenden Neuralrohrschluss im Kopfbereich zur Entwicklung einer Exenzephalie kommt, das Neuroepithel entwickelt sich auch in diesen Tieren nach Außen. In Abbildung 18 sind Embryonen ab Tag E11,5 dargestellt. Alle KO^{MORE}-Embryo in Abbildung 18 zeigen eine Spina bifida und einen geknickten oder gekräuselten Schwanz. Die KO^{MORE}-Embryo zeigen jeweils eine unterschiedlich stark ausgeprägte Spina bifida, es ist jeweils ein unterschiedlicher Bereich der Wirbelsäule und des Neuralrohrs betroffen. Bei den Embryonen in Abbildung 18D und F erstreckt sich der Defekt weit nach apikal, während bei dem Embryo in Abbildung 18E die Spina bifida weiter caudal liegt und nur ein kleiner Bereich des Rückens betroffen ist.

Ebenso wie der Spina bifida Phänotyp zeigt auch der „curly tail“ Phänotyp individuelle Unterschiede in der Ausprägung. Während bei dem Embryo (E11,5) in Abbildung 18D oder dem älteren Embryo (E15,5) in Abbildung 18F der Schwanz nur geknickt ist, ist in Abbildung 18E ein KO^{MORE}-Embryo (E12,5) gezeigt bei dem der gesamte Schwanz eingerollt ist, dieser Embryo zeigt auch die am tiefsten gelegene Spina bifida. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Lage der Spina bifida und der Ausbildung eines geknickten oder eingerollten Schwanz, je weiter Sakral die Spina bifida liegt umso ausgeprägter ist der „curly tail“. In den KO^{MORE}-Embryo tritt ein „curly tail“ immer zusammen mit einer Spina bifida auf, nie separiert.

Während der Embryonalentwicklung wurden vermehrt Tiere mit einem „curly tail“ gefunden, nahezu alle Embryonen (93%) mit Spina bifida hatte einen gekrümmten oder gerollten Schwanz. Nach der Geburt war diese mit der Spina bifida assoziierte Missbildung nur noch bei wesentlich weniger Tieren zu sehen (35%). Im Gegensatz dazu tritt eine Spina bifida in allen Entwicklungsstadien (Embryo, Neugeborene und Adulte) ähnlich oft auf.

Es ist daher anzunehmen, dass der geknickte Schwanz in einem Teil der Tiere entweder verwächst oder ein schwacher Knick, der im Embryo mit relativ kurzem Schwanz noch gut zuerkennen ist, später im adulten Tier nicht mehr auffällt. Man kann sich vorstellen, dass ein „curly tail“ wie bei dem Tier in Abbildung 18E die Missbildung so stark ausgeprägt bleibt, dass man sie auch noch nach der Geburt sehen würde, während man sich vorstellen kann, dass der „curly tail“ von dem Tier in Abbildung 18F nach der Geburt nicht mehr zu erkennen ist, wenn sich der Schwanz durch Längenwachstum gestreckt hat.

Beim Präparieren der Embryonen wurden gehäuft resorbierte Embryonen (n=8) gefunden. Diese wurden, sofern es möglich war DNA zu isolieren, genotypisiert. Über 90% dieser resorbierten Embryonen hatten einen KO^{MORE}-Genotyp, das bedeutet, dass ein Teil der KO^{MORE}-Embryonen in der Embryonalentwicklung vor dem Tag E 9,5 abstirbt und resorbiert wird. Auch nach der Geburt zeigen Neugeborene mit Spina bifida eine erhöhte Letalität. Ein Teil dieser Tiere hatte einen schlechteren Allgemeinzustand als nicht betroffenen Geschwister aus

dem gleichen Wurf. Waren sie schwächer, bekamen sie weniger Milch, da sie sich nicht gegen ihre Geschwister durchsetzen konnten. Außerdem wurden kranke oder schwache Tiere zum Teil von den Müttern instinktiv ausgesondert oder getötet.

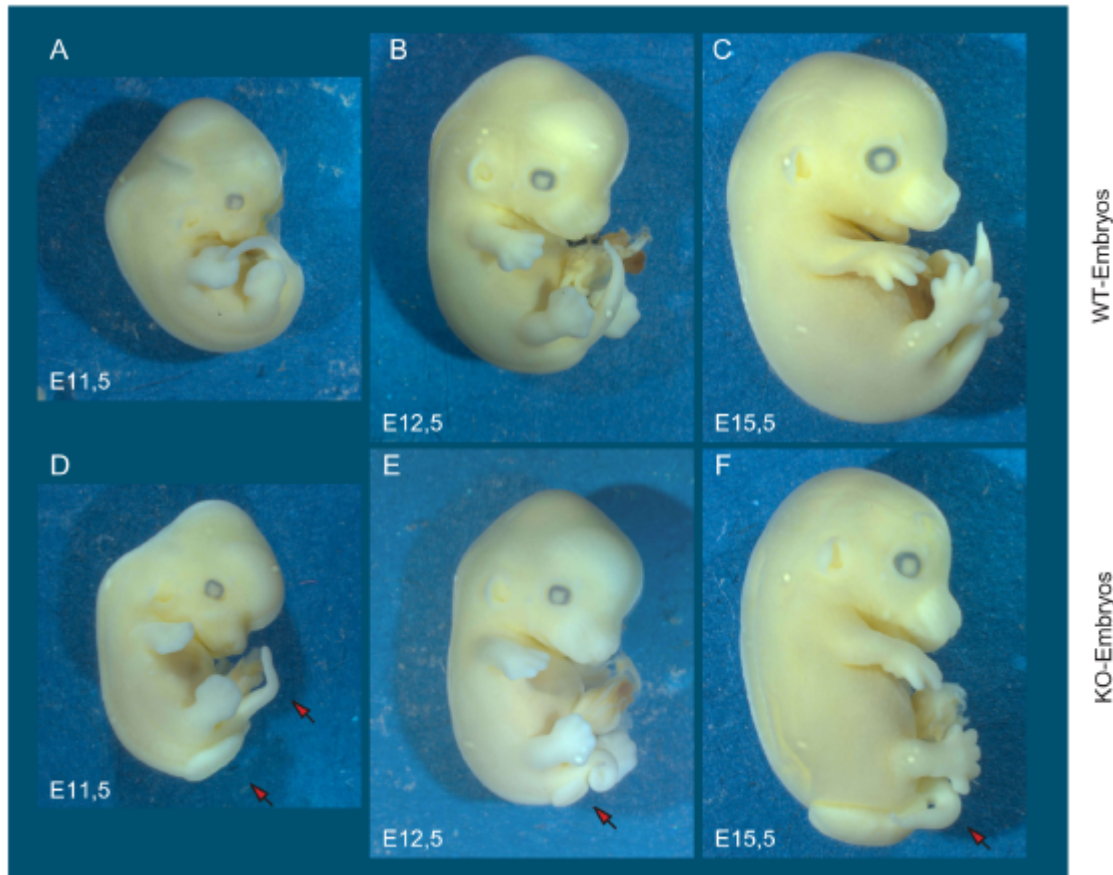


Abbildung 18 Embryonen mit Spina bifida und curly tail

Embryonen verschiedene Entwicklungsstadien: Die KO^{MORE}-Tiere (**D, E, F**) sind im Gegensatz zu den Kontrolltieren (**A, B, C**) unterschiedlich von der Spina bifida und „curly tail“ betroffen; bei dem Embryo in **E** ist die Spina bifida stärker nach caudal orientiert, der Schwanz ist stark eingerollt; Embryo in **F** hat eine höhere Spina bifida, der Schwanz ist nur in Form eines Knicks betroffen; ebenso Embryo in **D**;

Bei dem Großteil der von Spina bifida betroffenen Tiere verheilte und vernarbte der Wirbelkanalsdefekt nach der Geburt. In Abbildung 19A sieht man ein wenige Tage altes Spina bifida Tier, das zusätzlich noch einen gerollten Schwanz („curly tail“) hat. Die Hautläsion hat sich bereits geschlossen und beginnt zu verheilen. Eine Haut- oder Meningealläsion bedeutet eine erhöhte Infektionsgefahr, da Keime in den Körper eindringen können. Mit der erhöhten Infektionsgefahr lässt sich daher auch die erhöhte Letalität nach der Geburt erklären. Während

der weiteren Entwicklung wächst zusätzlich noch Haut über die Läsion (Abbildung 19B). Diese Tiere entwickeln sich zu Adulten.

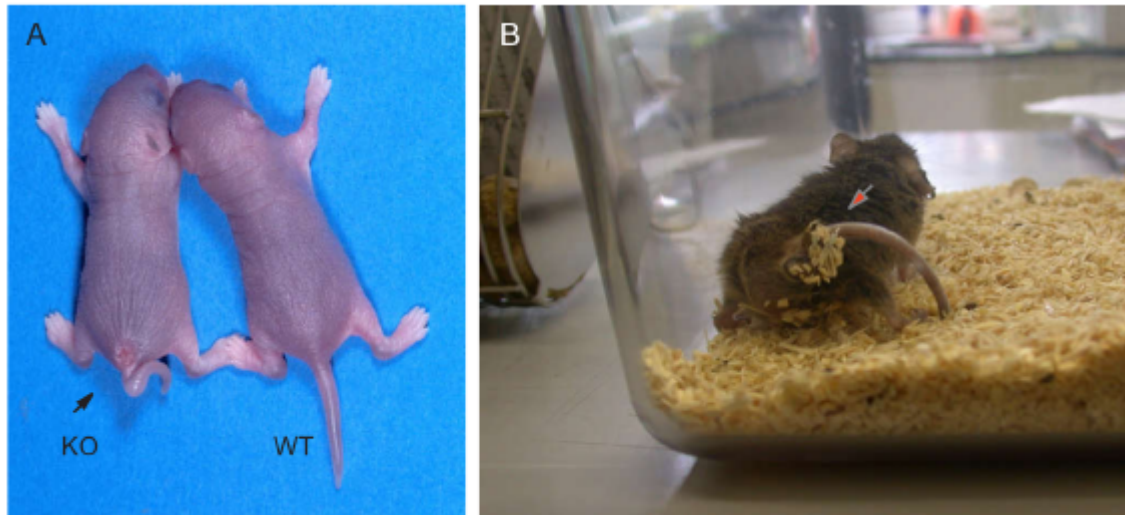


Abbildung 19 Spina bifida bei älteren Tieren

A: 4 Tage alte Neugeborene: Das KO^{MORE}-Tier hat außer einer mit Haut überwachsener Spina bifida einen gekräuselten Schwanz (ct; curly Tail);

B: Ein adultes Tier (Alter: 9 Wochen) mit überwachsender Spina bifida und curly tail (roter Pfeil); Tier zeigt außer starken Verwachsungen der Wirbelsäule Harninkontinenz und motorische Störungen;

Um die Art und Ausprägung der Spina bifida genauer zu untersuchen, wurden histologische Schnitte durch den Bereich der Spina bifida angefertigt (Für die Durchführung dieser Arbeiten danke ich Frau I. Heim (Institut für Pathologie, Bonn)) und zwischen WT-Tieren und KO^{MORE}-Tieren verglichen. Im Querschnitt erkennt man die unterschiedliche Ausprägung der Spina bifida im KO^{MORE}-Tier. Im Kontroll-Tier (wt) ist der Wirbelkanal geschlossen, der Wirbelbogen liegt dorsal des Rückenmarks (Abbildung 20A und B). Über dem Wirbel liegt Haut und zum Teil Rückenmuskulatur, die an den Wirbelfortsätzen ansitzt. Im KO^{MORE}-Tier hat sich der Wirbelbogen nicht geschlossen, eine Spina bifida ist entstanden (schwarze Pfeile). Man erkennt in Abbildung 20C, dass der Defekt auf Höhe des Beckens mit Muskulatur und narbigem Hautgewebe überwachsen ist. In Abbildung 20D wurde durch eine Ebene geschnitten, die sehr weit caudal liegt. An dieser Stelle besteht das Rückenmark nur noch aus den Nerven, die den Schwanz innervieren. Alle anderen Nerven sind bereits an einer apikaleren Stelle aus dem Wirbelkanal ausgetreten. Die Spina bifida dieses KO^{MORE}-Tieres ist hier wesentlich ausgeprägter. Das Rückenmark wird nicht von Haut oder Muskelgewebe überdeckt, sondern man findet nur vernarbtes Gewebe an der Oberfläche (Abbildung 20D; grüner Pfeil).

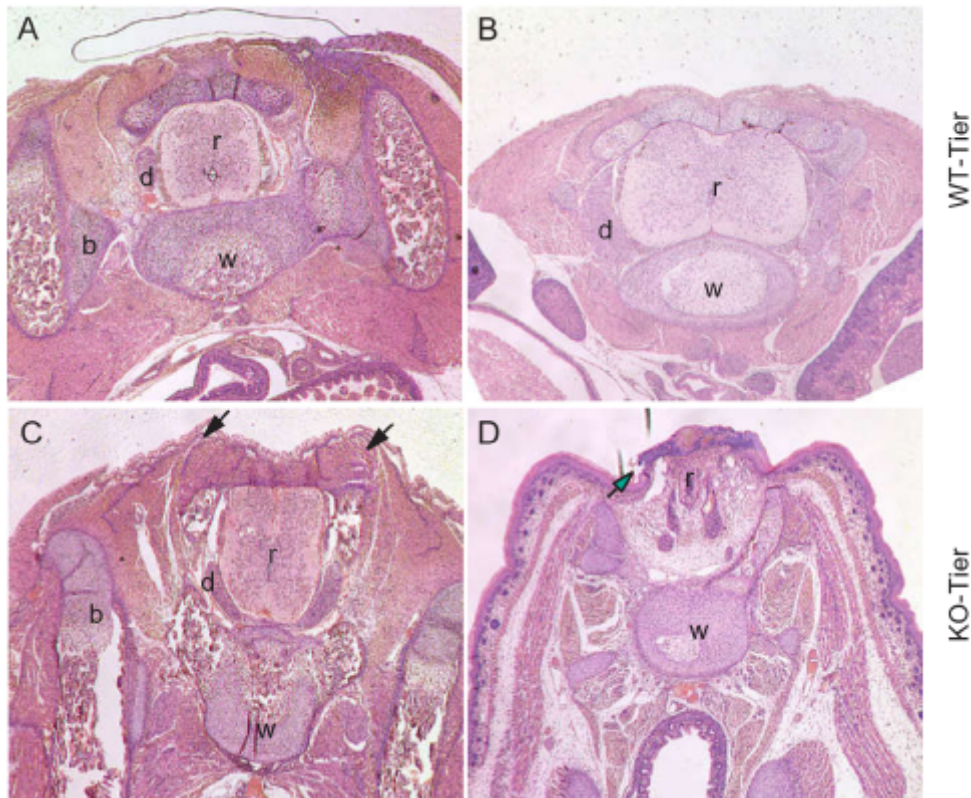


Abbildung 20 Querschnitt durch Spina bifida

Schnitte durch die Wirbelsäule eines neugeborenen WT-Tieres und eines neugeborenen KO^{MORE} -Tieres (HE-Färbung):

A: WT-Tier (Querschnitt auf Beckenhöhe): Der Wirbelbogen ist geschlossen, Muskulatur und Haut liegen über der Wirbelsäule; **B** WT-Tier (Querschnitt auf Nierenhöhe); **C** KO^{MORE} -Tier (Querschnitt auf Beckenhöhe): Der Wirbelbogen ist nicht geschlossen, die Spina bifida (schwarze Pfeile) ist überwachsen, es liegt Haut und Muskulatur über dem offenen Wirbelkanal; **D** KO^{MORE} -Tier (Querschnitt auf Höhe der Blase): Der Wirbelkanal ist offen, der Wirbelbogen hat sich nicht geschlossen, das offenliegende Gewebe ist vernarbt (grüner Pfeil); b: Becken; d: dorsales Wurzelganglion; r: Rückenmark; w: Wirbelkörper; wb: Wirbelbogen; m: Muskulatur

Um einen genaueren Einblick in die Veränderungen an der Wirbelsäule zu bekommen, wurden die Wirbelsäulen adulter Tiere nach einer Knochen-Knorpel-Färbung näher untersucht. Die Spina bifida der KO^{MORE} -Tiere befand sich immer im Lenden- und Sakralwirbelbereich, auf der Höhe der Wirbelsäule an der das Becken an der Wirbelsäule fixiert wird. Die Wirbel (L4, L5, S1, S2) des KO^{MORE} -Tieres zeigten einen offenen Wirbelkanal (Abbildung 21E, F, G, H; blaue Pfeile), es kommt zu keiner Ausbildung des Dornfortsatz, er fehlt völlig. Im WT-Tier wurde der Dornfortsatz bei allen Wirbeln gebildet, der Wirbelkanal ist geschlossen (Abbildung 21A, B, C, D; gelbe Pfeile). Ist das Rückenmark ungeschützt, kann es durch mechanische Einflüsse weiter geschädigt werden, es kann zu neurologischen Ausfällen kommen.

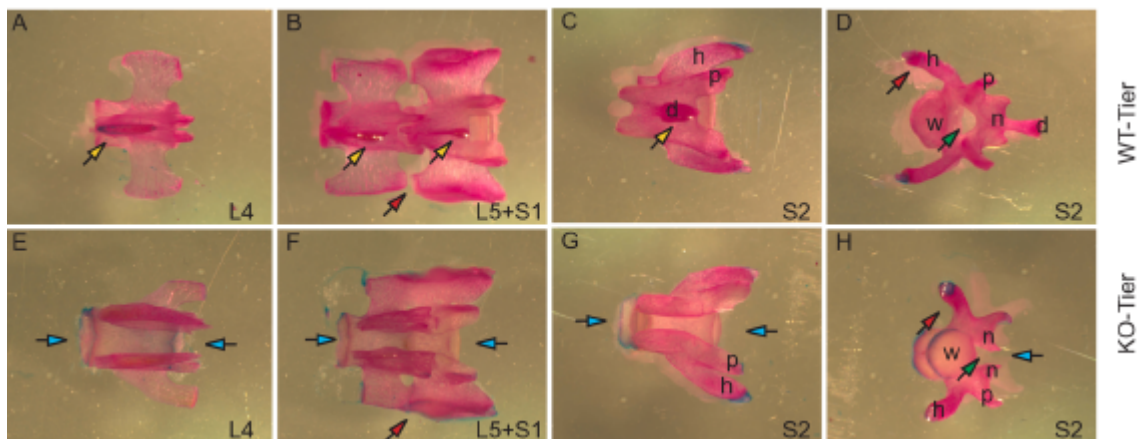


Abbildung 21 Wirbelkörper

Knochenfärbung (Alizarin-Rot) von der Lenden- und Sakralwirbelsäule eines KO^{MORE} -Tieren (E, F, G, H) und eines WT-Tieren (A, B, C, D):

Im WT-Tier (C, D) hat sich der Neuralbogen (n) zum Wirbelkanal (grüner Pfeil) geschlossen und der Dornfortsatz (d) wurde gebildet, während im KO^{MORE} -Tier (G, H) der Wirbelkanal (grüner Pfeil) offen bleibt (blauer Pfeil).

Die Spina bifida zieht sich über mehrere Wirbel (L4-S2) des KO^{MORE} -Tieres (E, F, G, H) (bleuer Pfeil), während der Wirbelkanal (L4-S2) sich im WT-Tier (A, B, C, D) geschlossen und der Dornfortsatz (gelber Pfeil)gebildet hat.

p: Processus transversus; n: Neuralbogen; h: Hämbogen; d: Dornfortsatz; w: Wirbelkörper;

Zusätzlich sind KO^{MORE} -Tiere zwei Wirbel (L5, S1) miteinander verwachsen (Abbildung 21F), während die entsprechenden Wirbel im WT-Tier nicht miteinander verwachsen waren (Abbildung 21B). Die Veränderung betrifft vor allem die seitlichen Wirbelfortsätze, deren Knochen miteinander verschmolzen sind. In der frontalen Ansicht eines Wirbels erkennt man, dass der Wirbelkörper an sich nicht deformiert ist, die jeweiligen Veränderungen findet man immer an den einzelnen Knochenfortsätzen die von den Wirbelbögen gebildet werden (Abbildung 21H). In Abbildung 21H ist nicht nur der Neuralbogen, sondern auch der Hämbogen deformiert. Diese Knochenfortsätze spielen eine wichtige Rolle für den Ansatz von Muskulatur und Gewebefäden, sie fixieren die Wirbel in ihrer Lage untereinander und sie definieren an welchen Punkten die Nerven zwischen den einzelnen Wirbeln aus dem Rückenmarkskanal treten. Kommt es hier zu Veränderungen werden die austretenden Nerven abgeklammert. Es kann in der Folge zu motorischen Defiziten kommen.

Neurologische Ausfälle

Beim Menschen kommt es bei Spina bifida Patienten häufig zu neurologischen Ausfällen oder motorischen Defiziten. Zum einen kann das Rückenmark an sich Deformationen aufweisen, die austretenden Nerven können deformiert sein, zum anderen kann es bei oder nach der Geburt

weiter geschädigt werden. Von den KO^{MORE} -Tieren mit Spina bifida zeigten aber nur wenige neurologische oder motorische Defizite, die meisten Tiere waren völlig unauffällig. Tiere, die schwere neurologische Defizite haben, wiesen auch eine ausgeprägt Spina bifida auf. Es ist zu vermuten, dass diese Tiere eine erhöhte Letalität haben und daher nur Tiere zu Adulten heranwachsen, die einen schwächer ausgeprägten Phänotyp haben. Das würde bedeuten, dass nur die stärkeren KO^{MORE} -Tiere überleben.

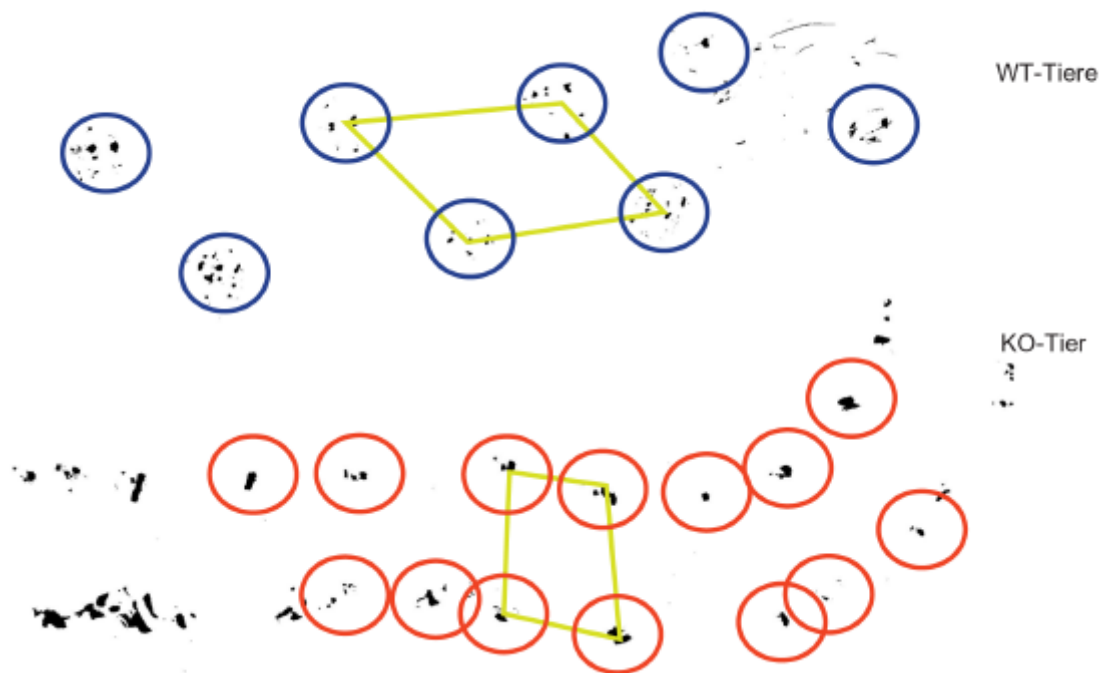


Abbildung 22 Vergleich der Motorik

Pfotenabdrücke in Tinte eines KO^{MORE} -Tieres (rot) im Vergleich mit einem WT-Tier (blau): während im WT-Tiere die Schritte gleichmäßig und raumgreifend sind findet man im KO^{MORE} -Tier die eine verkürzte Schrittlänge. Die Schritte sind breiter und unregelmäßig. Der hellgrüne Kasten markiert jeweils einen Schritt.

In Abbildung 19 ist ein Tier mit motorischen Defiziten gezeigt. Dieses Tier war harninkontinent. Es war nicht in der Lage sich schnell fortzubewegen, die Schritte waren kurz und breit (Abbildung 22). Sie wurden nicht wie bei gesunden Tieren auf den Ballen ausgeführt, sondern das Tier lief auf der gesamten Pfote. Der Körper kam in eine tiefere Lage, so dass der Bauch immer leicht mit dem Spreu im Käfig in Kontakt kam. Durch den ständigen Kontakt mit dem Spreu und durch die Inkontinenz kam es bei diesem Tier letztendlich zu einer Blasenentzündung, die im Urogenitalsystem aufstieg und zur Nierenbeckenentzündung führte.

Nachdem es in den KO^{MORE} -Tieren zu Deformationen an der Wirbelsäule kommt (Abbildung 21), wurden auch die anderen Knochen und Knorpelstrukturen des Skeletts untersucht. Es fanden sich keine Unterschiede im Skelettaufbau, außer im Bereich der Spina bifida. Die

KO^{MORE}-Tiere waren zwar teilweise etwas kleiner, dies ist z.B. im Vergleich der Schädel aus A (WT) und aus C (KO^{MORE}) zu erkennen. Alle Knochen sind aber vorhanden und haben sich richtig entwickelt. Es wurden weder in den Gesichts- und Schädelknochen (C, D), in Arm und Beinknochen (nicht dargestellt), am Thorax oder in der Hals- und Brustwirbelsäule (aus Abbildung 23F) Unterschiede gefunden.

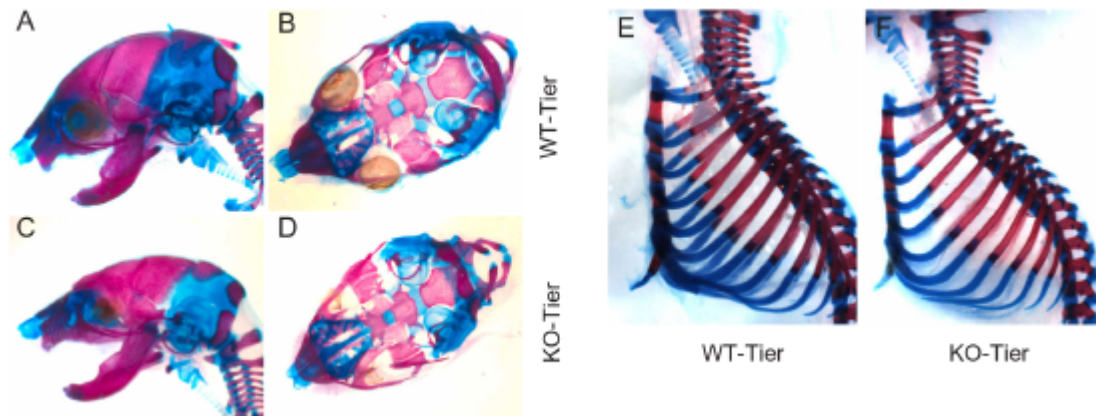


Abbildung 23 Knochengefärbung von neugeborenen Tieren

Knochen-Knorpel-Analyse: **A, B:** Schädel WT-Tier; **C, D:** Schädel KO^{MORE}-Tier in **B, D** wurde das Schädeldach entfernt (Aufsicht auf die Schädelbasis) **E:** seitliche Aufsicht auf Thorax und Halswirbelsäule eines WT-Tieres; **F:** seitliche Aufsicht auf Thorax und Halswirbelsäule eines KO^{MORE}-Tieres ;

Außer im Bereich der caudalen Wirbelsäule findet man keine größeren Unterschiede zwischen dem Skelett eines KO^{MORE}-Tieres (**C, D, F**) und eines WT-Tieres (**A, B, E**); der Kopf des KO^{MORE}-Tieres (**C**) ist kleiner als die Kontrolle (**A**); alle Knochen sind im Kopfbereich vorhanden und nicht deformiert (**A, B, C, D**); der Thorax und die HWS sind ebenfalls unauffällig (**E, F**);

t: Trachea; n: Nasenhöhle; w: Wirbelsäule; r: Rippe; s: Sternum;

Rot-gefärbt (Alizarin-Rot): Knochen; Blau-gefärbt (Alcian-Blau): Knorpel;

An der Lenden- und Sakralwirbelsäule erkennt man Deformationen, die über die Veränderungen an den einzelnen Wirbeln hinausgehen. Die Wirbelsäule an sich zeigt im KO^{MORE}-Tier eine starke Kyphose (Abbildung 24B), das heißt die Wirbelsäule biegt sich an dieser Stelle nicht wie im Wildtyp (Abbildung 24A) nach Innen, sondern ist nach Außen gebogen. Dies hat auch Folgen für den Winkel in dem der Schwanz von Wirbelsäule und Becken abgeht. Im KO^{MORE}-Tier läuft der Schwanz sehr flach aus der Wirbelsäule heraus.

Das Becken hingegen zeigt keine Veränderungen, es ist im KO^{MORE}-Tier (Abbildung 24D) im gleichen Winkel zur Wirbelsäule angelegt wie im WT-Tier (Abbildung 24C), es zeigt keine Veränderungen in der Hüftpfanne, so dass auch das Hüftgelenk sich normal entwickelt hat. Auch bei dem adulten KO^{MORE}-Tier mit den motorischen Defiziten aus Abbildung 19B und Abbildung 22 fanden sich keine Unterschiede in der Hüfte und dem Becken. Das bedeutet,

dass die Veränderungen in der Motorik nicht durch Deformationen am Beckenring oder der Hüfte entstanden sind, sondern alleine von der Spina bifida abhängig sind.

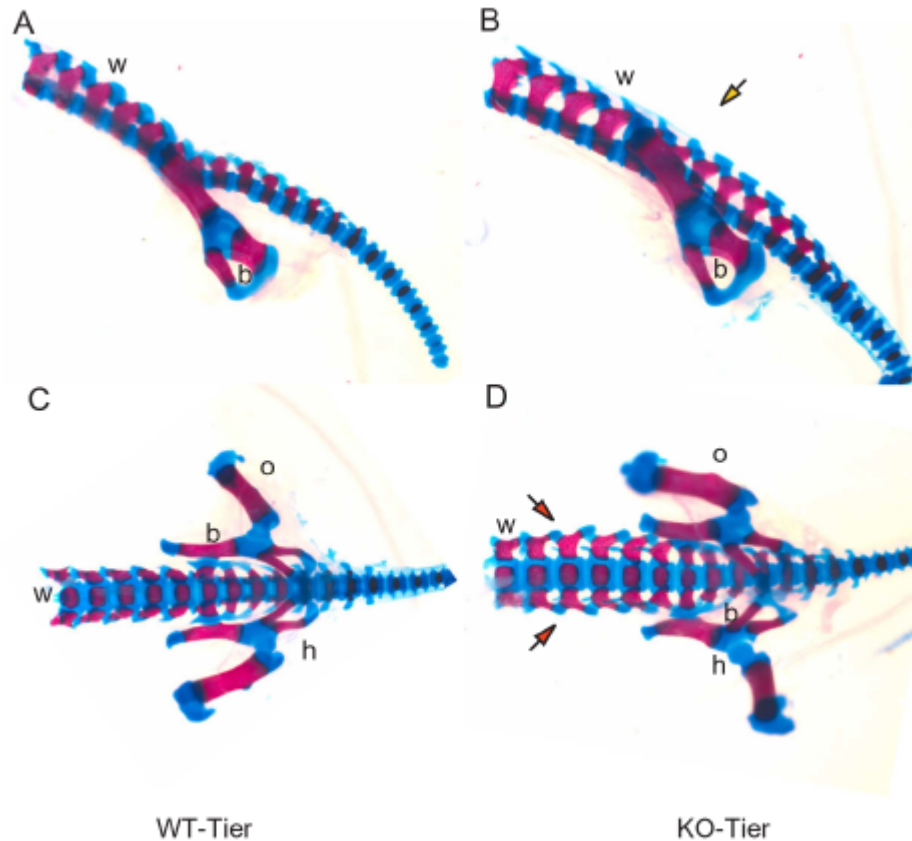


Abbildung 24 Knochen-Knorpel-Färbung von Beckengürtel und Wirbelsäule

Knorpel-Knochen-Färbung: **A:** Seitenansicht WT-Tier; **B:** Seitenansicht KO^{MORE} -Tier; im Bereich der Lendenwirbel und des Übergangs zum Schwanz findet man im KO^{MORE} -Tier eine starke Kyphose (gelber Pfeil); **C:** dorsale Ansicht WT-Tier; **D:** dorsale Ansicht des KO^{MORE} -Tier: durch den fehlenden Schluss des Wirbelkanals erscheinen die einzelnen Wirbel verbreitert (rote Pfeile).

w: Wirbelsäule; b: Becken; o: Humerus (Oberschenkel); h: Hüftgelenk;

Hodendefekt und Cryptorchidismus

Schon kurz nach der Geburt waren bei allen männlichen KO^{MORE} -Tieren leichte Unterschiede zu WT-Tieren an den äußeren Genitalien zu erkennen. Diese Unterschiede verstärkten sich beim Eintritt in die Pubertät. Der Hoden sank nicht in das Skrotum ab, sondern verblieb in der Leistenregion (Abbildung 25B). Die inguinosaakrale Phase des Hodenabsinkens fand nicht statt. Das Skrotum blieb leer (Abbildung 25C). Normalerweise sorgt das Gubernaculum durch eine Formveränderung durch Zusammenziehen dafür, dass der Hoden in das Skrotum

gezogen wird. In Abbildung 25B kann man noch deutlich das Gubernaculum erkennen (gelber Pfeil, roter Pfeil), es ist langgestreckt und hat den Hoden nicht in das Skrotum gezogen.

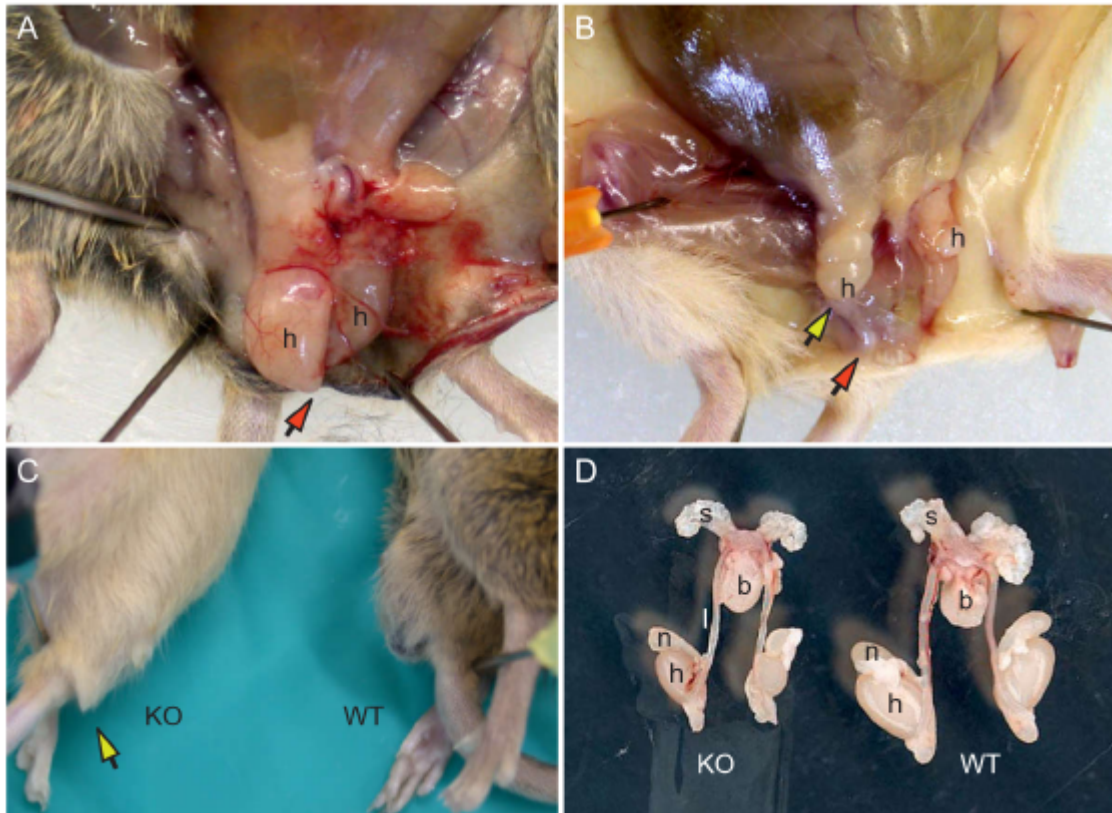


Abbildung 25 Phänotyp im Urogenitaltrakt

A: Präparation eines WT-Tier; **B:** Präparation eines KO^{MORE} -Tier; **C:** Seitliche Aufsicht auf ein KO^{MORE} -Tier und ein WT-Tier; **D:** Totalpräparation der männlichen Urogenitaltrakte eines KO^{MORE} -Tieres und eines WT-Tieres;
h: Hoden; s: Samenblase (Glandula vesicularis) und vorderer Lobus der Prostata; n: Nebenhoden; l: Samenleiter (Ductus deferenz);

Während der Hoden des WT-Tieres (**A**) tief in das Skrotum hereinragt (roter Pfeil), hat sich der Hoden des KO^{MORE} -Tieres (**B**) nicht in das Skrotum (roter Pfeil) abgesenkt, er verbleibt im Inguinalraum (grüner Pfeil), das Gubernaculum hat sich nicht zusammengezogen; in der seitliche Aufsicht (**C**) ist das Skrotum des KO^{MORE} -Tieres leer (grüner Pfeil), während das Skrotum des WT-Tieres durch die Hoden ausgefüllt ist. Im Totalpräparat (**D**) ist der Hoden des KO^{MORE} -Tieres deutlich kleiner als der Hoden des WT-Tieres, andere Organe des Urogenitaltraktes sind unauffällig.

Die Hoden der KO^{MORE} -Tiere waren wesentlich kleiner, während alle anderen Organe des Urogenitaltrakts wie im WT-Tier angelegt und ausgebildet waren (Abbildung 25D). Nur einem präpariertem Tier fehlte die Samenblase völlig (nicht gezeigt). Der Hodendefekt fand sich im Gegensatz zur Spina bifida bei allen männlichen Tieren ohne Ausnahme.

Verlust des Keimepithels

Die äußerliche Anomalie des Hodens spiegelt sich auch im histologischen Schnitt wieder. Im WT-Hoden findet man eine Vielzahl von Hodenkanälchen, in denen die Spermatogenese stattfindet (Abbildung 26A). Jedes einzelne Hodenkanälchen befindet sich in einem eigenen Zyklus der Spermatogenese. In Abbildung 26B sind Hodenkanälchen gezeigt, die sich in unterschiedlichen Phasen der Spermatogenese befinden. Man erkennt die zum einen an der Anzahl der im Lumen liegenden Spermien, zum anderen an den unterschiedlich gestalteten Zelltypen, die zwischen der Basalmembran und dem Lumen liegen. Die gebildeten Spermien werden in den Nebenhoden transportiert und reifen dort. Man sieht daher viele reife Spermien im Lumen des Nebenhodens liegen (Abbildung 26C).

Im Hoden der KO^{MORE} -Tiere sind zahlreichen Hodenkanälchen verändert, sie erscheinen in der Übersicht leer (Abbildung 26D; grüner Pfeil). Man findet im Hoden Regionen in denen sehr viele Hodenkanälchen einen Defekt aufweisen (Abbildung 26E, H), während an anderen Stellen sehr viele gesund erscheinende Hodenkanälchen vorhanden sind (Abbildung 26G), in denen Spermatogenese stattfindet und Spermien gebildet werden. In den defekten Hodenkanälchen findet man keine Keimzellen, es sind nur noch die Sertoli-Zellen vorhanden. Im gesunden Hodengewebe sind die Sertoli-Zellen kaum zu erkennen, da sie von den vielen Keimzellen verdeckt werden. Die Sertoli-Zellen bilden in manchen defekten Hodenkanälchen Zellagglomerate (Abbildung 26E, H, I; rote Pfeile), die sich teilweise von der Basalmembran abgelöst haben.

Da in den Hoden der KO^{MORE} -Tiere in einem Teil der Hodenkanälchen Spermatogenese stattfindet und Spermien gebildet werden, findet man im Nebenhoden reife Spermien (Abbildung 26F, gelber Pfeil). Ihre Anzahl ist jedoch stark reduziert.

Um festzustellen, ob diese KO^{MORE} -Tiere fertil sind wurden sie mit Weibchen verpaart. Die Männchen waren in der Lage die Weibchen zu begatten, es konnten Vaginalpropfen festgestellt werden. Die Weibchen wurden jedoch nicht schwanger, es wurde kein Nachwuchs erzeugt. Die KO^{MORE} -Männchen sind steril, auch wenn in allen Tieren noch eine verminderte Anzahl an Spermien gebildet wird (Oligozoospermie). Vermutlich reicht die Anzahl der Spermien nicht für eine erfolgreiche Befruchtung aus.

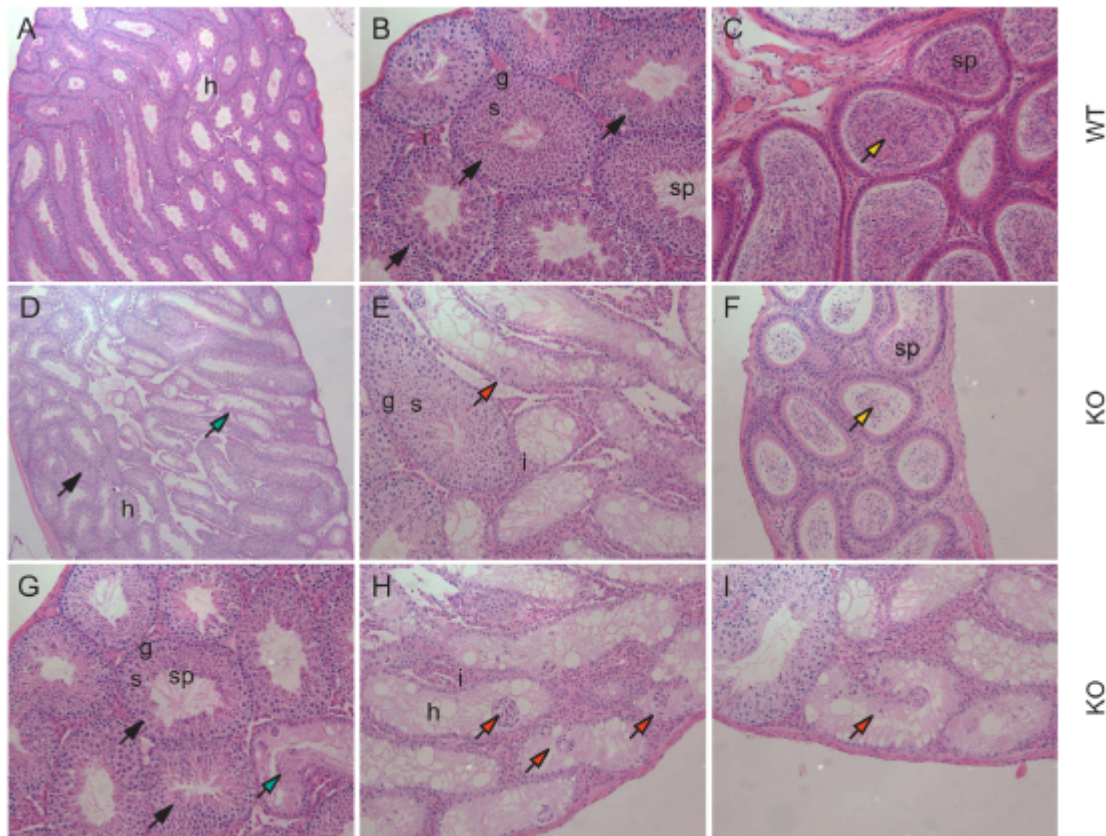


Abbildung 26 Histologische Schnitte durch adultes Hodengewebe

A: Übersicht WT-Hoden **B:** Schnitt durch WT-Hodenkanälchen in unterschiedlichen Reifestadien **C:** Schnitt durch den WT-Nebenhoden mit reifen Spermien im Lumen **D:** Übersicht KO^{MORE}-Hoden **E, G-I:** Schnitt durch Übersicht KO^{MORE}-Hodenkanälchen in unterschiedlichen Reifestadien **F:** Schnitt durch KO^{MORE}-Nebenhoden
In der Übersicht sind im KO^{MORE}-Hoden (**D**) neben unauffälligen Hodenkanälchen (schwarzer Pfeil) veränderte Hodenkanälchen (grüne Pfeile) zu erkennen. In den veränderten Hodenkanälchen (roter Pfeil) ist keine Spermiogenese mehr zu erkennen, teilweise sind Hodenkanälchen zusammengefallen (**H, I**) und es finden sich Gewebeagglomerate (rote Pfeile) im Lumen des Hodenkanälchen. Durch die verminderte Spermiogenese findet man im KO^{MORE}-Nebenhoden (**C**) weniger reife Spermien (gelbe Pfeile) wie im WT-Nebenhoden (**F**). h: Hodenkanälchen; i: Interstitielle Zellen; g: Spermatogonien; s: Spermatozyten; sp: Spermien;

Bei den 18 untersuchten Hoden von KO^{MORE}-Tieren viel auf, daß junge Männchen eine höhere Anzahl produktiver Hodenkanälchen hatten als ältere Männchen, mit steigendem Alter schien sich der Phänotyp innerhalb des Hodens auszubreiten. Jedoch erschweren es starke individuelle Unterschiede im Phänotyp zwischen den Tieren diese subjektive Beobachtung zu erhärten. Bei manchen Jungtieren war bereits kurz nach der Geschlechtsreife annähernd der gesamte Hoden betroffen. In diesen Tieren hatten zwar viele Hodenkanälchen ihr Keimepithel verloren, jedoch konnte man in ihnen keine in sich zusammen gefallenen Hodenkanälchen oder Hodenkanälchen mit abgelösten Gewebeagglomeraten wie in Abbildung 26H und I finden.

Diese weitere Zerstörung der Hodenkanälchenstruktur tritt erst mit zunehmenden Alter der Tiere auf, das KO^{MORE} -Tier in Abbildung 26 war bereits 4 Monate alt.

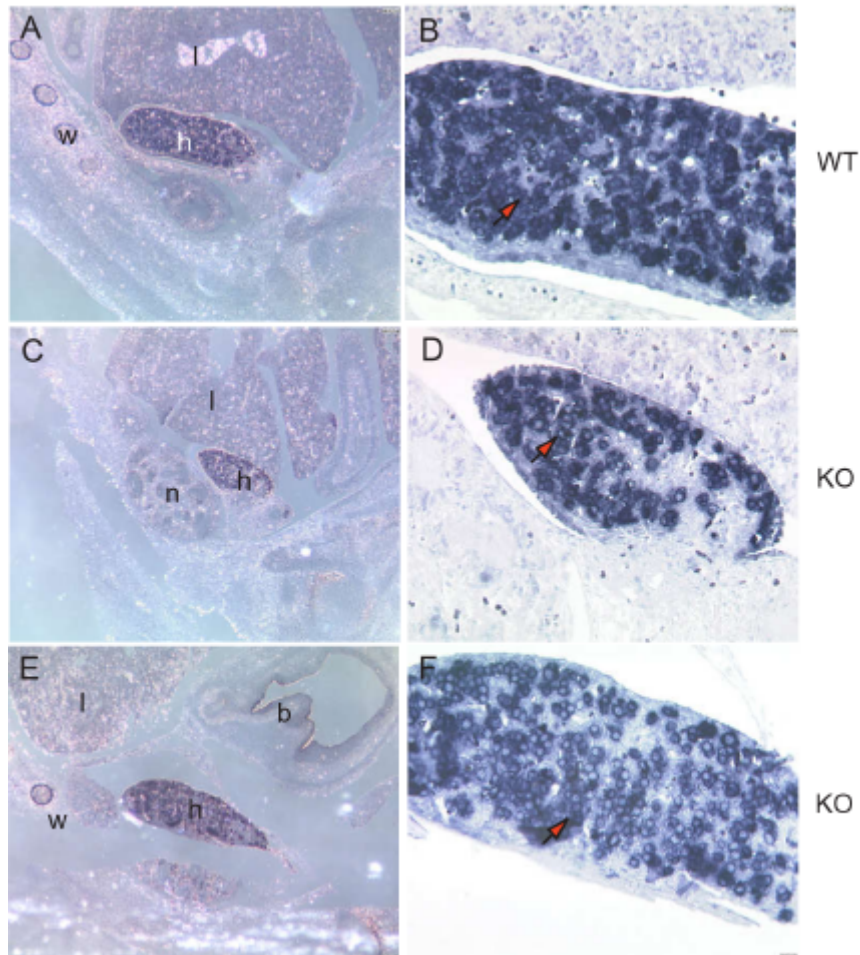


Abbildung 27 Vorläuferzellen der Keimzellen PGC

A: Transversaler Schnitt durch einen E13,5 WT-Embryo; **B:** Schnitt durch den embryonalen WT-Hoden; **C, E:** Transversaler Schnitt durch einen E13,5 KO^{MORE} -Embryo; **D, F:** Schnitt durch den embryonalen KO^{MORE} -Hoden; die roten Pfeile weisen auf die Vorläuferzellen der Keimzellen;
w: Wirbelkörper; n: Niere; l: Leber; h: Hoden; b: Blase;

Aus dem Phänotyp des KO^{MORE} -Hodens ergibt sich die Frage zu welchem Zeitpunkt der Keimzelldefekt entsteht. AP-2 gamma wird im Hoden während der Embryonalentwicklung ab E11,0 und auch später noch im ausgewachsenen Tier exprimiert. Es ist postuliert worden, dass dies im Zusammenhang mit der Differenzierung und Proliferation der eingewanderten Keimzellen in Zusammenhang steht (Chazaud, Oulad-Abdelghani et al. 1996). Entsteht der Defekt also bereits, wenn die primordialen Keimzellen in den Hoden einwandern sind, wandern

genügend Keimzellen ein und proliferieren sie dann ausreichend um den gesamten Hoden zu bevölkern?

Diese Fragestellung lässt sich durch einfache Färbungen unter Ausnutzung der endogenen alkalische Phosphataseaktivität klären. Die primordiale Keimzellen besitzen eine endogen alkalische Phosphatase, bietet man ihr ein geeignetes Substrat (BM purple) an, kommt es zu einer Farbreaktion und die primordialen Keimzellen werden angefärbt. In Abbildung 27 sind diese Färbungen gezeigt. In Abbildung 27A und B ist der Hoden eines WT-Embryos am Tag E13,5 gezeigt, der Hoden hat noch eine längliche Form, die sich noch aus der langgestreckten Form der Genitalleiste erklärt, und ist noch nicht in die Leistenregion abgesunken. Es sind deutlich die blaugefärbten Keimzellen (Abbildung 27B, roter Pfeil) zu erkennen. In den Schnitten durch KO^{MORE} -Embryonen am Tag E13,5 (Abbildung 27C-F) ist ebenfalls eine deutliche Färbung der Keimzellen zu erkennen. Die Keimzellen (rote Pfeile) sind im KO^{MORE} -Hoden in ähnlicher Zelldichte wie im WT-Hoden vorhanden.

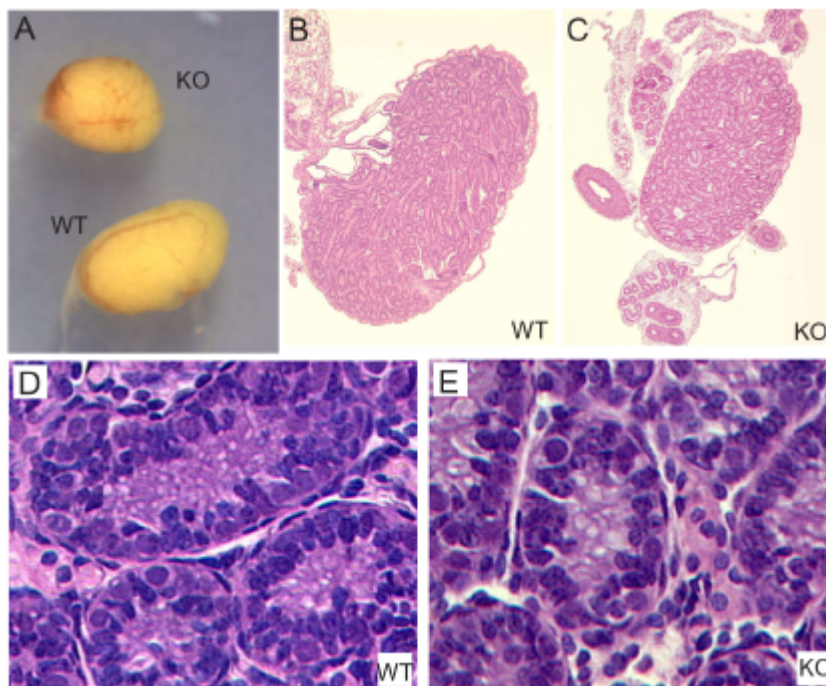


Abbildung 28 Beginnende Spermatogenese in 4 Tage alten Tiere

A: WT- und KO^{MORE} -Hoden in der Übersicht; **B:** Schnitt durch WT-Hoden; **C:** Schnitt durch KO^{MORE} -Hoden; **D:** WT-Hodenkanälchen; **E:** KO^{MORE} -Hodenkanälchen; (**B-E:** HE-Färbung)

Es lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass es in den KO^{MORE} -Tieren nicht zu einer verminderten Einwanderung von primordiale Keimzellen oder mangelnder Proliferation der Keimzellen nach der Einwanderung kommt. Am Tag E13,5 sind auch im KO^{MORE} -Tier eine

normale Anzahl an Keimzellen vorhanden. Der Hodendefekt muß sich später in der Entwicklung ausprägen.

Es wurden anschließend noch spätere Stadien in der Embryonalentwicklung untersucht; es fanden sich aber keine Unterschiede in der Histologie. Weitergehend in der Entwicklung wurden Hoden 4 Tage nach der Geburt untersucht. Zu diesem Zeitpunkt beginnt im Hoden die Differenzierung der Keimzellen zu Spermatogonien. Es zeigte sich zum ersten Mal eine deutliche Größendifferenz im Vergleich von WT-Hoden zu KO^{MORE}-Hoden (Abbildung 28A). Im histologischen Schnitt sind jedoch keine morphologische Unterschiede im Aufbau der Hodenkanälchen oder in der Zellzahl zu erkennen. In Abbildung 28D (WT-Hoden) und E (KO^{MORE}-Hoden) erkennt man, dass in beiden Hoden sich bereits ein mehrschichtiges Keimepithel aufzubauen beginnt. Es lässt sich festhalten, dass auch zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede im Hodenaufbau zu erkennen sind, die später zu dem beobachteten Phänotyp führen könnten.

Apoptose im Hoden

Weder während des Einwandern der primordiale Keimzellen in den Hoden, noch später in der Embryonalentwicklung wurden Hinweise gefunden, warum es zum Verlust des Keimzellepithels im KO^{MORE}-Hoden kommt. Die primordiale Keimzellen wandern in den Hoden ein und besiedeln den kompletten Hoden. Auch wenige Tage nach der Geburt findet man keine Unterschiede zwischen WT- und KO^{MORE}-Hoden, das Keimepithel entwickelt sich normal. Das Keimepithel geht also erst später verloren. Um diesen Zeitpunkt einzugrenzen, wurde auf histologischen Schnitten nach apoptotischen Zellen gesucht. Für diese Untersuchungen wurde das TUNEL-Verfahren angewendet. Es basiert auf der Extension freier 3'-OH DNA-Enden durch das Enzym Terminale Transferase mittels markierter Nukleotide, deren Einbau auf Gewebeschnitten immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Da infolge Apoptose assoziierter DNA-Fragmentierung 3'-OH DNA-Enden in großer Anzahl entstehen, können apoptotische Zellkerne auf Gewebeschnitten spezifisch angefärbt werden.

In der Übersicht des WT-Hodens (Abbildung 29) sind viele Hodenkanälchen in unterschiedlichen Spermatogenesephase zu erkennen. In den einzelnen Hodenkanälchen (Abbildung 29B, C) findet man keine apoptotischen Zellen. In der Übersicht des KO^{MORE}-Hodens erkennt man zum einen einige, vereinzelte defekte Hodenkanälchen (Abbildung 29D; gelbe Pfeile), die von normalen Hodenkanälchen umgeben sind. Neben den völlig normal erscheinende Hodenkanälchen findet man auch Hodenkanälchen mit aktiver Spermatogenese und mit apoptotischen Zellen (Abbildung 29D, roter Pfeil). In Abbildung 29E und F sind einzelne Hodenkanälchen dargestellt, in denen man braun gefärbte Zellkerne, als Zeichen für Apoptose

(TUNEL-Nachweis), findet. Die betroffenen Zellen sind hauptsächlich Spermatogonien, die dicht an der Basalmembran liegen. Man findet aber auch apoptotische Zellen, die weiter in Richtung des Hodenkanälchenlumen liegen. Durch den Verlust an Keimzellgewebe, dünnt sich die im Hodenkanälchen liegende Zellpopulation nach und nach aus. Man erkennt in Abbildung 29E und F bereits, dass die Zellschicht, die normalerweise hauptsächlich vom Keimzellgewebe gebildet wird, in ihrer Dicke reduziert ist. Histologisch auffällig ist der Verlust der strengen Schichtung der einzelnen Keimzelltypen von der Basalmembran zum Lumen. Die verminderte Anzahl der Zellen führt auch zu einer Auflösung der Hodenkanälchenstruktur.

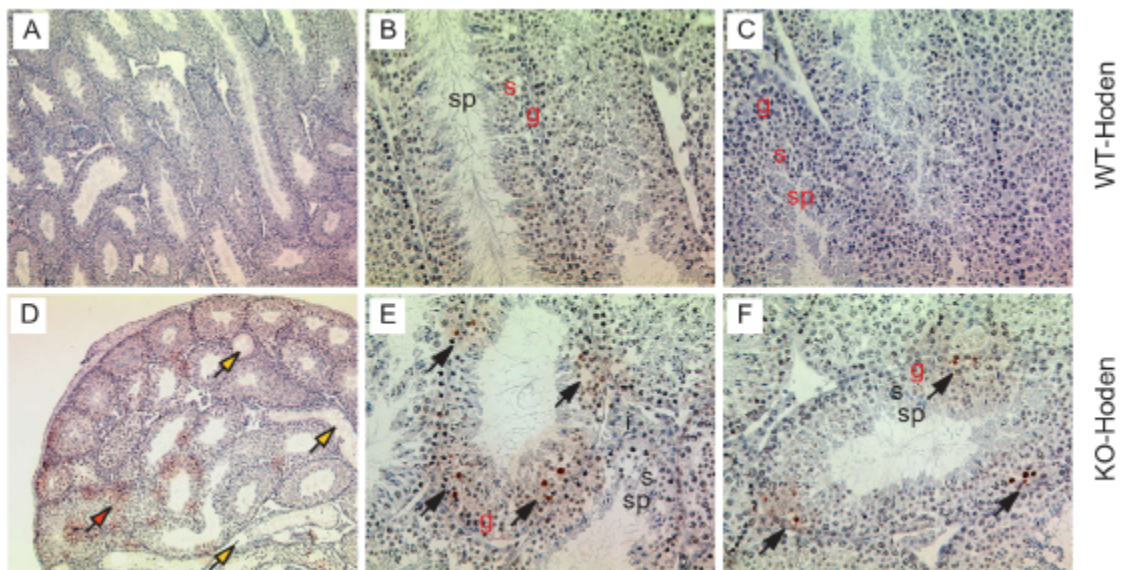


Abbildung 29 Apoptose-Nachweis in adulten Hodengewebe

TUNEL-Färbung (braun) zur Detektion apoptotischer Zellen: In der Übersicht erkennt man im KO^{MORE} -Tier (D) degenerative Hodenkanälchen (gelber Pfeil), während im WT-Tier (A) keine veränderten Kanälchen zu erkennen sind. Im KO^{MORE} -Tier (E-F) sind einige apoptotische Zellkerne (schwarzer Pfeil) mit dem TUNEL-Verfahren angefärbt worden. Im WT-Tier (B-C) sind keine apoptotischen Zellen detektierbar. Gegenfärbung (blau): Hämatoxylin.

Obwohl nur wenige apoptotische Zellen zu detektieren sind, hat das Zellsterben doch große Ausmaße. Einige Hodenkanälchen haben ihr Keimepithel bereits völlig verloren. Außerdem muss man beachten, dass die apoptotischen Zellen im Hoden rasch phagozytiert werden, denn sie sind von den auf Phagozytose spezialisierten Sertoli-Zellen umgeben. Diese Zellen phagozytieren im gesunden Hoden unter anderen den Restkörper der Spermien, der bei der Komprimierung des Zellvolumens entsteht. Es lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass das Keimepithel während der Spermatogenese durch Apoptose zugrunde geht.

Elektronenmikroskopische Analyse des Hodendefekts

In formalinfixierten Gewebe wird die Hodenstruktur nur unzulänglich konserviert, daher verwendet man zur akkuraten Identifizierung der Zelltypen und ihrer Morphologie in der Regel andere Fixierungen. Besonders geeignet ist zum einen eine Fixierung mit Glutaraldehyd oder die Fixierung nach Bouin. Die Zellmorphologie bleibt wesentlich besser erhalten und lässt sich auch elektronenmikroskopisch untersuchen und darstellen. Um die Veränderungen im Hoden genauer zu analysieren und die unterschiedlichen Zelltypen zuordnen zu können, wurden Ultradünnschnitte angefertigt und elektronenmikroskopisch untersucht. Für die Durchführung dieser Arbeiten danke ich Herrn J. Bedorf (Institut für Pathologie, Bonn).

In Abbildung 30A bis C ist der normale Aufbau der Zellschichten des Keimepithels von der Basalmembran (Abbildung 30A) bis in das Lumen (Abbildung 30C) gezeigt. Man kann deutlich die einzelnen Zelltypen erkennen, die sich bis ins Lumen des Hodenkanälchen stark verändern. Direkt an der Basalmembran liegen die Spermatogonien. Sie werden von den Spermatozyten abgelöst. Noch weiter Innen liegen findet man dann die Spermatischen, die an der sich entwickelnden Acrosomenkappe zu erkennen sind. Im Lumen des Hodenkanälchen findet man viele unreife Spermien, der haploide Zellkern wurde stark komprimiert und erscheint im Elektronenmikroskop schwarz.

Im KO^{MORE}-Hoden hat sich die normale Morphologie des Hodenkanälchen aufgelöst. Es sind nur noch wenige Zellschichten zu erkennen. In Abbildung 30D sieht man nur noch wenige Spermien im Lumen liegen. In dem Hodenkanälchen in Abbildung 30E sind gar keine Spermien mehr zu erkennen, man findet außerdem nur noch eine einzige Zellschicht, die direkt und der Basalmembran liegt. In Hodenkanälchen in denen man noch einige Spermien findet, sind diese häufig unregelmäßig geformt (Abbildung 30F). Nicht nur der Aufbau des Hodenkanälchen hat sich im KO^{MORE}-Tier stark verändert. Man findet auch Veränderungen in den Zellkernen. Normalerweise erscheinen die Zellkerne der an der Basalmembran liegenden Spermatogonien im Elektronenmikroskop flockig grau strukturiert (Abbildung 30A). Im KO^{MORE}-Hoden erscheint der Zellkern heller und weist kompakte ringförmige oder klumpige DNA-Strukturen auf. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um kondensiertes Chromatin.

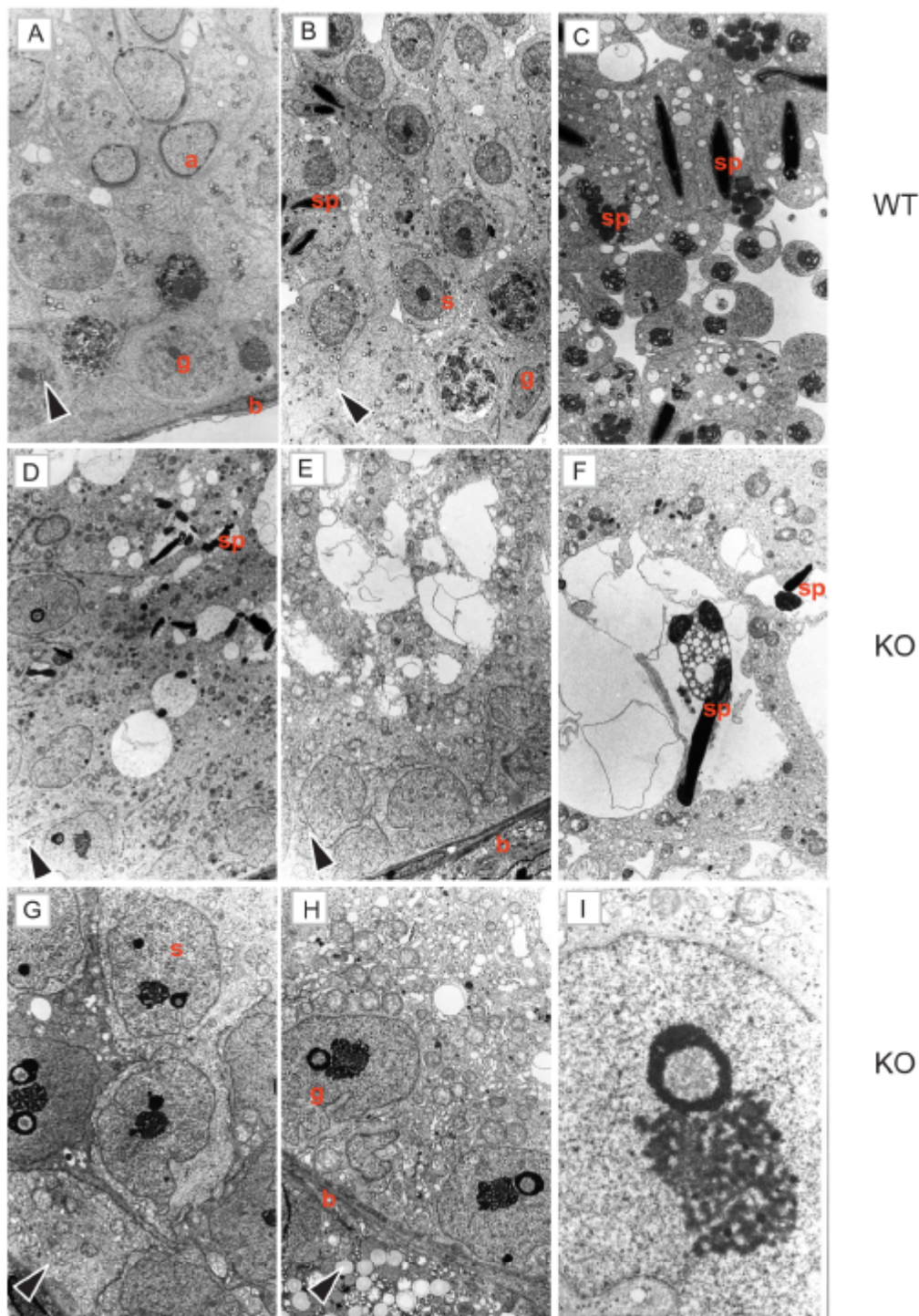


Abbildung 30 Hoden im EM

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Hodengewebes: **A-C**: WT-Hoden; **D-I**: KO^{MORE}-Hoden;

In **A-C** ist die normale Differenzierung der Keimzellen gezeigt, von der Basalmembran (**A**) bis in das Lumen (**C**); im KO^{MORE}-Hoden ist dieser Ablauf gestört. **D**: Es sind nur noch wenige Spermien im Lumen zu sehen, die Anzahl der epithelialen Zellschichten ist stark vermindert **E**: es werden keine Spermien mehr gebildet; **F**: im Lumen nur noch vereinzelt, unregelmäßig geformte Spermien; **G, H**: in den Zellkernen haben sich ringförmige DNA-Strukturen gebildet; **I**: Vergrößerung eines Zellkerns;

a: Spermatid mit Acrosomenbläschen; sp: Spermium; s: Spermatozyt; g: Spermatogonium; b: Basalmembran; das schwarze Dreieck weist in Richtung des Lumens;

Während apoptotischer Prozesse kommt es zu biochemischen und morphologischen Veränderungen in den Zellen, unter anderem kondensiert das Chromatin. Erst später im Apoptoseprozeß kommt es dann zum Abbau der DNA und zum Auflösen der Zelle, die apoptotischen Körperchen werden sofort von den Sertoli-Zellen phagozytiert. Im Hoden der KO^{MORE} -Tiere kommt es zum Absterben der Spermatogonien. Das bedeutet, dass bereits eine frühe Phase der Spermatogenese nämlich die Spermazytogenese in den AP-2 gamma defizienten Tieren gestört ist.

Defekt im Ovar

Nachdem die männlichen KO^{MORE} -Tiere einen Hodendefekt aufweisen, der zur Infertilität führt, wurden auch die Ovarie von KO^{MORE} -Weibchen untersucht. AP-2 gamma wird in der Genitalleiste ab dem Tag E11,0 exprimiert und man findet AP-2 gamma auch im adulten Tier im Ovar. Es ist außerdem bekannt das in einer Reihe von Tiermodellen beide Geschlechter von Infertilität betroffen sind (Cooke und Saunders 2002). Im reifen WT-Ovar findet man zahlreiche Follikel unterschiedlicher Reifestadien und Gelbkörper (Abbildung 31A). Jede einzelne Oozyte wird vom Follikelepithel umkleidet und bilden zusammen mit dem Epithel das Follikel. In Abbildung 31B ist sind zwei Follikel angeschnitten, man erkennt im Inneren die Oozyte, die von Follikelepithelzellen umgeben ist. Die Follikel nehmen einen Großteil des Ovars ein, während das Stroma ovarii zwischen die einzelnen Follikeln gedrängt wird.

Im KO^{MORE} -Ovar (Abbildung 31C, D) hingegen, findet man keine Follikel, der gesamte Ovar besteht nur aus dem Follikelepithel und dem Stroma ovarii. Beide Gewebe wachsen diffus ineinander. Wie die KO^{MORE} -Männchen waren auch die KO^{MORE} -Weibchen steril, bei keinem KO^{MORE} -Weibchen mit erfolgter Loop-out-Reaktion (Abbildung 15) fanden sich Follikel oder Oozyten im Ovar.

Dieser im KO^{MORE} -Ovar beobachtete Phänotyp ähnelt dem im Hoden beobachteten Phänotyp, auch hier sind die Keimzellen betroffen. Im Hoden sterben Keimzellen unterschiedlichster Reifegrade durch Apoptose ab (Abbildung 29), daher wurde auch im adulten Ovar nach apoptotischen Zellen gesucht. Im WT-Ovar findet man nur im sich rückbildenden Gelbkörper apoptotische Zellen (Abbildung 32B, C). In den reifenden Follikeln findet man keine Apoptosen. Man sieht in einem Teil des Follikels zwar eine braune Färbung, diese ist aber nicht kernständig, wie bei apoptotischen Zellen, sondern sie befindet sich extrazellulär im Bereich der Zona pellucida reifer Follikel (Abbildung 32E, F). Es handelt sich um eine unspezifische Hintergrundfärbung. Im Ovar der KO^{MORE} -Tiere finden sich keine Apoptosen (Abbildung 32H, I).

Die Keimzellen sind schon früher zugrunde gegangen, es sind nur noch die ortsständigen Anteile des Ovars, Follikelepithel und Stroma ovarii zu erkennen, die wie in Abbildung 31 diffus ineinander wachsen.

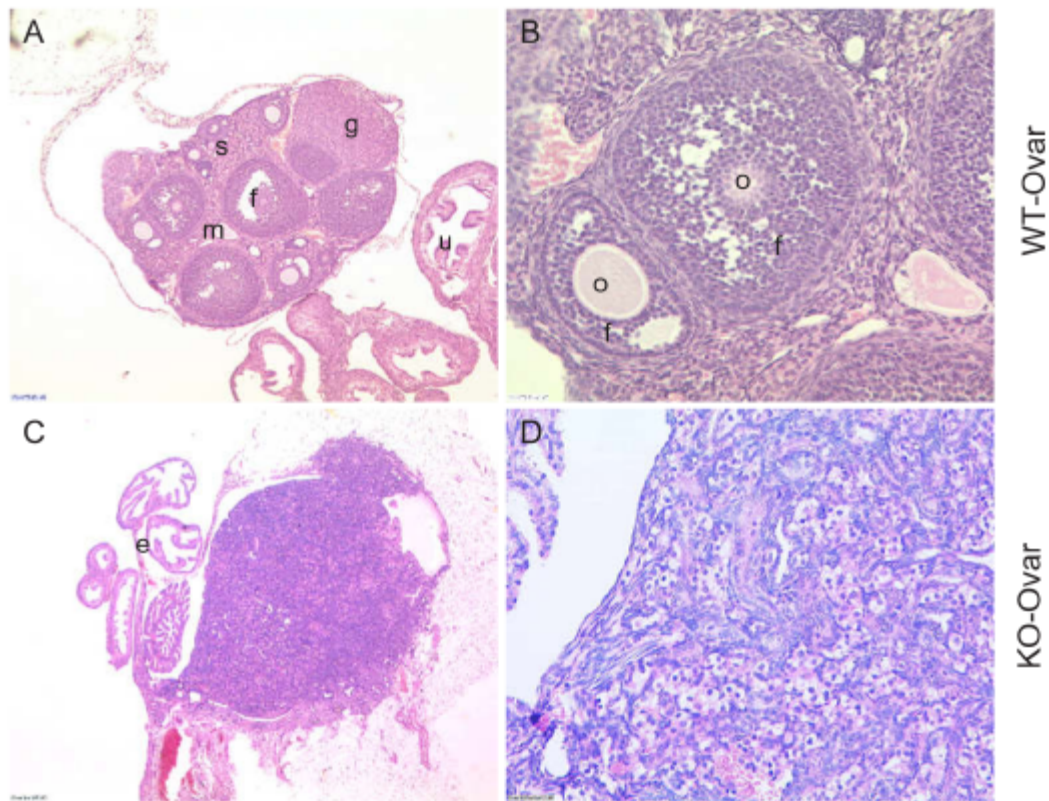


Abbildung 31 Ovar

Schnitt durch den Ovar eines WT-Tieres (A, B) und KO^{MORE}-Tieres (C, D):

A: Übersicht: Ovar eines WT-Tieres mit unterschiedlich reifen Follikeln und einem Gelbkörper;
B: WT-Follikel; **C:** Übersicht: Ovar eines KO^{MORE}-Tieres, ohne Follikel; **D:** Ovar besteht nur aus Follikelepithel und dem Stroma ovarii;

s: Sekundärfollikel; r: reifer Follikel; g: Gelbkörper; o: Oocyte; f: Follikelepithel; m: Stroma ovarii (Mesenchym); e: Eileiter; u: Uterus;

Ein großer Unterschied bei der Reifung der Keimzellen im Männchen oder Weibchen ist, dass im Weibchen die ersten Phasen der Reifung, von der Proliferation der Oogonien bis zur Bildung der Primordialfollikel bereits vor der Geburt abgeschlossen wird. Die Keimzellen arretieren in dieser Phase bis zum Eintritt der Pubertät. Kommt es zu Fehlern in den frühen Phase der Oogenese macht sich dies schon vor der Geburt bemerkbar machen. Im Hoden setzten diese Prozesse erst nach der Geburt ein, daher machen sich auch Fehler während der frühen Spermatogenese erst nach der Geburt oder während der Pubertät und der Geschlechtsreife bemerkbar.

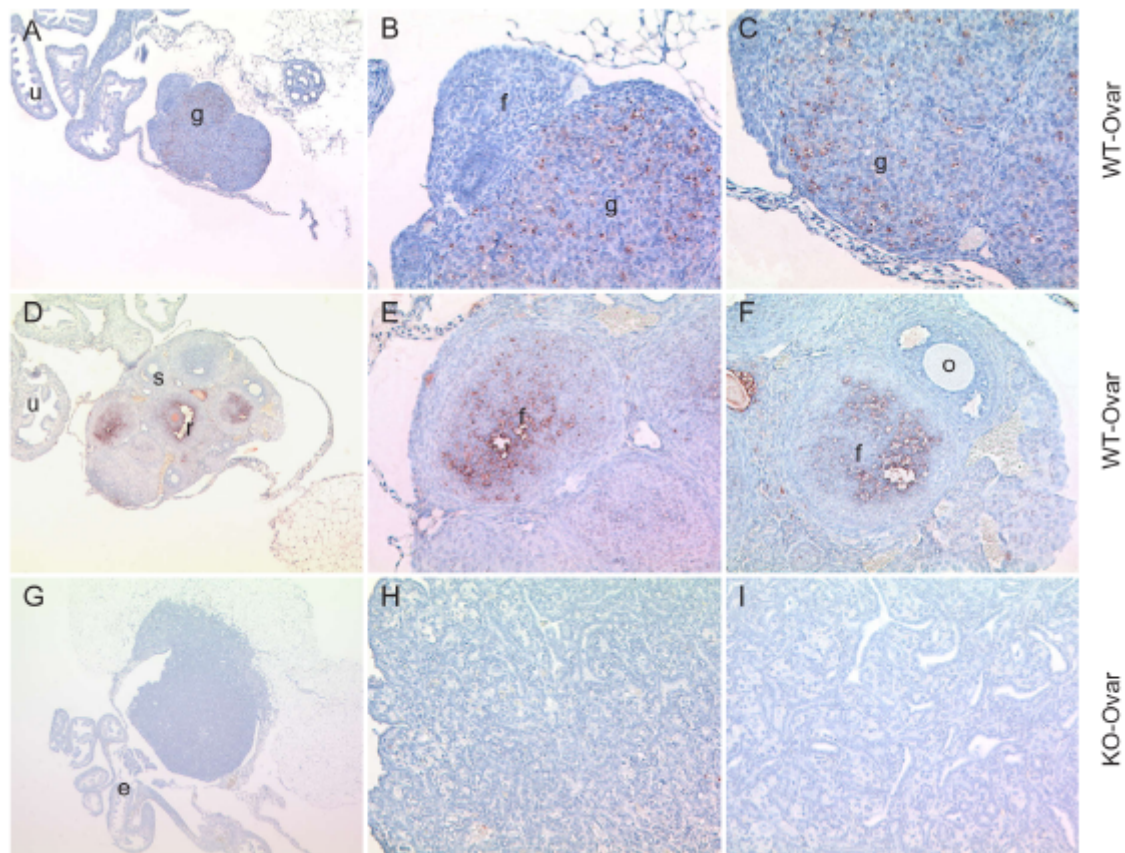


Abbildung 32 Apoptosenachweis im Ovar

TUNEL-Färbung (braun) zur Detektion apoptotischer Zellen: In der Übersicht erkennt man im KO^{MORE}-Ovar (**G**) keine apoptotischen Zellen, auch in der Vergrößerung (**H, I**) sind keine gefärbten Zellkerne zu erkennen. Im WT-Ovar (**A, D**) findet man in der Übersicht eine auf Apoptose hinweisende Braunfärbung. Im Schnitt durch das WT-Ovar (**B-C**) sind in der Vergrößerung viele apoptotische Zellkerne zu erkennen, sie liegen jeweils im Corpus luteum. Im zweiten WT-Ovar (**E-F**) findet man Färbung außerhalb der Kerne in der sich entwickelnden Zona pellucida. Es sind keine apoptotische Zellen detektierbar. Gegenfärbung: Hämatoxylin.

Brustdrüsen von AP-2 gamma defizienten Tieren

AP-2 gamma spielt während der Schwangerschaft nicht nur in der Entwicklung der Plazenta und des Embryos eine wichtige Rolle. Aus der Literatur ist bekannt, dass es auch in der Brustdrüse der Maus gegen Ende der Schwangerschaft in Vorbereitung auf die Laktation exprimiert wird. Transgene Mäuse, die AP-2 gamma in der Brustdrüse überexprimieren zeigen einen dramatischen Phänotyp, diese Tiere sind nicht in der Lage zu laktieren (Jäger, unveröffentlichte Daten). Im Menschen ist bekannt, dass AP-2 gamma in vielen Brusttumoren überexprimiert wird (Turner, Zhang et al. 1998). Während von der Maus keine Ergebnisse

vorliegen, ob AP-2 gamma in der Brustdrüse auch außerhalb der Schwangerschaft exprimiert wird, weiß man vom Menschen, dass es außerhalb der Schwangerschaft exprimiert wird (McPherson und Weigel 1999).

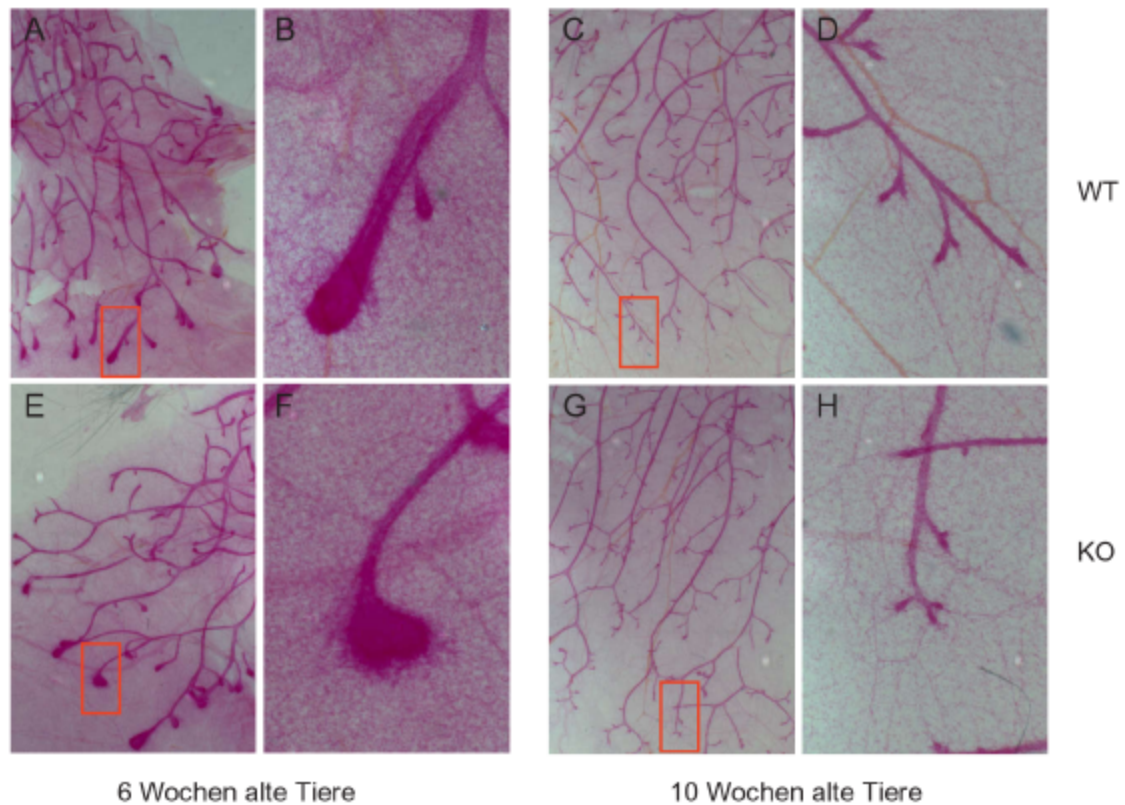


Abbildung 33 Brustdrüsen

Karminfärbung von Brustdrüsen: **A:** WT-Brustdrüse eines 6 Wochen alten Weibchens; **B:** Milchgang (WT) zu A; **C:** WT-Brustdrüse eines 10 Wochen alten Weibchens; **D:** Milchgang (WT) zu C; **E:** KO^{MORE}-Brustdrüse eines 6 Wochen alten Weibchens; **F:** Milchgang (KO^{MORE}) zu E; **G:** KO^{MORE}-Brustdrüse eines 10 Wochen alten Weibchens; **H:** Milchgang (KO^{MORE}) zu G;

Aufgrund dieser Kenntnisse lag es nahe die Brustdrüsen der KO^{MORE}-Weibchen zu untersuchen. Durch den Verlust der Keimzellen (Abbildung 31) war es nicht möglich die Rolle von AP-2 gamma in den KO^{MORE}-Tieren während der Schwangerschaft zu untersuchen. Daher wurden die Brustdrüsen nicht trächtiger Tiere untersucht. Es fanden sich weder in der juvenilen Brustdrüse von 6 Wochen alten Weibchens, noch in der Brustdrüse von 10 Wochen alten Weibchen Unterschiede im Aufbau und in der Morphologie der Brustdrüse (Abbildung 33). Die Milchgänge werden in den KO^{MORE}-Tieren angelegt (Abbildung 33C und D) und entwickeln sich (Abbildung 33G und H) parallel zu denen der WT-Tiere.

Defekt in der Trachea

AP-2 gamma wird während der Embryonalentwicklung unter anderem in den Neuralleistenzellen, die in Kiemenbögen einwandern, exprimiert. Der 3. Kiemenbogen ist an der Entwicklung der Trachea beteiligt. Außerdem kennt man andere Knockout-Studien, in denen Tiere zum einen Spina bifida entwickeln und zum anderen eine deformierte Trachea ausbilden (z.B. TRAF4-KO-Tiere (Regnier, Masson et al. 2002)). Daher lag es auf der Hand auch in der Trachea nach Unterschieden zwischen WT- und KO^{MORE}-Tieren zu suchen. Es wurden an der Trachea Veränderungen festgestellt.

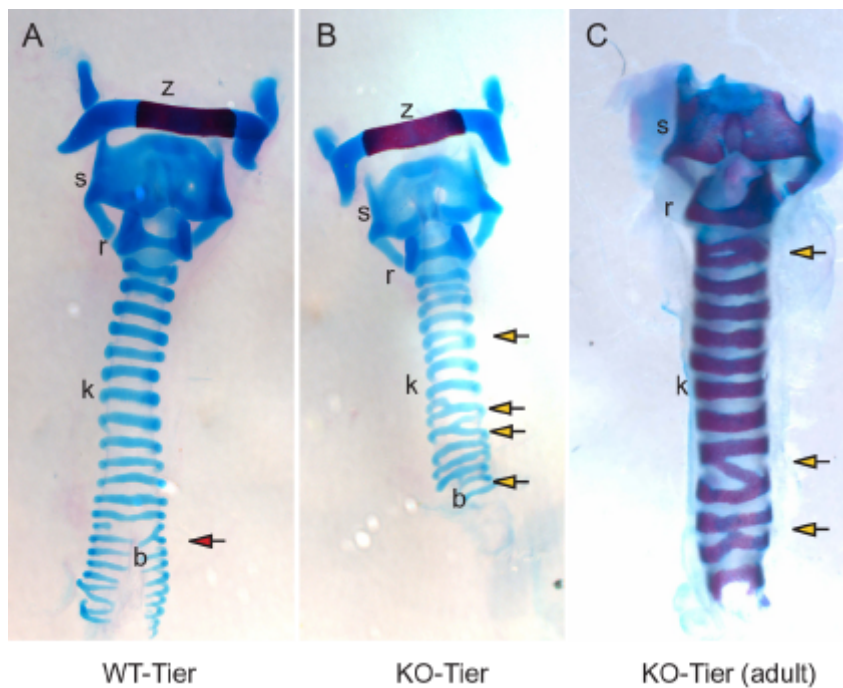


Abbildung 34 Tracheadefekt

Knochen-Knorpel-Färbung der Trachea: **A:** WT-Trachea eines Neugeborenen; Verästelungen treten erst im Bereich der Bifurkation auf (roter Pfeil); **B:** KO^{MORE}-Trachea eines Neugeborenen: die Knorpelspannen sind an mehreren Stellen miteinander verknöchert (gelbe Pfeile); **C:** KO^{MORE}-Trachea eines Adulten (Zungenbein fehlt): die Knorpelspannen sind an mehreren Stellen miteinander verknöchert und von unregelmäßiger Form (gelbe Pfeile); z: Zungenbein; s: Schildknorpel; r: Ringknorpel; k: Knorpelspannen; b: Bifurkation;

Die Knorpelspannen der Trachea sind fehlgebildet. Im WT-Tier (Abbildung 34A) sind die Knorpelspannen regelmäßig und gleichmäßig ausgebildet. Man findet leicht unregelmäßige Knorpelspannen erst caudal der Bifurkation (roter Pfeil), in den beiden Hauptbronchien. Im Gegensatz dazu treten bei den beiden KO^{MORE}-Tieren (Abbildung 34B, C) starke

Verwachsungen der einzelnen Knorpelspangen auf (gelbe Pfeile). Kehlkopf und Ringknorpel weisen keine Veränderungen auf. Das Tier in Abbildung 34B war kleiner als das Kontrolltier, obwohl beide Tiere aus dem gleichen Wurf stammen, dieser Größenunterschied findet sich auch in der Trachea und dem Kehlkopf wieder.

Die hier verwendeten Tiere waren lebensfähig und zeigten keine Auffälligkeiten bei der Atmung oder Nahrungsaufnahme. Es ist anhand der vorliegenden Anomalien auch keine Beeinträchtigung zu erwarten. Die Trachea ist immer noch flexibel bei Bewegung des Kopfes oder bei Schluckbewegungen. Der dorsal der Trachea liegende Ösophagus wird nicht verengt oder verlegt, da die Knorpelspangen zu Ösophagus hin normal geöffnet sind. Da der Kehlkopf nicht deformiert ist, sind von hier aus auch keine Beeinträchtigungen bei Nahrungsaufnahme oder Atmung zu erwarten. Die Anzahl der auf einen Tracheadefekt untersuchten KO^{MORE}-Tiere war gering (n=5), es zeigten jedoch alle KO^{MORE}-Tiere diesen Tracheadefekt, keines der WT-Tiere hatte Verwachsungen oberhalb der Bifurkation. Es lässt sich aufgrund dieser Daten nicht auf einen allgemeinen, durchgängigen Phänotyp schließen, weitere Analysen sind nötig um diesen Defekt in den KO^{MORE}-Tieren zu verifizieren.

Geschlechtsspezifischer Phänotyp

Man findet geschlechtsspezifischen Unterschiede bei KO^{MORE}-Tiere nicht nur in den Gonaden, in denen bei den Weibchen keine Keimzellen zu finden sind, während in den Hoden nur einzelne Hodenkanälchen ihr Keimepithel verloren haben. Im Ovar hat sich der Phänotyp im adulten Tier bereits voll entwickelt, während sich der Phänotyp im Hoden mit zunehmenden Alter weiter verstärkt. Es besteht hier also eine zeitliche Differenz in der Entwicklung des Gonadenphänotyps, die vor allem mit dem unterschiedlichen Zeitplan der Reifung von Oozyten und Spermien zusammenhängt. Im Ovar sind im WT-Tier bereits alle Eizellen bei der Geburt angelegt, während die Spermien im Hoden fortwährend neu gebildet werden.

Ein großer geschlechtsspezifischer Unterschied ist die männliche Prädisposition für das Auftreten des Neuralrohrschlussdefekts. Die Spina bifida trat nur in männlichen Tieren auf, ebenso fand man den gekrümmten Schwanz nur in männlichen KO^{MORE}-Tieren. Der „curly tail“ war immer mit einer Spina bifida gekoppelt. Da bei Embryonen das Geschlecht erst spät in der Embryonalentwicklung zu erkennen ist, wurden das Geschlecht durch PCR aus Embryonalhaut-DNA bestimmt. In dieser PCR wird zum einen das X-Chromosom detektiert, zum anderen das Y-Chromosom. Eine solche PCR ist in Abbildung 35 gezeigt, es wurde unter anderem auch DNA von Embryonen mit Spina bifida verwendet und diese Embryonen waren alle männlich. Es bestätigte sich also auch durch diese PCR-Ergebnissen, dass nur männliche KO^{MORE}-Tieren eine Spina bifida ausbilden.

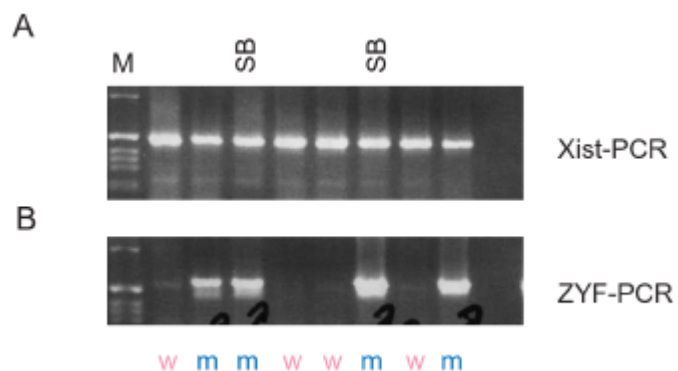


Abbildung 35 Geschlechtsbestimmung mittels PCR

PCR aus embryonalen Eihäuten: **A:** Nachweis des eines spezifisch X-chromosomalen Sequenz (als Kontrolle), alle Eihäute positiv; **B:** Nachweis einer spezifisch Y-chromosomalen Sequenz ; 4 positive Eihäute, es handelt sich um 4 Männchen, zwei der Embryonen haben eine Spina bifida.

M: Marker; SB: DNA von Tieren mit Spina bifida; w: weiblich; m: männlich;

Statistik

Es wurden 541 Tiere aus der Verpaarung von AP-2 $\gamma^{wt/KO}$ $MORE^{wt/cre}$ Tieren mit AP-2 $\gamma^{CKO/CKO}$ Tieren genotypisiert, davon hatten 90 Tiere (17%) einen KO^{MORE} -Genotyp (AP-2 $\gamma^{(c)KO/KO}$ $MORE^{wt/cre}$). Nach Mendel würde man 25% KO^{MORE} -Tiere erwarten. Die 8% geringere KO^{MORE} -Wahrscheinlichkeit lässt sich durch die Resorptionen einiger KO^{MORE} -Embryonen während der Embryonalentwicklung und doch die erhöhte Letalität nach der Geburt erklären. Einige tote Neugeborenen ließen sich nicht mehr genotypisieren. Von den 90 KO^{MORE} -Tieren waren 46 Neugeborene bzw. Adulte und 44 Embryonen von Tag E9,5 bis Tag E15,5.

Während alle KO^{MORE} -Tiere gleichermaßen einen Gonadenphänotyp aufweisen, sind von der Spina bifida nur 30% der Tiere betroffen. Kein einziges weibliches KO^{MORE} -Tier hatte eine Spina bifida oder einen gekrümmten Schwanz. Während eine Spina bifida gleichermaßen häufig bei Embryonen, Neugeborenen und Adulten auftrat, fand man einen „curly tail“ häufiger bei Embryonen als bei Neugeborenen oder Adulten. Von den 14 geborenen KO^{MORE} -Tieren mit Spina bifida hatten nur 5 Tiere einen gerollten oder geknickten Schwanz (35%). Bei den Embryonen hingegen hatten von den 15 KO^{MORE} -Tiere mit Spina bifida 14 Tiere einen „curly tail“ (93%). Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass ein Großteil der geknickten oder gerollten Schwänze sich noch vor der Geburt verwächst und daher unauffällig war. Im Gegensatz dazu schließt sich die Spina bifida nicht während der Embryonalentwicklung. Der Defekt wird erst nach der Geburt von Haut überwachsen.

Zusammenfassung: KO^{MORE}-Knockout-Tiere

AP-2 gamma KO^{MORE}-Tiere zeigen einen Phänotyp, der sich aus einer Reihe unterschiedlicher Defekte zusammensetzt. Die Tiere haben einen schweren Defekt in den Keimzellen. Bei den Weibchen findet man keine Follikeln oder Oozyten im Ovar, die Männchen entwickeln mit dem Einsetzen der Spermatogenese ein Verlust des Keimepithels in einzelnen Hodenkanälchen. Zusätzlich zum Hodendefekt sind die Tiere von Cryptorchidismus betroffen, der Hoden sinkt nicht in das Skrotum ab.

Männliche Tiere haben zum Teil außer dem Defekt in den Hoden eine Spina bifida und einen sogenannten „curly tail“. Das Neuralrohr schließt sich während der Embryonalentwicklung im Bereich der Lenden und Sakralwirbelsäule nicht vollständig. Infolge der Spina bifida kommt es beim sekundären Auswachsen des Schwanzes zu einem geknicketen oder gerollten Schwanz.

Diese KO-Tiere wurden durch das Cre-loxP-System erzeugt, ein konditionales Allel wird mit Hilfe der gewebespezifischen Cre-Rekombinase in ein KO-Allel überführt. In diesem Fall war das die Epiblasten spezifische Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Mox2-Promotors. In Abhängigkeit der Effizienz der Loop-out-Reaktion findet man in einem Teil der Zellen und Gewebe konditionale Allele, an denen keine Loop-out-Reaktion stattgefunden hat. Es ist daher notwendig die Ausprägung oder Schwere des Defekts in einem Tier oder einem Organ in Relation zur Effektivität der Loop-out-Reaktion zu setzen.

Wnt1-Knockout

Alle AP-2 Transkriptionsfaktor, deren Expressionsmuster man kennt, werden in den Neuralleistenzellen und ihren Derivaten exprimiert. Um die Funktion von AP-2 gamma in dieser Zellpopulation zu untersuchen wurde eine geeignete, in diesen Zellen exprimierte Cre-Rekombinase ausgewählt, die in die konditionale AP-2 gamma Mauslinie eingekreuzt werden konnte. Diese Wnt1-Cre-Rekombinase wird ausschließlich in den Neuralleistenzellen exprimiert (Chai, Jiang et al. 2000). Dieses Cre-Rekombinase-Transgen wurde nach gleichem Prinzip wie das MORE-Cre-Rekombinase-Transgen in die konditionale AP-2 gamma Linie eingekreuzt. Zuerst wurden Cre-Rekombinase transgene Mäuse mit für AP-2 gamma heterozygot defizienten Tieren verpaart, die Nachkommen (AP-2 gamma^{wt/KO} Wnt1^{wt/cre}) letztendlich mit für AP-2 gamma homozygot konditionalen Tieren (AP-2 gamma^{CKO/cKO}) verpaart. Die Nachkommen aus dieser Verpaarung wurden mittels PCR genotypisiert (Abbildung 37) und anschließend analysiert. Aus dieser Verpaarung gingen 39 Nachkommen hervor, 10 Tiere hatten einen KO^{Wnt1}-Genotyp. Diese KO^{Wnt1}-Tiere zeigten keinen der für die KO^{MORE}-Tiere beschriebenen Phänotyp, es waren weder die Gonaden betroffen, noch entwickelten die Männchen eine Spina bifida.

Um die Expression der Cre-Rekombinase zu überprüfen wurden die transgenen Wnt1-Cre-Rekombinase-Tiere mit den R26R-Tieren (Rosa26-Cre-Reporter) verpaart. Zellen und Gewebe, in denen eine Loop-out-Reaktion stattgefunden hat, lassen sich, wie auch schon für die transgene MORE-Mauslinie gezeigt (Abbildung 13), anschließend durch eine LacZ-Färbung nachweisen. Es zeigte sich, dass das Transgen genauso wie in der Literatur beschrieben (Chai, Jiang et al. 2000) ausschließlich in den Neuralleistenzellen exprimiert wird. Der wichtigste Expressionsort ist der Kopfbereich, vor allem im 1. und 2. Kiemenbogen und im frontonasalen Bereich, des weiteren findet man eine Expression des Transgens in den cranialen Ganglien. Im restlichen Körper wird die Wnt11-Cre-Rekombinase nur noch in den dorsalen Wurzelganglien exprimiert.

Nachdem durch die Verpaarung der Wnt1^{wt/Cre} Mäusen mit den R26R-Mäusen ausgeschlossen werden konnte, dass die Cre-Rekombinase nicht wie in der Literatur angegeben exprimiert wird, wurde die Effizienz der Loop-out-Reaktion untersucht. Die meisten Gewebe enthalten nur eine kleine Population an Zellen, die von der Neuralleiste abstammen bzw. in denen die Cre-Rekombinase unter dem Wnt1-Promotor exprimiert wird. Man sieht in den Ergebnissen der Genotypisierung aus Schwanzspitze-DNA (Abbildung 37A, AP-2 gamma PCR), dass die konditionale Bande in Tier 1 und Tier 3 erhalten bleibt, obwohl diese Tiere das Transgen besaßen (Abbildung 37A, Wnt1-PCR). Das bedeutet, dass in der Schwanzspitzenbiopsie keine oder nur wenig Zellen enthalten waren in denen eine Loop-out-Reaktion stattgefunden hat. Die Loop-out-Reaktion ist in dieser Gewebeprobe nicht nachweisbar. Um eine Loop-out-Reaktion in

den KO^{Wnt1} -Tieren nachzuweisen, muß man Organe oder Gewebe untersuchen, in denen man eine Expression des Transgens zu einem hohen Prozentsatz erwartet. In diesem Fall wurden die dorsalen Wurzelganglien untersucht. Diese Ganglien werden von den Neuralleistenzellen während der Embryonalentwicklung gebildet. Wie in Abbildung 36 gesehen, wird in den dorsalen Wurzelganglien das Wnt1-Cre-Rekombinase-Transgen exprimiert.

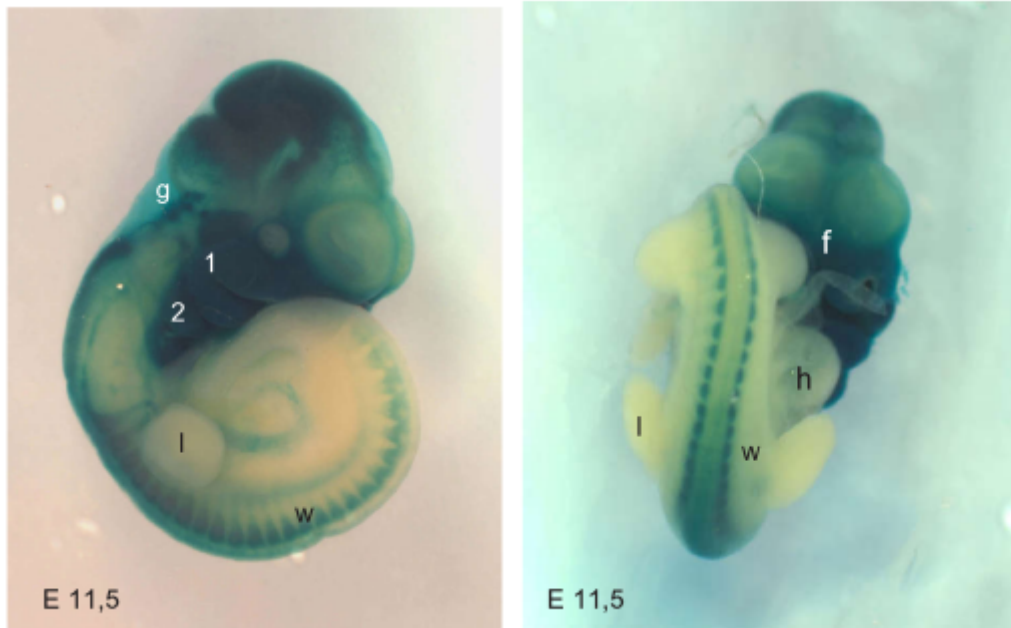


Abbildung 36 WNT1-Cre Expression in R26R-Mäusen

LacZ-Färbung eines Embryo (E11,5) aus der Verpaarung von R26R x Wnt1-Cre-Transgenen: l: Gliedmaßenknospe; w: dorsale Wurzelganglien; g: craniale Ganglien; 1: 1. Kiemenbogen; 2: 2. Kiemenbogen;

In Abbildung 37 sind die PCR Ergebnisse einer Genotypisierungsreaktion gezeigt, in der Schwanzspitzenbiopsie-DNA im Vergleich mit Rückenmarks-DNA und der DNA der dorsalen Wurzelganglien gezeigt wird. Es wurden die Proben von zwei KO^{Wnt1} -Tieren und eines Kontrolltieres ohne Cre-Rekombinase aufgetragen. In der Spur, in der die Schwanzspitzenbiopsie-DNA zur Genotypisierung verwendet wurde, erkennt man bei allen Tieren eine konditionale Bande bei 343bp. Gleiches gilt für die DNA aus dem Rückenmark, auch hier sieht man in allen Proben nach der PCR-Reaktion eine konditionale Bande. In den DNA-Proben aus den dorsalen Wurzelganglien (je zwei Proben pro Tier) lässt sich die konditionale Bande jedoch nur noch in dem Kontrolltier nachweisen. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die Loop-out-Reaktion in den dorsalen Wurzelganglien stattgefunden hat. Die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Wnt1-Promotors ist in den Neuralleistenzellen aktiv. Für einen Phänotyp hat die Loop-out-Reaktion in den dorsalen Wurzelganglien keine

Bedeutung, da AP-2 gamma nicht in den dorsalen Wurzelganglien exprimiert wird, ganz im Gegensatz zu AP-2 alpha und AP-2 beta.

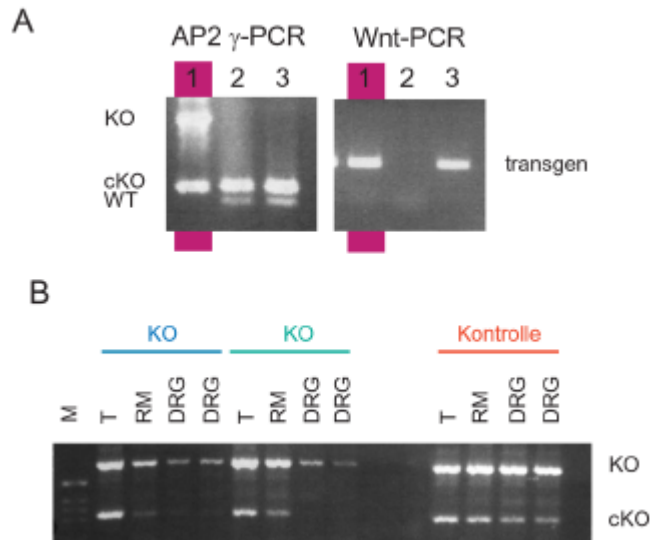


Abbildung 37 Wnt1-PCR und Loop-out-Effizienz in den DRGs

A: Beispiel einer Genotypisierung-PCR für KO^{Wnt1} -Tieren: jede Spur entspricht einem Tier; für jedes Tier wurden eine PCR zur Bestimmung der AP-2 gamma Allele und eine PCR zur Bestimmung des Wnt1-Transgens durchgeführt; **B:** Nachweis der erfolgten Loop-out-Reaktion in dorsalen Wurzelganglien:

M: Marker; T: Schwanzspitze; RM: Rückenmark; DRG: dorsale Wurzelganglien; KO: KO^{Wnt1} -Tier; WT: WT-Tier; KO: Knockout-Allel (700bp); cKO: konditionals Allel (434bp); WT: Wildtyp-Allel (300bp);

Doppelt defiziente Tiere

Die einzelnen Expressionsmuster der verschiedenen AP-2 Proteine überlappen sich gerade zu Beginn der Embryonalentwicklung stark. So sind alle AP-2 Proteine in den auswandernden Neuralleistenzellen exprimiert. Es ist daher möglich, dass sich die einzelnen AP-2 Proteine in verschiedenen Geweben aufgrund ihrer ähnlichen Affinität zu dem DNA-Bindemotiv in ihrer Funktion ersetzen oder zumindest teilweise unterstützen können. Eine Möglichkeit, diese überlappenden, von zwei oder mehreren Genen gleichzeitig ausgeübte Funktionen zu untersuchen, ist die Analyse von doppelt defizienten Tieren.

AP-2 alpha beta Doppel-Knockout-Tiere

Für die Analyse der gemeinsamen oder überlappenden Funktionen von AP-2 alpha und AP-2 beta wurden auf konventionellen Weg durch Verwendung von zwei heterozygot defizienten Tierelinien (AP-2 alpha^{WT/KO}; AP-2 beta^{WT/KO}) doppelt defiziente Tiere (AP-2 alpha^{KO/KO} beta^{KO/KO}) erzeugt und analysiert. Es wurden über 250 Embryonen verschiedener Embryonalstadien untersucht und anhand ihrer embryonalen Eihäute genotypisiert. Es wurden keine doppelt defizienten Tiere nach dem Tag E12,5 gefunden, alle 11 isolierten DKO-Embryonen wurden zwischen Tag E9,5 und Tag E11,5 isoliert. In Abbildung 38 sind Embryonen verschiedener Embryonalstadien gezeigt. Während der E9,5 WT-Embryo in Abbildung 38C eine seinem Entwicklungsstadium entsprechende Größe erreicht hat, sind sowohl der AP-2 alpha KO-Embryo als auch der AP-2 alpha beta DKO-Embryo (Abbildung 38A und B) wachstumsretardiert. Der DKO-Embryo ist stärker betroffen.

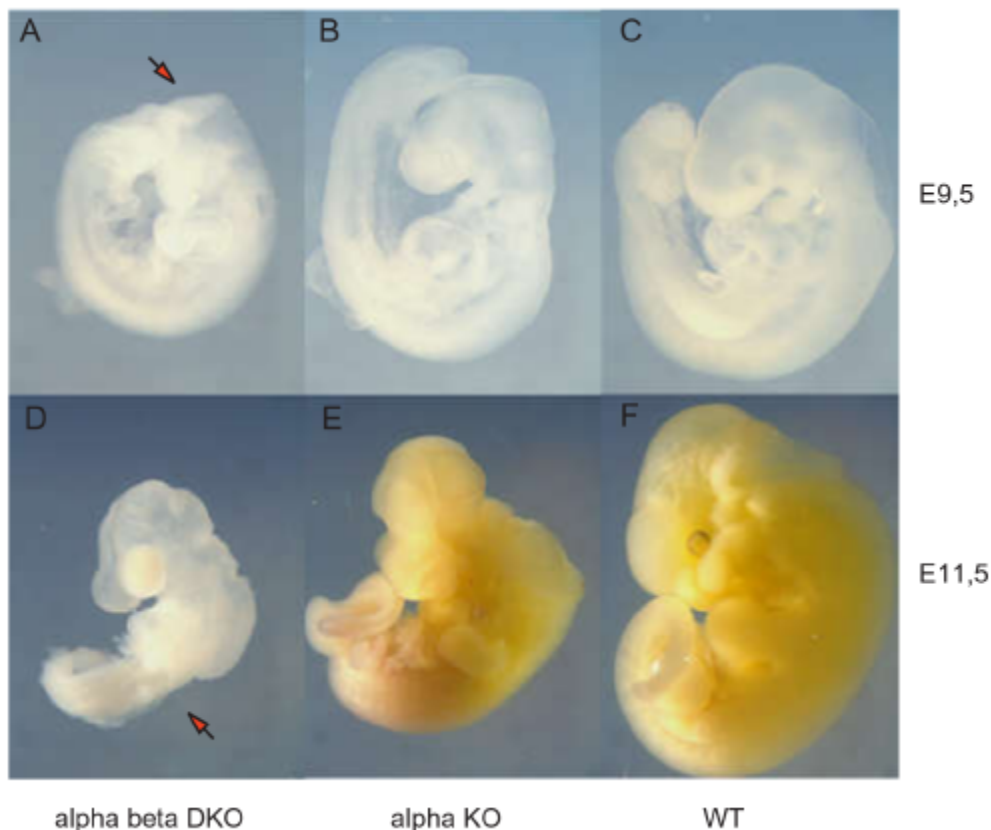


Abbildung 38 AP-2 alpha beta Doppel-KO-Tiere

A: E9,5 alpha beta DKO-Embryo mit fehlendem cranialen Neuralrohrschluss und Wachstumsretardierung; **B:** E9,5 alpha KO-Embryo mit fehlendem cranialen Neuralrohrschluss; **C:** E9,5 WT-Embryo (Kontrolle); **D:** E11,5 alpha beta DKO-Embryo: Körperregion ist retardiert und ohne Gliedmaßenknospen (roter Pfeil), Kopfbereich: fehlender cranialer Neuralrohrschluss; **E:** E11,5 alpha KO-Embryo mit fehlendem cranialen Neuralrohrschluss; **F:** E11,5 WT-Embryo (Kontrolle);

Sowohl bei den AP-2 alpha KO-Embryonen als auch bei den AP-2 alpha beta DKO-Embryonen kommt es zu einem fehlendem Neuralrohrschluss. Am Tag E11,5 ist der DKO-Embryo (Abbildung 38D) weit hinter der normalen Embryonalentwicklung zurück. Der Kopf zeigt den von den AP-2 alpha defizienten Tieren bekannten Phänotyp, allerdings entspricht der Entwicklungszustand des Kopfes einem Tag E10,5 AP-2 alpha KO-Embryo (Abbildung 41B). Der Rumpfbereich ist völlig retardiert, es sind keine Gliedmaßenknospen zu erkennen und es scheint als ob sich das Gewebe bereits auflöst. Während die DKO-Embryo sich vom Tag E9,5 noch weiterentwickeln, kommt es in den E12,5 Embryonen zu einem Wachstumsstopp und letztendlich zum Absterben.

Es zeigt sich das der Phänotyp der AP-2 alpha beta DKO-Tiere wesentlich stärker ist, als nur die Summe der Effekte, die in AP-2 alpha oder beta Knockout-Tieren auftreten. Es bestätigt sich, dass beide AP-2 Proteine sich zumindest in einem Teil der Gewebe in ihrer Funktion ersetzen können.

Tiere aus der AP-2 alpha gamma Doppel-Knockout-Verpaarung

Für die Analyse der alpha gamma doppelt defizienten Tiere ($AP-2 \alpha^{KO/KO} \gamma^{(c)KO/KO} MORE^{wt/cre}$) wurde zum einen das konstitutive AP-2 alpha KO-Allel in die konditionale AP-2 gamma Linie eingekreuzt. Zum anderen wurde AP-2 alpha heterozygote Tiere ($AP-2 \alpha^{WT/KO}$) mit Tieren verpaart, die sowohl MORE-Transgen als auch ein AP-2 gamma KO-Allel tragen ($\gamma^{WT/KO} MORE^{wt/cre}$), diese Tiere wurden auch zur Erzeugung der AP-2 gamma Knockout^{MORE}-Tiere verwendet (Abbildung 12). In der F₃-Generation erhält man letztendlich ein doppelt defizientes Tier mit einer Wahrscheinlichkeit von 1/16 (Abbildung 39).

Aus der AP-2 alpha gamma Verpaarung wurden insgesamt 31 Embryonen isoliert. Keiner dieser Embryonen war ein Doppel-Knockout-Tier. Dennoch zeigten 4 Embryonen einen Phänotyp, der weder dem der AP-2 alpha Knockout-Tiere noch den AP-2 gamma Knockout-Tieren entsprach. Sie hatten zum einen eine Spina bifida, zum anderen hatten sie auch noch eine Cranioschisis. Es kam bei diesen Tieren also zu einer zweifachen Neuralrohrschlussdefekt, einmal cranial und ein weiteres Mal caudal. Diese Embryonen hatten einen $AP-2 \alpha^{WT/KO} \gamma^{(c)KO/KO} MORE^{wt/cre}$ Genotyp, sie besaßen folglich drei KO-Allele.

In Abbildung 40 sind Embryonen (E12,5) aus dieser Verpaarung gezeigt, als Kontrolltiere sieht man in Abbildung 40A und B ein WT-Tier und ein AP-2 gamma KO-Tier mit Spina bifida (grüner Pfeil). In Abbildung 40C ist ein $AP-2 \alpha^{WT/KO} \gamma^{(c)KO/KO} MORE^{wt/cre}$ gezeigt. Er hat zu wie auch der AP-2 gamma KO-Embryo eine Spina bifida, die wesentlich ausgeprägter als beim AP-2 gamma KO-Embryo ist. Sie wölbt sich nicht nur stärker aus dem Embryo hervor,

sondern reicht auch wesentlich weiter nach cranial als dieses bei eine AP-2 gamma KO-Embryo (siehe auch Abbildung 18, roter Pfeil) beobachtet wurde. Es lässt sich aber aufgrund der wenigen analysierten Tiere nicht feststellen, ob dies ein Effekt einer effektiven Loop-out-Reaktion in dieser Körperregion ist oder ob es tatsächlich durch das zusätzliche defiziente AP-2 alpha Allel hervorgerufen wird.

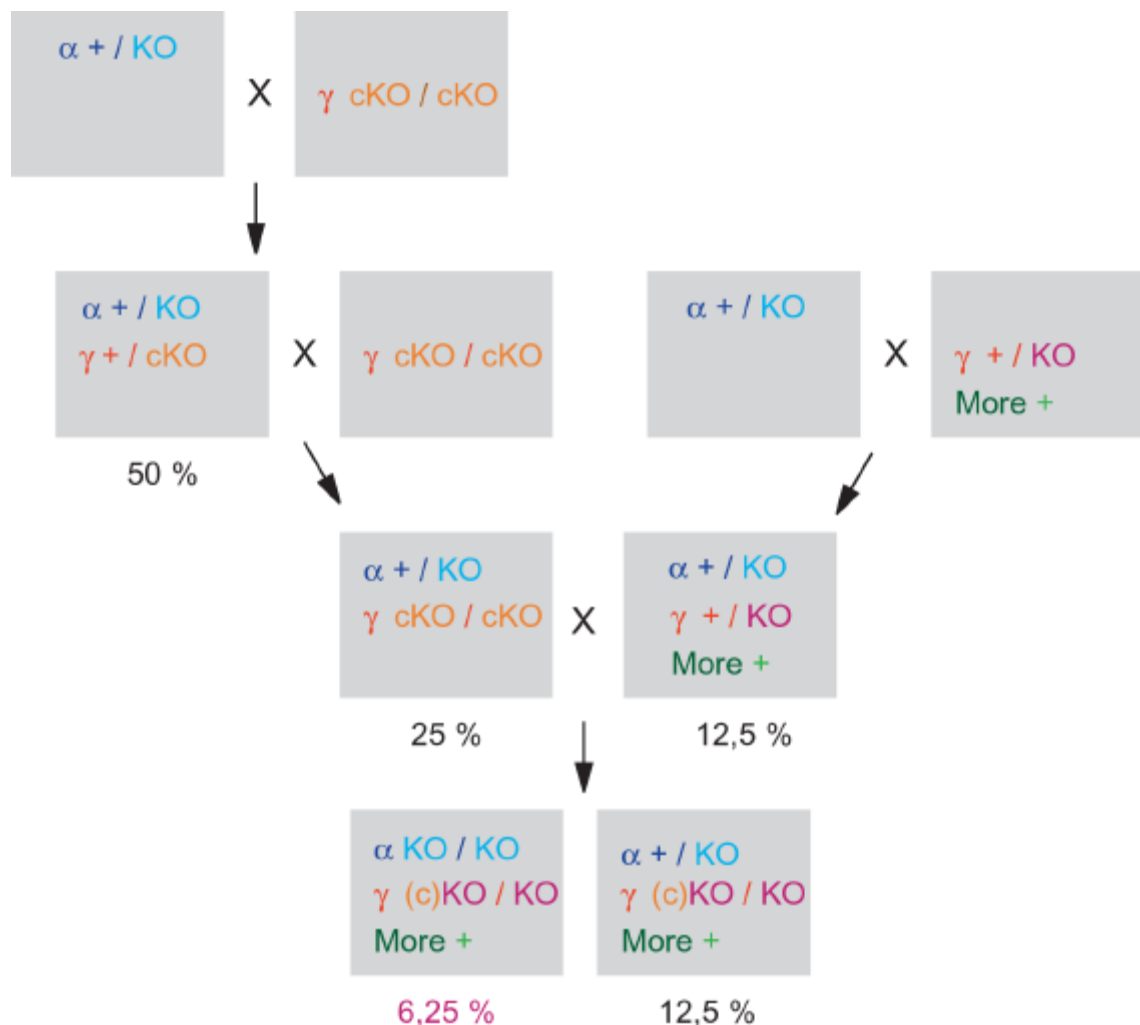


Abbildung 39 Verpaarungsschema AP-2 alpha gamma doppelt defizienter Tiere

Verpaarungsschema zur Erzeugung von Doppel-Knockout-Tiere unter Verwendung der defizienten AP-2 alpha Linie und der konditional defizienten AP-2 gamma Linie. Die Wahrscheinlichkeit für die einzelnen Genotypen ist unter dem entsprechenden Genotyp angegeben. KO: KO-Allel; cKO: konditionales Allel; +: WT-Allel; More: MORE-Transgen;

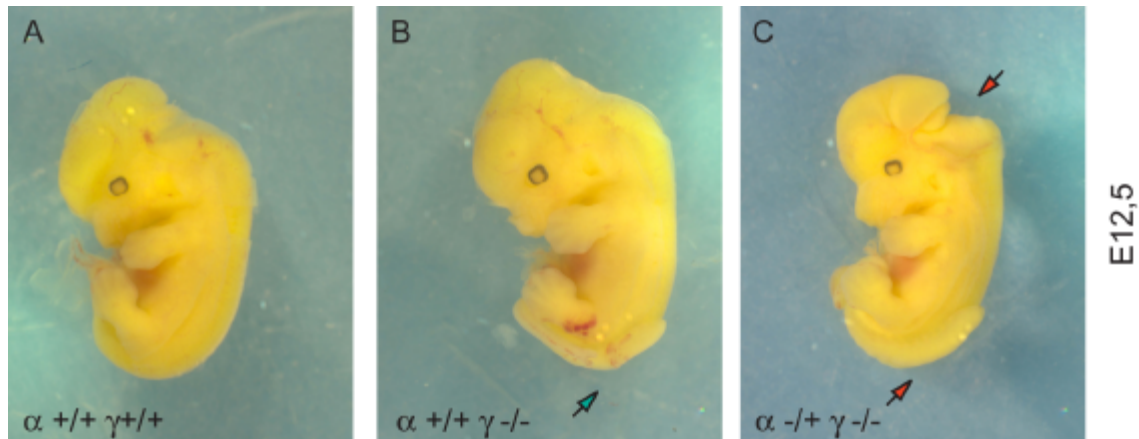


Abbildung 40 Embryonen aus der AP-2 alpha gamma Verpaarung (E12,5)

A: Seitenansicht eines WT-Embryos (E12,5) **B:** Seitenansicht eines AP-2 gamma $\text{KO}^{\text{MORE-}}$ Embryos (E12,5) mit Spina bifida (grüner Pfeil) **C:** Seitenansicht eines AP-2 alpha $\text{gamma}^{(\text{c})\text{KO}/\text{KO}}$ $\text{MORE}^{\text{WT}/\text{Cre}}$ Embryos (E12,5) mit Cranioschisis und Spina bifida (rote Pfeile)

Der unvollständige Neuralrohrschluss im Kopfbereich ist in den AP-2 alpha WT/KO gamma $\text{gamma}^{(\text{c})\text{KO}/\text{KO}}$ $\text{MORE}^{\text{WT}/\text{Cre}}$ Embryonen schwächer ausgeprägt als in AP-2 alpha KO-Tieren. Es kommt zu einem Schluss der Mittellinie im frontonasalen Bereich, ein Gesicht bildet sich. Im Bereich des Neurocraniums bleibt das Neuralrohr jedoch offen (Abbildung 40C, roter Pfeil). Dieser Defekt lässt sich auch in jüngeren Embryonen (E10,5) zeigen. In diesem Fall (Abbildung 41) wurde ein AP-2 alpha WT/KO gamma $\text{gamma}^{(\text{c})\text{KO}/\text{KO}}$ $\text{MORE}^{\text{WT}/\text{Cre}}$ Embryo (Abbildung 41D-F) mit einem AP-2 alpha KO-Embryo (Abbildung 41A-C) verglichen. Bei diesem Tier ist der craniale Schlussdefekt wesentlich ausgeprägter als bei dem älteren Tier in Abbildung 40C, jedoch fusioniert auch in diesem Fall die Mittellinie im frontonasalen Bereich (Abbildung 41D; roter Pfeil) im Gegensatz zu AP-2 alpha KO-Tieren. Der Schlussdefekt betrifft den gesamten Kopf bis zur Höhe der ersten Halswirbel. Im alpha WT/KO gamma $\text{gamma}^{(\text{c})\text{KO}/\text{KO}}$ $\text{MORE}^{\text{WT}/\text{Cre}}$ Embryo (Abbildung 41F, weißer Pfeil) zieht sich der Defekt weiter nach caudal als bei dem AP-2 alpha KO-Kontrolltier (Abbildung 41C).

Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Tieren, ist es noch nicht möglich abzuschätzen in wie weit es sich bei der Ausprägung der Cranioschisis oder Spina bifida bei den hier gezeigten alpha WT/KO gamma $\text{gamma}^{(\text{c})\text{KO}/\text{KO}}$ $\text{MORE}^{\text{WT}/\text{Cre}}$ Embryonen um individuelle Unterschiede von Tier zu Tier handelt oder ob sich diese Ergebnisse verallgemeinern lassen. Auch könnte die Effizienz der Loop-out-Reaktion in den einzelnen Regionen eine entscheidende Rolle für die Stärke der einzelnen Defekte spielen. Aus der AP-2 alpha Verpaarung weiß man, dass es innerhalb der heterozygot defizienten AP-2 alpha Embryonen (AP-2 alpha WT/KO), auch ohne die Erzeugung des KO-Allels durch eine Cre-Rekombinaseaktivität, zu starken Varianzen im Phänotyp kommt. So zeigt ein Teil (14%) dieser heterozygoten AP-2 alpha Tiere eine

Exenzephalie unterschiedlichen Ausmaßes (Kohlbecker, Lee et al. 2002). Der Phänotyp dieser Tiere unterscheidet sich jedoch deutlich in Lage und Form der Exenzephalie von dem der Cranioschisis der $\alpha^{WT/KO} \gamma^{(c)KO/KO} MORE^{wt/cre}$ Embryonen.

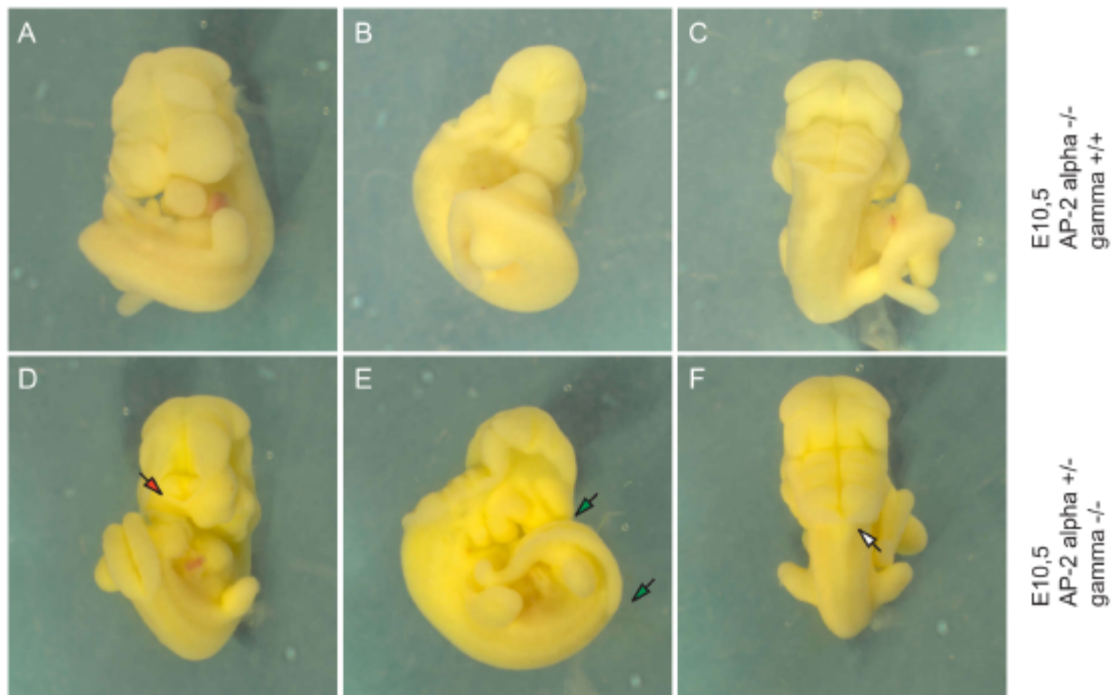


Abbildung 41 Embryonen aus der AP-2 alpha gamma Verpaarung (E10,5)

A-C: AP-2 alpha KO-Embryo (E10,5); **D-F:** AP-2 $\alpha^{WT/KO} \gamma^{(c)KO/KO} MORE^{WT/Cre}$ -Embryo (E10,5);

A/D: Ventrale Ansicht: Bei dem Embryo in **D** kam es teilweise im Frontonasalbereich zum Zusammenwachsen der Gesichtsstrukturen (roter Pfeil); **B/E:** Seitenansicht: Embryo in **E** hat eine ausgeprägte Spina bifida (grüne Pfeile); **C/F:** Dorsale Ansicht: Embryo in **F** (weißer Pfeil) zeigt eine ausgeprägtere, tiefere Exenzephalie als der Embryo in **C**;

Neben der AP-2 alpha gamma Verpaarung wurde auch eine AP-2 beta gamma Verpaarung zur Erzeugung AP-2 beta gamma defizienter Tiere untersucht. Die Verpaarung wurde nach dem gleichen Prinzip wie die AP-2 alpha gamma, angesetzt (Abbildung 39). In diesem Fall wurden nur 8 Embryonen isoliert, keines dieser Embryonen hatte einen AP-2 $\beta^{WT/KO} \gamma^{(c)KO/KO} MORE^{wt/cre}$ Genotyp. Nur der AP-2 gamma KO^{MORE}-Embryo aus dieser Verpaarung zeigte den schon bekannten Phänotyp der Spina bifida, alle anderen Embryonen waren unauffällig. Hier sind jedoch weitere Verpaarungen und eine größere Anzahl an untersuchten Embryonen nötig um Schlüsse zu ziehen.

Zielgene von AP-2 alpha

Aufbauend auf die Suche nach Zielgenen von AP-2 alpha (Zielgene von AP-2 alpha S.32) wurden die isolierten „full length“ Klone analysiert. Sie wurden Sequenziert und durch BLAST-Suche im Internet nach Übereinstimmungen mit den Sequenzen in der GenBank™ gesucht. Von den 52 cDNA-Sequenzen waren 25 Sequenzen bereits bekannt, 21 cDNA Sequenzen waren neu (

Abbildung 42). Einige Sequenzen wurden mehrmals isoliert .

Klon	cDNA-Fragment-größe	Name des Gens	Homologien	Bemerkungen	GenBank™ Nummer
<i>von AP-2 alpha induzierte Gene</i>					
fl01	799bp	Zytochrom Oxidase	C	3x isoliert	13841
fl02	716bp	unbekannt		isoliert aus cDNA aus in vitro fertilisierte Oozyten, Zinkfinger-Domäne	AK018364
fl03	1559bp	Glutathionperoxidase			NM008161
fl04	3kb	unbekannt	humanes CGL-18, Drosophila Dp 1		
fl05	3,6kb	unbekannt		Kinase und /oder Zinkfinger-Domäne	
fl06	1208bp	GrpE-like-1			NM_024478
fl07	2kb	unbekannt			BC005647
fl08	1312bp	unbekannt	Humaner cDNA Klon p586c1620	Zinkfinger(?)	
fl09	2,5kb	SNAP 23			AB000822
fl10	1,5kb	Prolactin-related Protein		3x ixoliert	AF011385
fl12	2508bp	unbekannt	Dihydrolipoamid-succinyltransferase, Ratte (d90401)		
fl13	1,5kb	26 S proteosomale ATPase			U61283
fl14	889bp	Maus Homolog zu MCT-1	Human MCT-1 (93%)		AI159705
fl15	1095bp	unbekannt		isoliert aus cDNA früher Blastocysten; Gly-His-reich, Zinkfinger; Transmembranprotein	C88842
fl16	826bp	unbekannt	Hypertensin verwandtes Protein, Ratte (u41803)		
fl17	2,1kb	Selenoprotein P			AF021345
fl18	1,9kb	Poly(A)-binding Protein II			U93050
fl19	630bp	60S ribosomales Protein L18			I04128
fl20	1730bp	unbekannt		Isoliert aus männlicher Nieren cDNA	AK002518
fl21	485bp	unbekannt		Isoliert aus cDNA (Maus); Phosphatase (?)	AI550416

Klon	cDNA-Fragment-größe	Name des Gens	Homologien	Bemerkungen	GenBank™ Nummer
von AP-2 alpha repremierte Gene					
f122A	3.0kb	unbekannt		isoliert aus Maus-cDNA; Phosphatase(?)	AI550416
f122B	2,9kb	KLF-4			U20344
f123	1404bp	Lipocortin 1			X07486
f124	2164bp	Syntaxin-7			AF056323
f152	2921bp	Sca-1 (stem cell antigen-1)			M74013.1
f153	1880bp	unbekannt		humanes EFEMP-1	XM_002258
f154	2337bp	unbekannt			
f155	1894bp	unbekannt	Ionentransportregulator CHIF Gen (AF362729), Maus		
f156	1873bp	Stra13			AF010305
f157	2067bp	Bc 10			AB037891
f158	1457bp	Mtd			AF027707
f160	2375bp	unbekannt	verschiedene ESTs, Maus		
f162	928bp	OSF-3		3x isoliert	D21252
f164	470bp	unbekannt	Ubiquitin/60S ribosomal Fusionsprotein		AF118402
f165	570bp	unbekannt	verschiedene ESTs, Maus		
f166	580bp	Surf-3			AH002086
f167	770bp	Saposin			S36200
f168	1076bp	Acidic ribosomal Phosphoprotein			X15267
f169	535bp	Ribosomale Untereinheit S5			Y12431
f170	2620bp	mCDC46			D26090
f171	2187bp	unbekannt	verschiedene ESTs (Maus)	Zelloberflächen-glycoprotein	
f172	718bp	TRBP 107			X81987
f173	3012	unbekannt	H. sapiens ring finger protein 11 (RNF11) (XM_001379)		
f174	3844	unbekannt	M. musculus serum und glucocorticoiddependent protein kinase (Sgk) (AF205855)	Kinase-Domäne	
f175	1466	unbekannt	H. sapiens, ähnlich zu Gluthadionperoxidas 3 (BC015399)		
f176	1565	unbekannt	verschiedene ESTs Maus		
f177	2085	unbekannt	Human cDNA clone KIAA0674		
f178	891	Prolactin-related protein			AF019865
f179	1660	unbekannt		isoliert aus trächtiger Maus cDNA, Transmembrandomäne	AK019865

Abbildung 42 Tabelle der isolierten „full length“ Klone

Ergebnisse nach Sequenzierung und BLAST-Analyse: Gene wurden mit „unbekannt“ bezeichnet, wenn die Sequenz nicht in der GenBank™ gefunden wurde, oder die Sequenz nur Übereinstimmungen mit Sequenzen unbekannter Funktion zeigt.

Von AP-2 alpha reprimierte Gene

Nach der Isolation und Sequenzierung der Zielgene, wurden ihre Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung analysiert. Als Zielgen von AP-2 alpha sollten sie in Geweben, die an der Bildung des AP-2 alpha Phänotyps beteiligt sind, exprimiert sein. Es wurden vier Gene für weitere Analysen ausgewählt. Diese Gene sind Gene, die von AP-2 alpha im Kopf eines E8,75 Embryo reprimiert werden. In Abbildung 43 sind die Expressionsmuster dieser 4 Zielgene (Mtd, Stra13, KLF4 und EFEMP-1) dargestellt.

Mtd (Matador/ ?span.: matar, töten) ist ein Mitglied der Bcl-2-Familie und es wurde beschrieben das es Apoptose aktiviert (Hsu und Hsueh 1998). In der *in Situ* Hybridisierung (Abbildung 43A) sieht man, dass es am Tag E10,5 im craniofacialen Mesenchym, im paraxialen Mesenchym und in der Gliedmaßenknospe exprimiert.

Das Expressionsmuster von Stra13 (stimulated by retinoic acid #13) und seine potentielle Funktion sind bereits beschrieben worden (Boudjelal, Taneja et al. 1997). Stra13 wird am Tag E9,5 im 5. Rhombomere expremiert. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass es Wachstumsstop und terminale Differenzierung induziert. Diese Expression ist in Abbildung 43B gezeigt, zusätzlich zu bereits beschriebenen Expression fand sich eine Expression von Stra13 in dem Mesenchym um die sich entwickelnde Aorta und in der Schwanzspitze.

Die Expressionsmuster von KLF4 und Efemp-1 zeigen beide eine sehr definierte Expression im Kopfbereich, unter anderen in den Kiemenbögen. Man weiß, dass AP-2 alpha ebenfalls in den Kiemenbögen exprimiert wird und das es in diesen Strukturen eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung spielt. Im AP-2 alpha KO-Embryo zeigen sich hier in der späteren Entwicklung starke Dysmorphien (Abbildung 40), der gesamte Gesichtsbereich ist deformiert. An der Bildung des Gesichts sind die Kiemenbögen hauptsächlich beteiligt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden diese zwei Gene (EFEMP-1, KLF4) weitergehend untersucht.

Differenzielle Expression von Mtd1, Stra13, KLF4 und EFEMP-1

Alle 4 analysierte Zielgene wurden als von AP-2 alpha reprimierte Gene isoliert. Das bedeutet, dass sie bei Fehlen von AP-2 alpha in einem KO-Embryo vorzeitig oder verstärkt exprimiert werden sollten. Um dies zu überprüfen wurde eine RT-PCR mit RNA aus ganzen Embryonen durchgeführt. In Abbildung 44 ist die RT-PCR der untersuchten Gene gezeigt, als Kontrolle diente GAPDH und beta-Tubulin.

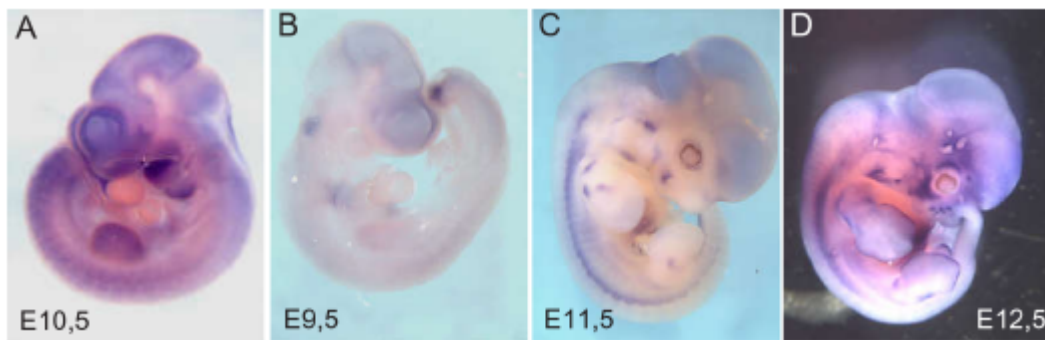


Abbildung 43 Expressionsmuster der 4 isolierten Zielgene

In situ Hybridisierungen von Mtd, Stra13, EFEMP-1 und KLF4:

A: Mtd Expression im E10,5 Embryo: craniofacialen Mesenchym, paraxialen Mesenchym, Gliedmaßenknospe; **B:** Stra13 Expression im E9,5 Embryo: 5.Rhombomere, Mesenchym der Aorta, Schwanzspitze; **C:** EFEMP-1 Expression im E11,5 Embryo: in den Knorpel und Knochenanlagen von Gesicht, Gliedmaßen und Wirbeln; **D:** KLF4 Expression im E12,5 Embryo: im Gesichtsbereich (vor allem Follikel der Haare), im Mesenchym der Wirbelvorläufer; in der Randleiste der Gliedmaßenknospe;

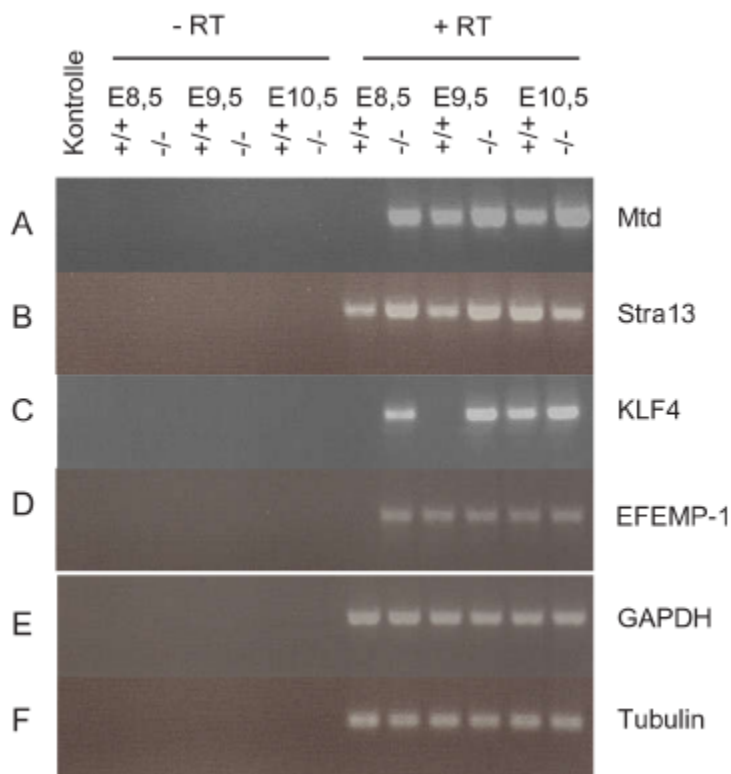


Abbildung 44 RT-PCR WT-KO^{MORE}-Vergleich

RT-PCR von WT und KO^{MORE}-Embryonen zwischen E8,5 bis E10,5: aufgetragen wurden von (links nach rechts) H₂O-Kontrolle, Gewebe (KO, WT) in aufsteigendem Embryonalalter, ohne RT-Reaktion, mit RT-Reaktion;

A: Mtd; **B:** Stra13; **C:** KLF4; **D:** EFEMP-1; **E:** GAPDH (Kontrolle); **F:** Tubulin (Kontrolle);

Mtd wird im AP-2 alpha KO-Embryo einen Tag früher exprimiert als im WT-Tier, man findet eine Expression bereits ab dem Tag E8,5 im KO-Embryo (Abbildung 44A). Im Fall von Stra13 findet man zwar keine verfrühte Expression, Stra13 wird aber im KO-Embryo am Tag E8,5 und E9,5 stärker als im WT-Embryo exprimiert (Abbildung 44B).

Bei KLF4 ist der Unterschied zwischen der verfrühten Expression im KO-Embryo und der Expression im WT-Embryo am Stärksten ausgeprägt. Während KLF4 im WT-Embryo erst am Tag E10,5 gefunden wird, findet man es im AP-2 alpha Embryo bereits am E8,5 zwei Tage zu früh (Abbildung 44C). In Abbildung 44D ist die verfrühte Expression von EFEMP-1 im KO-Embryo gezeigt. Ebenso wie Mtd wird EFEMP-1 einen Tag zu früh am Tag E8,5 exprimiert, im WT-Tier kann man beide Gene erst ab Tag E9,5 detektieren. Als Kontrolle wurden in diesem Versuch GAPDH und beta-Tubulin (Abbildung 44E und F) verwendet, zum Ausschluss von DNA-Verunreinigungen in der RNA wurde parallel eine PCR mit den RNA-Proben ohne reverses Transkribieren der RNA in cDNA durchgeführt.

Man kann also festhalten, dass die vier Gene von AP-2 alpha reguliert werden. Es konnte von allen vier Genen nachgewiesen werden, dass sie im AP-2 alpha KO-Embryo verfrüht oder verstärkt exprimiert werden. Um die Frage zu klären ob es sich bei diesen Genen um primäre (direkte) oder sekundäre Zielgene von AP-2 alpha handelt, wurden Computeranalysen durchgeführt. Es ergab sich dass sich in den Promotoren der vier Gene eine Reihe von AP-2 DNA-Binde-Motiven befinden. Alle vier Gene sind also potentielle direkte Zielgene von AP-2 alpha, weitere Versuche sind jedoch notwendig um die DNA-Bindung von AP-2 alpha und die Transaktivierung dieser vier Gene zu bestätigen.

Zunächst wurde jedoch das Expressionsmuster von EFEMP-1 und KLF4 während der Embryonalentwicklung genauer analysiert.

EFEMP-1

Als ein weiteres Zielgene von AP-2 alpha wurde ein 1880bp cDNA-Fragment von EFEMP-1 als ein von AP-2 alpha reprimiertes Gen isoliert (Genebank # AY 185605 (Pfisterer et al. 2002)). EFEMP steht für "EGF (epidermal growth factor) containing Fibulin like Extrazellulär Matrix Protein. Alternative Bezeichnungen sind S1-5 (Lecka-Czernik, Lumpkin et al. 1995) und Fibulin-3 (Giltay, Timpl et al. 1999). Die Familie der EFEM-Proteine besteht aus zwei Familienmitgliedern, EFEMP-1 und EFEMP-2. Hauptmerkmal dieser Familie sind Ca^{2+} -bindende Domänen, die Ähnlichkeiten mit Domänen des Wachstumsfaktor EGF (epidermal growth factor) haben. Außerdem haben beide EFEM-Proteine Ähnlichkeiten mit Fibulinen, die an der Basalmembran zu finden sind.

EFEMP-1 findet man außer im Menschen und in der Maus auch noch in der Ratte. Die Homologie auf cDNA-Ebene zwischen Maus und Mensch beträgt 87%, die zwischen Maus und Ratte sogar 92%. Im Northern Blot konnte gezeigt werden, dass im Menschen EFEMP-1 in vielen Geweben exprimiert wird. Man konnte zwei unterschiedliche RNA-Transkripte in Herz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Thymus, Hoden, Prostata, Ovar, Plazenta und Darm nachweisen. Man vermutet, dass es sich bei den zwei Transkripten um zwei unterschiedliche Spleiß-Varianten handelt (Ikegawa, Toda et al. 1996).

In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Expression von EFEMP-1 mit Zellalterung einher geht (Lecka-Czernik, Lumpkin et al. 1995). So findet man eine Überexpression von EFEMP-1 in Fibroblasten aus der Haut von Werner-Syndrom-Patienten. Das Werner-Syndrom, oder auch Progeria adultorum, ist eine Erbkrankheit, bei der früh Alterungsprozesse einsetzen und junge Patienten vorzeitig vergreisen. Es kommt ab dem 20. Lebensjahr zu Symptomen wie Sklerosierung der Haut, Trübung der Augenlinse, Ergrauen der Haare und Haarausfall. Bei einer Augenkrankheit konnten Mutationen im humanen EFEMP-1 Gen festgestellt werden. Bei der Doyn'sche Honigwabens-Dystrophie, oder auch Mallatia Leventinese, kommt es zur Bildung von gelblichen Flecken am Augenhintergrund (Stone, Lotery et al. 1999; Sauer, White et al. 2001). Die Bildung solcher „Drusen“ findet man auch bei der altersabhängigen Maculadegeneration. Auch in diesem Fall scheint einen Zusammenhang mit EFEMP-1 zu bestehen (Marmorstein, Munier et al. 2002).

Wie die bisherigen medizinischen Forschungsergebnisse zeigen spielt EFEMP-1 eine wichtige Rolle bei der Alterung und der Differenzierung von Zellen zu. Um einen genaueren Aufschluss über die Expression von EFEMP-1 während der Embryonalentwicklung und die Expression eventueller Spleißvarianten zu bekommen, wie sie beim Menschen beschrieben wurden (Ikegawa, Toda et al. 1996), wurde ein Northern Blot mit einer EFEMP-1 spezifischen Probe hybridisiert. Auf diesem Northern Blot (von Seegene, Heidelberg) ist die RNA der embryonalen Entwicklungsstadien Tag E4,5 bis Tag E18,5 aufgetragen worden. Bis Tag E6,5 enthält der Northern Blot außer RNA aus embryonalem Gewebe noch RNA aus maternalem Uterusgewebe und extraembryonalem Gewebe. Bis zum Tag E9,5 ist embryonales und extraembryonales Gewebe enthalten. Erst ab dem Tag E10,5 handelt es sich um RNA, die ausschließlich aus embryonalen Gewebe stammt.

Auf dem Northern Blot sind zwei verschieden große Transkripte zu erkennen, ein Transkript von ca. 2,0kb und ein weiteres von 4,4kb Größe (Abbildung 45). Während das größere Transkript nur von Tag E4,5 bis E6,5 detektiert werden kann, findet man das kleinere Transkript auch in älteren Embryonen. Es wird bis zum Tag E9,5 gefunden, und dann erst wieder am Tag

E11,5 detektiert. Das 2,2kb große Transkript findet man ab Tag E11,5 während der gesamten restlichen Embryonalentwicklung.

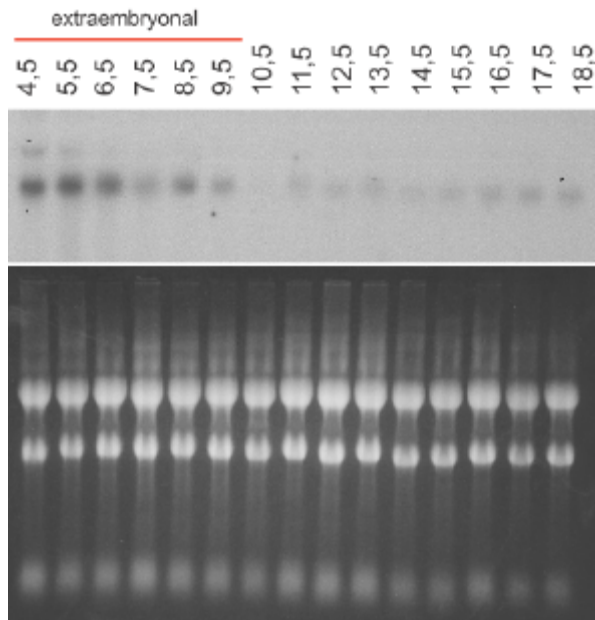


Abbildung 45 Northern Blot von EFEMP-1 während der Embryonalentwicklung

A: Autoradiogramm des Northern Blot der Embryonalentwicklungsstadien E4,5 bis E18,5 hybridisiert mit EFEMP-1 cDNA-Sonde; Transkripte bei 2,0kb und 4,4kb; **B:** Foto des Ethidiumbromid gefärbten Gels im UV-Licht zur Bestimmung der aufgetragenen DNA-Menge und Qualität;

Die frühe Expression von EFEMP-1 vor dem Tag E10,5 ist wahrscheinlich extraembryonalen und maternalen Ursprungs. In der RT-PCR (Abbildung 44) konnte EFEMP-1 im Wildtyp-Tier erst ab dem Tag E9,5 nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, dass die Expression im Northern Blot bis Tag E9,5 auf die Expression in der Plazenta zurückzuführen ist, denn EFEMP-1 wird unter anderem in der Plazenta exprimiert (Ikegawa, Toda et al. 1996). Bei der für die RT-PCR verwendete RNA handelte es sich im Gegensatz zur RNA auf dem Northern Blot ausschließlich um embryonale RNA. Außerdem muss beachtet werden dass die RT-PCR wesentlich sensitiver ist als der Northern Blot. Das bedeutet, dass mit Hilfe der RT-PCR auch eine schwächere Transkription nachgewiesen werden kann, z.B. eine embryonale Expression von EFEMP-1 bereits am Tag E9,5 und E10,5, während EFEMP-1 im Northern Blot erst ab Tag E11,5 detektiert werden kann.

Um das Expressionsmuster von EFEMP-1 während der Embryonalentwicklung zu analysieren wurden *in situ* Hybridisierungen mit Digoxigen-markierter RNA durchgeführt. Zunächst wurde das Expressionsmuster im Gesamtpräparat von dem Tag E9,5 bis E12,5 untersucht. Die

Expression von EFEMP-1 beginnt am Tag E9,5 in Diaphragma (Abbildung 46A). Einen Tag später ist die Expression dort verschwunden und man findet Expression in den Kiemenbögen, im proximalen Teil des 1. Kiemenbogen, im caudalen Teil des 2. Kiemenbogen und in dem sich entwickelnden 3. und 4. Kiemenbogen (Abbildung 46B). Eine schwache Expression ist auch seitlich des Neuralrohrs in den sich entwickelnden Wirbeln zu detektieren. Ab Tag E11,5 manifestiert sich die Expression von EFEMP-1 in den knorpeligen und knöchernen Strukturen, zum einen im Gesichtsbereich, zum andern in der Gliedmaßenknospe und der Wirbelsäule.

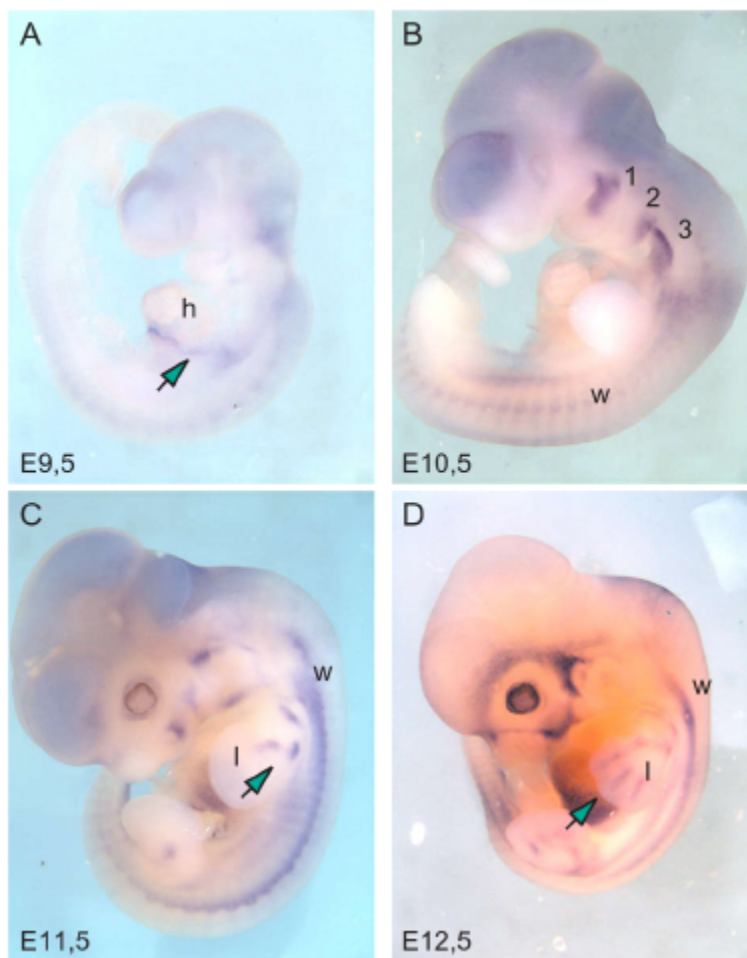


Abbildung 46 EFEMP-1: *In Situ* Hybridisierung

In Situ Hybridisierung mit Digoxigen-markierter Antisense-RNA **A:** E9,5 Embryo: erste Expression im Diaphragma (grüner Pfeil); **B:** E10,5 Embryo: Expression in den Kiemenbögen und beginnende Expression in der Wirbelsäule; **C:** E11,5 Embryo: Expression in den Gliedmaßen (grüner Pfeil: Radius, Ulna und Humerus), Gesichtsknochen und der Wirbelsäule; **D:** E12,5 Embryo: Expression in Gliedmaßen (grüner Pfeil: Expression in der Hand), Wirbelkörpern und im Gesicht; h: Herz; 1: 1.Kiemenbogen; 2: 2.Kiemenbogen; 3: 3. und 4.Kiemenbogen; w: Wirbel; l: Gliedmaßenknospe;

In der Gliedmaßenknospe lassen sich EFEMP-1 in den sich entwickelnden Oberarm zu erkennen. Ulna, Radius und Humerus sind angefärbt (Abbildung 46, grüner Pfeil). Diese Expression im Knorpel und Knochen setzt sich auch am Tag E12,5 fort, deutlich ist EFEMP-1 im Gesichtsschädel um des Auge, in den Handknochen (Abbildung 46D, grüner Pfeil) und in der Wirbelsäule zu erkennen. Für das spätere Expressionsmuster wurden *in situ* Hybridisierungen auf histologischen Schnitten durchgeführt.

Auf diesen Schnitten lässt sich deutlich erkennen, dass die Expression von EFEMP-1 auch in der späteren Embryonalentwicklung erhalten bleibt. In Abbildung 47 sind Schnitte durch Kopf, Oberkörper und Hand eines E15,5 Embryos gezeigt. EFEMP-1 ist in den knorpeligen oder knöchernen Gesichtsstrukturen exprimiert, man findet es z.B. in der Chochlea des Innenohrs (Abbildung 47A), der Nasenhöhle und der Schädelbasis (Abbildung 47B). In den Knochen der Hand wird EFEMP-1 ebenfalls exprimiert (Abbildung 47C). Man findet keine Expression von EFEMP-1 in den Knochen des Schädeldachs. Bei diesen Knochen handelt es sich um desmale Knochen, also um Knochen, die direkt aus dem Mesenchym hervorgehen. EFEMP-1 ist zum einen in Knorpeln exprimiert, zum anderen in Knochen, die sich aus knorpeligen Strukturen entwickeln. Diese enchondralen Knochen werden auch als „Ersatzknochen“ bezeichnet, da hier primär embryonaler Knorpel durch Knochen ersetzt wird.

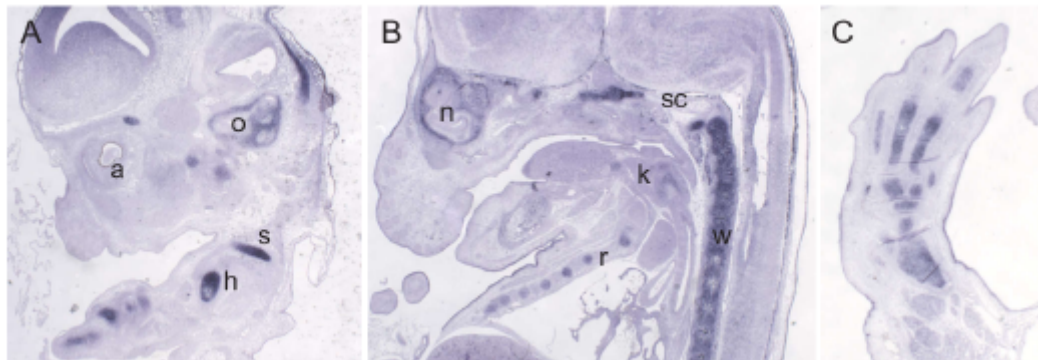


Abbildung 47 EFEMP-1: *In Situ* Hybridisierung am Tag E15,5

In Situ Hybridisierungen auf histologischen Schnitten mit Digoxigen-markierter Antisense-RNA
A: Sagitalschnitt durch den Kopf eines E15,5 Embryo: Angeschnitten wurden Auge, Ohr, Schulter; knöcherne Strukturen wurden angefärbt. **B:** Sagitalschnitt durch E15,5 Embryo: Angeschnitten wurden Mund-Rachenraum mit Nasenhöhle; Wirbelsäule und Brustkorb; **C:** Schnitt durch die Hand eines E15,5 Embryos: Angefärbt sind die Finger- und Handwurzelknochen;
h: Humerus; s: Scapula; o: Chochlea; n: Nasenhöhle; sc: Schädelbasis; k: Kehlkopf; r: Rippen; w: Wirbelsäule;

KLF4

Bei der Suche nach Zielgenen von AP-2 alpha wurde KLF4 als ein von AP-2 alpha reprimiertes Gen isoliert. Die isolierte cDNA hatte eine Größe von 2,9kb. KLF4 (oder GKLF4) steht für Krüppel-like-factor4 und gehört zur Familie der Krüppel-like-Faktoren. Diese Proteine wurden nach dem Homolog in *D.melanogaster* benannt. Erste Studien zeigten das KLF4 im Gastrointestinaltrakt exprimiert wird und daher stammt auch der alternativ benutzte Name GKLF (gut-enriched-Krüppel-like-factor4) (Katz, Perreault et al. 2002), im Kolon ist KLF4 mitverantwortlich für die terminale Differenzierung der Becherzellen, die Schleim produzieren. Außerdem findet man KLF4 ab dem Tag E16,5 der Embryonalentwicklung und auch post partum in der Haut. KLF4 ist hier in die postmitotische Differenzierung der Epithelzellen involviert (Brembeck und Rustgi 2000). Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass die Überexpression von KLF4 zu einem Wachstumsstopp führt (Garrett-Sinha, Eberspaecher et al. 1996; Shields, Christy et al. 1996; Zhang, Geiman et al. 2000). KLF4 defiziente Tiere sterben wenige Tage nach der Geburt an Dehydratation, die Haut ist nicht in der Lage ihre natürliche Schutzfunktion zu erfüllen, die Tiere trocknen über die Haut aus (Segre, Bauer et al. 1999). In weiteren Experimenten wurde gezeigt das KLF4 post partum im Hoden exprimiert wird. Es wird am Stärksten von den postmeiotischen Spermatiden exprimiert, kurz bevor diese in das Hodenkanälchenlumen abgegeben werden (Behr und Kaestner 2002).

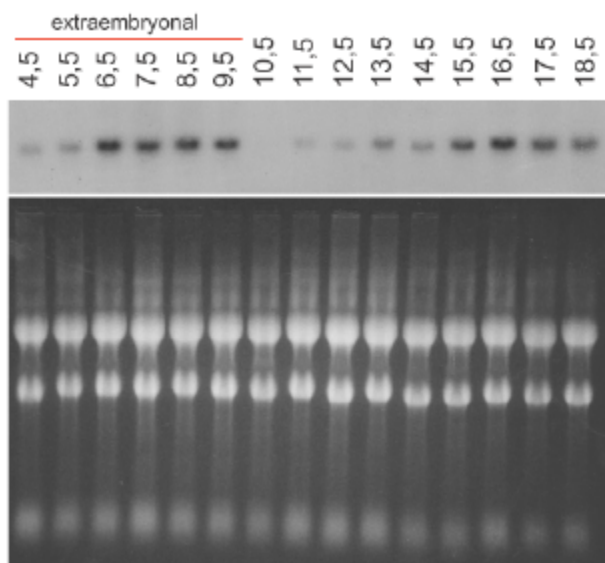


Abbildung 48 Northern Blot von KLF4 während der Embryonalentwicklung

A: Autoradiogramm des Northern Blot der Embryonalentwicklungsstadien E4,5 bis E18,5 hybridisiert mit KLF4 cDNA-Sonde; **B:** Foto des Ethidiumbromid gefärbten Gels zur Bestimmung der aufgetragenen DNA-Menge und Qualität;

Obwohl das Expressionsmuster von KLF4 in adulten Tieren und teilweise auch in der späten Embryonalentwicklung beschrieben worden sind, gab es keine Daten zu der Expression in der frühen und mittleren Embryonalentwicklung. Um einen Überblick über die Expression von KLF4 während der Embryonalentwicklung zu erhalten, wurde im Northern Blot von Tag E4,5 bis E18,5 mit einer KLF4-spezifischen Probe hybridisiert (Abbildung 48). Es wurde der selbe Blot verwendet wie für den Northern Blot von EFEMP-1 in Abbildung 45. Man findet das Transkript von Tag E4,5 bis E9,5 und dann wieder ab dem Tag E11,5 bis E18,5. Die frühe Expression von KLF4 vor dem Tag E11,5 ist wahrscheinlich extraembryonalen Ursprungs, ebenso wie die Expression von EFEMP-1 in Abbildung 45. Für diesen Northern Blot wurde bis zum Tag E6,5 maternales und bis zum Tag E9,5 extraembryonales Gewebe verwendet. Die Expression von KLF4 endet auch schlagartig mit dem Tag E9,5 und beginnt erst wieder am Tag E11,5. In der RT-PCR aus rein embryonalen Gewebe findet man keine Expression vor dem Tag E10,5 (Abbildung 44). Die RT-PCR ist sensitiver als der Northern Blot, im Northern Blot wird das KLF4 Signal erst ab dem Tag E11,5 detektiert.

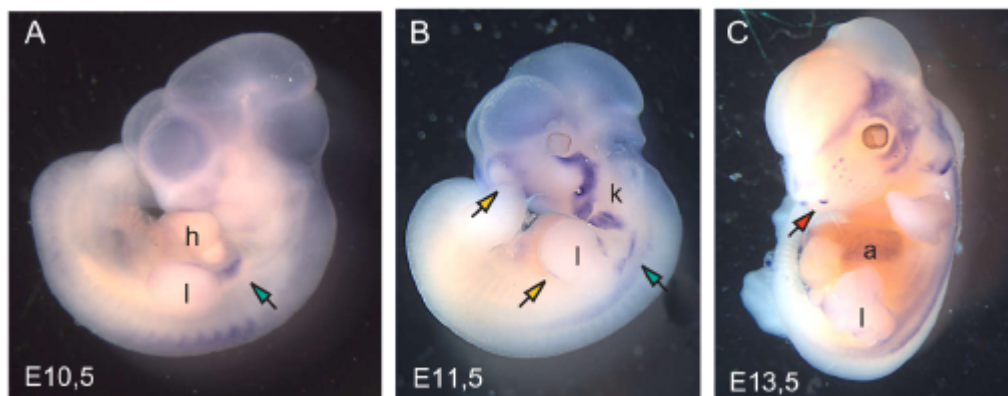


Abbildung 49 KLF4 *in Situ* Hybridisierung

Expressionsmuster von KLF4 **A:** E10,5 Embryo: Mesenchym um die Arterie des 4. Kiemenbogens (grüner Pfeil) **B:** E11,5 Embryo: Expression in einem Streifen über alle Kiemenbögen, um die Nasengrube (gelber Pfeil), Randleiste der Gliedmaßenknospe (gelber Pfeil); **C:** E13,5 Embryo: seitlicher Kopfbereich, Haarfollikeln, Nasenöffnung (roter Pfeil), Abdomen, Rücken; h: Herz; l: Gliedmaßenknospe; k: Kiemenbögen; a: Abdomen;

Das Expressionsmuster von KLF4 wurde im Embryo ab dem Tag E9,5 analysiert. Am Tag E9,5 findet man keine Expression im Embryo, erst am Tag E10,5 kann man KLF4 schwach im Mesenchym um die Arterie des 4. Kiemenbogens detektieren (Abbildung 49). Diese Expression bleibt bis zum Tag E11,5 bestehen. Zu diesem Zeitpunkt findet man im Bereich der Kiemenbögen eine sehr starke Expression, die sich beginnend unter dem Auge über alle Kiemenbögen zieht. Zusätzlich findet man KLF4 in einem Ring um die Nasengrube, diese

Expression fokussiert sich später (E13,5) in den Nasenöffnungen. In der Gliedmaßenknospe ist KLF4 in der Randleiste exprimiert.

Am Tag E13,5 hat sich die Expression im seitlichen Kopfbereich defokussiert und ist abgeschwächt. Sie verteilt sich auch im restlichen Körper (Abdomen, Rücken). Eine punktförmige, scharf abgegrenzte Expression findet sich nur noch in der Nasenöffnung und den Follikeln der Haare in der Schnauze. Diese Expression findet man auch später am Tag E15,5 in der Nasenöffnung und in den Haarfollikeln (Abbildung 50A). Außerdem findet man KLF4 in der Haut exprimiert und in distalen Teil des Nasenepithels (Abbildung 50B). Die Expression erstreckt sich in der Haut über den gesamten Körper, so kann man KLF4 z.B. auch in der Haut der Pfote nachweisen (Abbildung 50C). Diese Expression in der Haut nach dem Tag E15,5 ist auch in der Literatur beschrieben worden (Segre, Bauer et al. 1999).

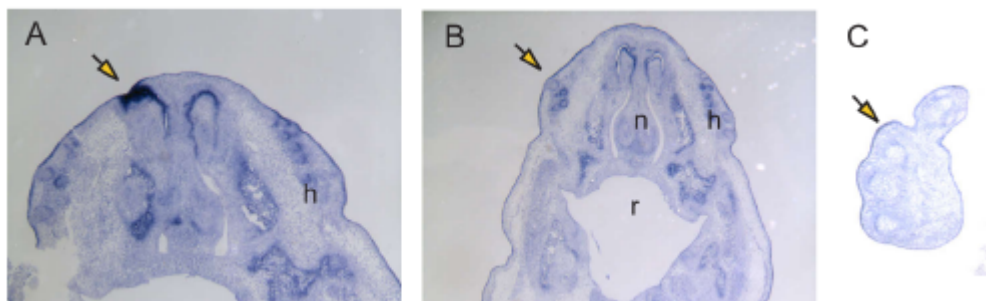


Abbildung 50 KLF4 *in Situ* Hybridisierung auf Schnitten am Tag E15,5

In Situ Hybridisierungen auf histologischen Schnitten mit Digoxigen-markierter Antisense-RNA
A: Querschnitt durch den Kopf eines E15,5 Embryo: Angeschnitten wurden Nasenöffnungen (gelber Pfeil) und Rachenraum; **B:** Querschnitt durch E15,5 Embryo: Angeschnitten wurden Mund-Rachenraum mit Nasenhöhle (gelber Pfeil, Haarfollikel); **C:** Schnitt durch die Hand eines E15,5 Embryos (gelber Pfeil, Haut);
h: Haarfollikel; r: Rachenraum; n: Nasenscheidewand;

Diskussion

Der gewebspezifische KO

AP-2 gamma Knockout-Mäuse (KO^{MORE}), die mit Hilfe der im ganzen Embryo exprimierten Cre-Rekombinase (MORE) erzeugt wurden, zeigen eine Reihe unterschiedlicher Defekte. In allen Tieren sind die Keimzellen betroffen, die Tiere sind steril. Männchen haben einen Hodenhochstand. Ein Teil der männlichen Tiere hat außerdem noch eine Spina bifida. Das Neuralrohr hat sich nicht geschlossen, es entsteht sekundär ein Wirbel- und Hautdefekt. Im Gegensatz dazu zeigen AP-2 gamma Knockout-Mäuse (KO^{Wnt1}), die mit Hilfe Neuralleistenzellen spezifischen Wnt1-Cre-Rekombinase erzeugt wurden, keine Defekte.

Phänotyp in Hoden und Ovar

Keimzellen

In den Männchen manifestiert sich im Laufe der Zeit ein Hodendefekt, das Keimepithel geht in einem Teil der Hodenkanälchen verloren. Bei den Weibchen tritt der Defekt der Keimzellen früher auf, man findet im adulten Tier keine Keimzellen mehr. Die Tiere sind infertil.

Um die Frage zu klären zu welchem Zeitpunkt es zum Verlust der Keimzellen kommt, wurde zunächst die Embryonalentwicklung in KO- und WT-Tieren untersucht. Die Keimzellen wandern erst relativ spät während der Embryonalentwicklung in die Gonaden ein. Andere Organe haben sich zu diesem Zeitpunkt schon nahezu vollständig entwickelt. Primordiale Keimzellen entstehen im proximalen Epiblasten, nahe dem extraembryonalen Ektoderm (Anderson, Fassler et al. 1999). Diese Zellen wandern durch den Primitivstreifen und eine Reihe anderer Gewebe wie z.B. das Allantois. Ab dem Tag E7,5 der Mausentwicklung können diese Zellen mit Hilfe ihrer endogenen alkalischen Phosphatase identifiziert werden (MacGregor, Zambrowicz et al. 1995). Primordiale Keimzellen wandern vom Primitivstreifen in das posteriore Entoderm und ab dem Tag E9,5 wandern sie von dort aus seitlich und dorsal am Darmepithel entlang. Sie besiedeln die Genitalleiste zwischen dem Tag E10,5 und E11,5. Während ihrer Wanderung proliferieren die Keimzellen bereits, so dass eine größere Zellpopulation die Gonadenanlage erreicht. Zellen, die nicht in den Gonaden ankommen sterben rasch ab und sind kurze Zeit später nicht mehr zu detektieren.

Man kennt aus der Literatur bereits Mausmodelle, in denen der Schritt der Wanderung der primordiale Keimzellen defekt ist und die Zellen nicht oder in verringerter Anzahl in die Genitalleiste einwandern. So wandern z.B. in den beta-Integrin defizienten Tieren die primordiale Keimzellen nicht in die Gonaden ein (Anderson, Fassler et al. 1999). Um zu

untersuchen, ob in den KO^{MORE} -Tieren die Wanderung der primordiale Keimzellen defekt ist, wurden die in den Gonaden eingetroffenen Zellen mit Hilfe der endogenen alkalischen Phosphatase angefärbt. Es wurde ein etwas späterer Zeitpunkt (E13,5) gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die Zellen nicht nur alle eingewandert sind, sondern sich auch bereits vermehrt haben sollten um den gesamten Hoden zu besiedeln. Es gibt in den untersuchten KO^{MORE} -Embryonen keinen Unterschied zwischen der Anzahl oder der Lage der Keimzellen im Vergleich WT- zu KO^{MORE} -Hoden. In allen Fällen sind eine ausreichende Anzahl an primordiale Keimzellen in den Hoden eingewandert und haben diesen besiedelt. Auch in der späten Embryonalentwicklung, wenn der Hoden sich weiter ausdifferenziert treten keine sichtbaren Defekte auf.

Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, den AP-2 gamma wird erst kurz vor oder nach dem Ende der Migration der primordiale Keimzellen exprimiert. So fand Chauzad (Chazaud, Oulad-Abdelghani et al. 1996) Expression von AP-2 gamma im Hoden ab dem Tag E11,0, wenn die primordiale Keimzellen in den Hoden einwandert sind. Er konnte außerdem zeigen, dass einige primordiale Keimzellen bereits während dem letzten Abschnitt der Wanderung im Bereich des dorsalen Mesenteriums AP-2 gamma exprimieren.

Defekt in der Spermatogenese

Ein nächster wichtiger Eckpunkt in der Hodenentwicklung bzw. Spermatogenese ist der Zeitpunkt an dem sich die Keimzellen zu Spermatogonien differenzieren. In der Maus findet dies vier Tage nach der Geburt statt, beim Menschen noch im Fötus vor der Geburt. Auch hier ließ sich kein Unterschied zwischen WT- und KO^{MORE} -Tieren feststellen. Der Differenzierungsschritt zu Spermatogonien scheint im AP-2 gamma KO^{MORE} -Tier nicht gestört zu sein.

Der Phänotyp tritt in den KO^{MORE} -Mäusen erst auf, wenn die Spermatogenese beginnt. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass im adulten Hoden einzelne Hodenkanälchen ihr Keimepithel verloren habe, während es in anderen Kanälchen noch intakt erhalten ist. Nur in einer kleinen Anzahl von Hodenkanälchen findet der Verlust des Keimepithels gerade statt. In diesen Kanälchen findet man zum einen apoptotische Zellen, zum anderen löst sich die strenge Organisation der Zellschichten, von der Basalmembran zum Lumen hin, auf.

Apoptose im Hoden

Das Auftreten von Apoptose im Hoden ist ein normaler Prozess während der Spermatogenese und tritt spontan während der verschiedenen Phasen der Keimzellentwicklung und Reifung auf.

Würde man von der Anzahl der Teilungen der Spermatogonien an der Basalmembran ausgehen, müssten wesentlich mehr Spermien im Lumen des Hodenkanälchen enthalten sein (Clermont 1962). Die Apoptoserate von Keimzellen erscheint außerdem wesentlich geringer, als sie in Wirklichkeit ist, da diese apoptotischen Zellen im Hoden sehr schnell und sehr effektiv von den Sertoli-Zellen phagozytiert werden (Lue, Hikim et al. 1999). Apoptose tritt in allen Phasen der Spermatogenese auf. Apoptosen treten bei der Maus am Häufigsten in den Spermatozyten auf, nur selten in Spermatogonien und äußerst selten in den Spermatiden. Beim Menschen hingegen kommt es gleichermaßen in allen Phasen der Spermatogenese zu Apoptose.

In den KO^{MORE}-Hoden handelt es sich nicht um ein normales Maß an Apoptose wie es in WT-Hoden beobachtet wird, im KO^{MORE}-Hoden findet man verstärkt apoptotische Zellen. Mit der TUNEL-Methode detektiert man in der WT-Kontrolle keine apoptotischen Zellen, während man im KO^{MORE}-Hoden Hodenkanälchen mit einer Reihe von apoptotischen Zellen findet. Die Apoptose beschränkt sich allerdings immer nur auf einzelne Hodenkanälchen, die meisten Hodenkanälchen haben entweder schon ihr Keimepithel verloren oder sie sehen noch völlig normal aus. In den Hodenkanälchen mit Apoptose kommt es zur Auflösung der geordneten Struktur. Die Anzahl an Zellschichten bis in das Lumen nimmt ab. Die Lage der apoptotischen Zellen spricht dafür, dass es sich um Spermatogonien unterschiedlicher Differenzierungsstadien handelt, denn die Zellen liegen an oder in der Nähe der Basalmembran.

Sterben Spermatogonien ab, kann man ausschließen, dass es sich um einen Defekt der Sertoli-Zellen handelt. Sertoli-Zellen sind unter anderem für die Nährstoffversorgung der Spermatozyten, Spermatiden und Spermien verantwortlich. Sie sind jedoch nicht für die Nährstoffversorgung der Spermatogonien zuständig, dies liegen dicht an der Basalmembran und sind daher nicht auf die Sertoli-Zellen angewiesen (Skakkebaek, Berthelsen et al. 1987).

Aufgabe der Spermatogonien ist es kontinuierlich neue Zellen für die Spermatogenese nachzubilden und eine konstante Menge an Spermatogonien als Stammzellen zu erhalten. Spermatogonien vom Typ A proliferieren stark um zum einen wieder Spermatogonien vom Typ A zu bilden, zum anderen um Zellen für die Spermatogenese zu produzieren, die sich weiter in Richtung des Lumens von Spermatogonien Typ B und später zu Spermatozyten differenzieren. In diesen frühen Spermatozyten beginnt die Meiose.

In der Literatur kennt man eine Reihe von KO-Mausmodellen, in denen es zu einem Keimzelldefekt kommt. Bei den meisten dieser KO-Tiere findet der Verlust des Keimepithels in der frühen Embryogenese beim Einwandern der primordiale Keimzellen statt (Anderson, Fassler et al. 1999) oder in den späten Meiose-Phasen statt. Einen zum AP-2 gamma KO^{MORE}-

Tier relativ ähnlichen Phänotyp zeigen Atm-Knockout-Tiere (Ataxia telangiectasia mutated Homolog). Diesen Tieren fehlen alle Keimzellen außer den Spermatogonien, es sind nur die Keimzellen übrig, die noch nicht in die Meiosephase eingetreten sind. In den Weibchen findet man keine Follikel oder Oozyten (Xu, Ashley et al. 1996). Weit größere Defekte entstehen allerdings abseits des Keimzelldefekts, z.B. eine erhöhte Sensitivität für ionisierende Strahlung und erhöhte Krebsrate. Auch die AT-Patienten (Ataxia telangiectasia) leiden neben den schwerwiegenden Defekten an Infertilität.

Bei den AP-2 gamma KO^{MORE}-Tieren gehen jedoch auch die Spermatogonien verloren, während in den Atm-KO-Tieren die Spermatogonien erhalten bleiben. Bei den Atm-KO-Tieren handelt es sich um einen Defekt während der Meiose bei DNA-Reperaturprozessen. Die DNA-Reperatur spielt eine wichtige Rolle vor oder beim Eintritt in die Meiose, da der Chromosomensatz im Verlauf der Meiose halbiert wird und Fehler in der DNA dann unweigerlich an die Nachkommen weitergegeben werden. In den AP-2 gamma KO^{MORE}-Tieren handelt es sich im Kontrast zu den Atm-KO-Tieren um einen Defekt während der Differenzierungs- und Proliferationsprozessen in den Spermatogonien, die vor der Meiose stattfindet, und nicht um einen Defekt während der Meiose.

Fortschreitende Degeneration des Keimepithels

Der Defekt im Hoden verstärkt sich mit zunehmenden Alter der Tiere. In den Hoden adulter, junger KO^{MORE}-Tiere findet man bereits zerstörte Hodenkanälchen ohne Keimepithel. Mit fortschreitenden Alter findet man jedoch in den leeren Hodenkanälchen ohne Keimepithel Zellagglomerate, die teilweise noch Kontakt mit dem Rand des Hodenkanälchen haben, sich aber auch schon vom Hodenkanälchen abgelöst haben und im Lumen zum Liegen kommen. Es handelt sich von der histologischen Analyse her um Sertoli-Zellen, die ihren Kontakt zur Basalmembran verloren haben. Diese fortschreitende Zerstörung der Hodenkanälchen ist wahrscheinlich ein sekundärer Defekt, der aus dem Verlust des Keimepithels entsteht.

Außer der fortschreitenden Zerstörung der leeren Hodenkanälchen, scheint es in älteren Tieren auch zu einer zunehmenden Ausbreitung des Hodenkanälchendefekts zu kommen. In älteren Tieren sind häufig mehr Hodenkanälchen betroffen als in jüngeren Tieren. Man findet jedoch in allen untersuchten Tieren eine sehr große Bandbreite in der Ausprägung des Hodendefekts. Dies kann an individuellen Unterschieden von Tier zu Tier liegen, denn es handelt sich bei den hier analysierten Tieren um keine reine Inzuchtlinie. Es kann an der Region liegen, die im histologischen Schnitt untersucht wurde und nur einen Ausschnitt des Hodens darstellt. Die degenerierten Hodenkanälchen können in manchen Regionen vermehrt auftreten und in anderen völlig fehlen. Je nach Lage des angefertigten Schnitts kann so unter Umständen ein

verzerrtes Bild des Hodengewebes dargestellt werden. Eine derartige Häufung von gesunden oder defekten Hodenkanälchen tritt auch bei anderen Hodendefekten, die zu Inferilität führen, auf (Cooke und Saunders 2002). Außerdem kann die Bandbreite des Phänotyps mit der Effizienz der Loop-out-Reaktion zusammenhängen, so dass unter Umständen nur in Teilen des Hodens eine Loop-out-Reaktion stattgefunden hat und nur hier Hodenkanälchen betroffen sind. Um den direkten Nachweis zu erbringen, dass gesunden Hodenkanälchen im KO^{MORE}-Tieren mit einer schlechteren Loop-out-Effizienz einhergehen, müssen noch weiteren Versuchen durchgeführt werden. So ist man mit Hilfe der Laserdissektion in der Lage gesundes und absterbendes Keimepithel aus dem histologischen Schnitt auszuschneiden und nachträglich zu genotypisieren.

Hodenhochstand und Verlust der Keimzellen

Ein Fortschreiten des AP-2 gamma KO^{MORE}-Phänotyps im Hoden könnte auch durch den Hodenhochstand begünstigt werden, der wie auch der Hodendefekt, bei allen Tieren auftrat. In der Literatur wird beschrieben, dass die Temperatur im nicht abgesunkenem Hoden (Cryptorchidismus) höher ist als in einem in das Skrotum abgesunkenen Hoden. Es ist bekannt, dass Hodenhochstand ebenfalls zum Verlust von Keimgewebe führen kann (Heyns und Hutson 1995). Hodenhochstand und seine Folgen auf die Keimzellenpopulation ist in hohem Maß von der Tierspezies abhängig. Während beim Menschen ausgeprägte Defekte auftreten (Husmann und Levy 1995), sind in Experimenten mit Ratten wesentlich schwächer ausgeprägte Defizite aufgetreten. Hodenhochstand führt im Menschen unbehandelt häufig zur Infertilität, während es bei Ratten zwar zu einer verminderten Spermienzahl kommt (Hutson, Hasthorpe et al. 1997). Diese wirkt sich aber nicht auf die Fertilität aus. Untersuchungen an Mäusen liegen nicht vor, man kann aber annehmen, dass es sich bei Mäusen ähnlich wie bei Ratten verhält. Das Keimepithel von Nagetieren scheint im Gegensatz zum Menschen relativ unempfindlich gegenüber höheren Temperaturen zu sein.

Beim Menschen kann Hodenhochstand bereits früh zu Defekten in der Spermatogenese führen. Es wurde beschrieben, dass es bereits zu einem Defekt bei der Differenzierung der Keimzellen zu Spermatogonien kommen kann (Huff, Hadziselimovic et al. 1991). Keimzellen, die sich nicht zu Spermatogonien entwickeln, persistieren noch einige Zeit im Hoden und degenerieren später. Es wird vermutet, dass diese persistierenden Keimzellen eine Quelle für spätere Karzinome sein können (Skakkebaek, Berthelsen et al. 1987). Dies führt zu einer reduzierten Zahl an Keimzellen. Andere Untersuchungen kommen zu dem Schluss, dass es auch zu sekundärer Degeneration des Keimepithels kommt (Hutson, Hasthorpe et al. 1997).

Ist das Keimepithel von Nagern relativ resistent gegen Temperaturerhöhungen, so erklärt dies warum man im Hoden von KO^{MORE}-Tieren keine allgemeine Degeneration des Keimepithels findet. Eine Degeneration aufgrund einer erhöhten Temperatur müsste sich gleichermaßen im gesamten Hoden auswirken, im Fall der AP-2 gamma KO^{MORE}-Hoden ist der Verlust der Keimzellen aber auf einzelne Hodenkanälchen beschränkt.

Ebenso wie eine Erklärung des Phänotyps durch den Cryptorchidismus in KO^{MORE}-Tieren und die daraus resultierende allgemeine Temperaturerhöhung im Hoden, ist auch eine Entstehung des KO^{MORE}-Phänotyps durch eine Disregulation im Hormonhaushalt auszuschließen (Harris und Juriloff 1999; Cooke und Saunders 2002). Die Keimzellenpopulation ist zwar in hohem Maß von endokrinen, extratestikulären und parakrinen, intratestikulären Faktoren und Hormonen abhängig, eine Störung dieser Faktoren würde sich jedoch ebenfalls wie eine Temperaturerhöhung auf den gesamten Hoden auswirken. Der AP-2 gamma KO^{MORE}-Phänotyp ist jedoch auf einzelne Hodenkanälchen beschränkt.

Defekte im Ovar

Wie die KO^{MORE}-Männchen sind auch die KO^{MORE}-Weibchen steril. Im Gegensatz zu den Männchen findet man bei den Weibchen im adulten Tier keine Keimzellen, weder Follikel noch Oozyten. Dieser, in dem Ovar, stärker ausgeprägte Phänotyp, lässt sich durch die Unterschiede in der Bildung und Entwicklung von Ovar und Hoden erklären. Während im Hoden erst mit Beginn der Geschlechtsreife die Spermatogenese einsetzt und ab diesem Zeitpunkt fortwährend Spermien gebildet werden können, werden im Ovar bereits vor der Geburt alle Follikel angelegt (Simpson und Rajkovic 1999). Defekte, die vor der Bildung der Primärfollikel auftreten, können im adulten Tier nicht mehr nachvollzogen werden, es sind nur noch ihre Folgen zu erkennen.

Es konnte gezeigt werden, dass im AP-2 gamma KO^{MORE}-Weibchen der Verlust der Keimzellen schon stattgefunden hat. Mit dem TUNEL-Verfahren lassen sich keine apoptotischen Keimzellen mehr im Ovar nachweisen, es sind lediglich im WT-Ovar apoptotische Zellen zu detektieren. Bei diesen apoptotischen Zellen handelt es sich jedoch um Zellen eines Gelbkörpers (Corpus luteum), der sich in der Rückbildung befindet. Ein Gelbkörper wird in den KO^{MORE}-Tiere nicht gebildet, da durch das Fehlen der Follikel kein Eisprung mit anschließender Gelbkörperbildung stattfindet.

Aus der Literatur ist bekannt, dass AP-2 gamma im Ovar exprimiert wird (Oulad-Abdelghani, Bouillet et al. 1996), hauptsächlich in den Oozyten der Primärfollikel (Chazaud, Oulad-

Abdelghani et al. 1996). Folgt man vom AP-2 gamma KO^{More} -Phänotyp im Hoden auf den Phänotyp im Ovar, so ist zu vermuten, dass in beiden Fällen ein ähnlicher pathologischer Mechanismus zum Verlust des Keimepithels führt. Im Hoden gehen die Keimzellen im Stadium der Spermatogonien vor der Differenzierung der Spermatogonien zu Spermatozyten verloren. Dieser Zeitpunkt ist im Ovar ungefähr mit der Entwicklung von den Primordialfollikeln zu vergleichen. Es kann daher vermutet werden, dass AP-2 gamma eine Rolle bei der Differenzierung der Primordialfollikel spielt.

Brustdrüse von KO^{MORE} -Tieren

Zur Analyse der Funktion von AP-2 gamma in der Brustdrüse während der Schwangerschaft war das System mit KO^{MORE} -Tieren ungeeignet. Um diesen Defekt erzeugen zu können, muß man den Keimzellendefekt umgehen. Eine Möglichkeit besteht in der Verwendung einer anderen transgenen Cre-Rekombinase-Mauslinie, z.B. einer Cre-Rekombinase- Linie unter dem MMTV-Promoter (Hennighausen, Wall et al. 1995) oder eine doppelt transgene Mauslinie in der die Cre-Rekombinase induzierbar ist (z.B. Tetrazyklin induzierbare Cre-Rekombinase (Gossen und Bujard 1995)). Die MMTV-Cre-Rekombinase-Mauslinie exprimiert das Transgen gegen Ende der Schwangerschaft in der Brustdrüse und würde es damit ermöglichen die Rolle von AP-2 gamma in der Schwangerschaft und später in der Laktationsphase im Knockout-Tiermodell zu untersuchen.

Spina bifida

Störungen des Neuralrohrschlusses und daraus resultierende Rachischisis, Exenzephalie und Spina bifida sind beim Menschen eine relativ häufigsten Missbildungen. Menschliche Neuralrohrschlussesdefekte sind multifaktorielle Erkrankungen, bei denen verschiedene interagierende Gene und äußere Einflüsse eine Rolle spielen (Blatter, Lafeber et al. 1997). Man unterscheidet anhand der betroffenen Körperregion zum einen Exenzephalie von Spina bifida, kann aber auch die Spina bifida nochmals in eine hohe oder tiefe Spina bifida unterscheiden. Außerdem unterscheidet man bei Neuralrohrschlussesdefekten, ob sie auf Folsäuregabe reagieren oder Folsäure resistent sind. Beim Menschen sind ca. 30% der Neuralrohrschlussesdefekte resistent gegen Folsäure (van Straaten und Copp 2001), die überwiegende Anzahl der Neuralrohrdefekte könnte jedoch durch Folsäuresubstitution vermieden werden. Aus diesem Grund wird die Folsäuregabe vor und während der Schwangerschaft empfohlen.

Zahlreiche spontan auftretende Mausmutanten und ungefähr 50 Einzelgenmutationen sind mittlerweile identifiziert worden, die zu einem Neuralrohrschlussesdefekt in der Maus führen. In den meisten Fällen wird von einer unvollständigen Penetranz und einer variablen Ausprägung des Neuralrohrdefekts berichtet (Harris und Juriloff 1999). Im Hinblick auf den Phänotyp der AP-2 gamma KO^{MORE}-Tiere sind vor allem Mausmutanten und Knockout-Tiere von Bedeutung, die einen ähnlichen Phänotyp wie die AP-2 gamma KO^{MORE}-Tiere haben; also alle Mausmodelle in denen eine Spina bifida auftritt.

Überraschenderweise resultierte aus der gezielte Ausschaltung von Genen, die spezifisch im Neuralplattenepithel während der Embryonalentwicklung exprimiert werden, wie z.B. Otx1 oder Emx2, keiner Veränderung der Neurulation (Cecchi, Mallamaci et al. 1999). Dagegen führte die Zerstörung von Genen, denen eine Funktion in der Signaltransduktion, Onkogenese oder in physiologischen Funktionen im adulten Organismus zugeordnet wurde, zu Neuralrohrdefekten.

Mausmutanten mit Spina bifida

Die spontan aufgetretene Mausmutante „curly tail“ (ct) kennt man seit über 50 Jahren. Trotz vieler Untersuchungen wurde das zu dieser Mutante gehörende Gen noch nicht isoliert und analysiert (van Straaten und Copp 2001). Bei den homozygoten Tiere tritt in unterschiedlicher Ausprägung und Penetranz eine Spina bifida und ein „curly tail“ auf, selten findet man auch eine Exenzephalie. 50% der Tiere haben einen „curly tail“, 10% eine Spina bifida und nur etwa 3% eine Exenzephalie. Das ct-Mausmodell ist Folsäure resistent und stellt damit eine Tiermodell für die Folsäure resistente Form der Neuralrohrschlussesstörungen beim Menschen da. In dieser Mutante findet man bei weiblichen Tieren gehäuft Exenzephalie, während bei Männchen häufiger eine Spina bifida auftritt (Copp, Crolla et al. 1988).

Die spontan aufgetretene Mutation Splotch (Sp) führt in 50-100% zu einer Exenzephalie oder zu einer Spina bifida (Moase und Trasler 1987). Folsäure (Fleming und Copp 1998) reduziert Risiko für Missbildung des Neuralrohrs um bis zu 40%. Diese Mutante ist Folsäure sensitiv. Es sind heute weder die Ursachen eines Folsäuremangels bekannt, noch konnte der zugrunde liegende molekulare Mechanismus bisher aufgeklärt werden. Die Splotch-Mutante konnte auf eine Deletion im Pax3-Gen zurückgeführt werden. Pax3 ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem den Transkriptionsfaktor Msx2 reguliert. Der Verlust der Pax3 Genexpression führt zur Überexpression des Msx2-Gens. Dieser Transkriptionsfaktor wird während der normalen Embryonalentwicklung im dorsalen Neuralrohr exprimiert. Überexpression von Msx2 führte in transgenen Tieren zu Exenzephalie(Wang, Chen et al. 1996).

Andere Mausmutanten oder Knockout-Tiere zeigen hauptsächlich oder ausschließlich einen Neuralrohrschlussdefekt im Bereich des Kopfes. Man findet eine aus dem Schlussdefekt resultierende Exenzephalie bei den Cart1-KO-Tiere (Zhao, Behringer et al. 1996) , bei den twist-KO-Tieren (Chen und Behringer 1995), den Laminin 5 alpha KO-Tieren (Miner, Cunningham et al. 1998) und bei den p53 KO-Tieren (Armstrong, Kaufman et al. 1995). Auch durch Überexpression kann es zu Neuralrohrschlussdefekten kommen. So führt die Überexpression von Msx2 (Winograd, Reilly et al. 1997) oder sonic hedgehog (Echelard, Epstein et al. 1993) in transgenen Tieren zu Exenzephalie. Die Überexpression von Connexin Cx43, einem Gap-junction-Protein, im gesamten Neuralrohr und in der Neuralleiste führt ebenfalls in 10-25% der Fälle zu Exenzephalie (Ewart, Cohen et al. 1997).

AP-2 gamma KO^{MORE}-Tieren im Vergleich mit der „curly tail“ Mutante

Bei den AP-2 gamma KO^{MORE}-Tieren tritt eine Spina bifida nur bei einem Teil der Tiere auf. Es sind zu einen nur die männlichen Tiere betroffen und dies auch nur zum Teil und in einer unterschiedlich starker Ausprägung. Ein Teil der Tiere mit eine Spina bifida hatte außerdem einen „curly tail“. Ein „curly tail“ kam jedoch nie ohne Spina bifida vor.

Die Ausprägung und Penetranz des KO^{MORE}-Phänotyps ähnelt in der Ätiologie dem „curly tail“ (ct)-Mausmodell (Seller und Adinolfi 1981). In beiden Tiermodellen tritt die Spina bifida nur bei einem Teil der Tiere auf und man findet außer der Spina bifida noch einen geknickten oder gerollten Schwanz („curly tail“). Im Unterschied zum KO^{MORE}-Phänotyp tritt bei der ct-Mutante in einem geringen Prozentsatz eine Exenzephalie auf, bei KO^{MORE}-Tieren wurde kein einziger Fall von Exenzephalie gefunden. In der ct-Mutante findet man nur eine schwache geschlechtsspezifische Prädominanz für Spina bifida in männlichen Tieren, weibliche Tiere sind häufiger von Exenzephalie betroffen.

Trotz einiger Unterschiede zwischen dem ct-Modell und den KO^{MORE}-Tieren bietet sich das ct-Modell gut als Vergleichsmodell bei der Analyse der KO^{MORE}-Tiere. Anhand dieses Tiermodells wurden eine Reihe physiologischer und pathophysiologischer Mechanismen untersucht, die zum Neuralrohrschluss oder „curly tail“ führen und einige Hypothesen aufgestellt.

Entstehung von Neuralrohrdefekten

Im Fall der Spina bifida von KO^{MORE}-Tieren konnte gezeigt werden, dass es bei diesen Tieren um einen primären Neuralrohrschlussdefekt handelt. Die Spina bifida entsteht bereits am Tag

E9,5, wenn sich das Neuralrohr in den betroffenen Embryonen nicht schließt. Gleiches gilt auch für die ct-Mutante. Auch hier ist der posteriore Neuroporus vergrößert und das Neuralrohr schließt sich über eine längere Distanz nicht (van Straaten und Copp 2001).

Im Fall der ct-Mutante wurde in Studien gezeigt, dass es im caudalen Bereich der Embryonen zu einer reduzierten Zellproliferation in den ventral unter dem Neuroporus liegenden Gewebe kommt. Dieses Ungleichgewicht in der caudalen Region der betroffenen Embryonen findet man bereits vor dem Neuralrohrschlussdefekt. Die Bildung einer Spina bifida konnte in diesem Tiermodell durch Wachstumsverzögerung verhindert werden (Copp, Crolla et al. 1988). Eine Wachstumsverzögerung kann *in vivo* durch Hungern der trächtigen Weibchen oder *in vitro* durch Temperaturerhöhung herbeigeführt werden. Es wird vermutet, dass die Wachstumsretardierung besonders das Neuroepithelium und weniger das dorsale Entoderm, paraxiale Mesenchym oder Notochord betrifft, so dass das Ungleichgewicht im Wachstum und Proliferation zwischen Neuroepithel und darunterliegendem Gewebe ausgeglichen werden kann (Hall, Gofflot et al. 2001).

Ein ähnliches Modell könnte auch auf die AP-2 gamma KO^{MORE} -Tiere zutreffen. Weiß man doch aus Studien mit den anderen AP-2-Familienmitgliedern, dass sie eine wichtige Funktion bei der Proliferation und Differenzierung spielen. So wurde z.B. in Zellkulturexperimenten gezeigt, dass das Fehlen von AP-2 alpha zu einer verminderten Proliferation von embryonalen Mausfibroblasten führt (Pfisterer et al. 2002). Unklar bleibt wie das Fehlen von AP-2 gamma letztendlich zu dem Neuralrohrschlussdefekt führt. AP-2 gamma wird während der Embryonalentwicklung im dorsalen Neuralrohr exprimiert und man findet auch noch später eine Expression von AP-2 gamma in diesem dorsalen Bereich des Rückenmarks (Chazaud, Oulad-Abdelghani et al. 1996). Diese AP-2 gamma Expression findet man nicht bei einem der anderen AP-2 Familienmitgliedern. Im KO^{Wnt1} -Tieren findet in diesen Zellen keine Expression der Cre-Rekombinase statt, dies erklärt warum bei diesen Tieren keine Spina bifida auftritt.

Entstehung des „curly tail“

Erst nach dem eigentlichen Neuralrohrschluss bildet der Mausembryo sekundär seinen Schwanz aus. Die Schwanzbildung geht mit der sekundären Neurulation (Kanalisation) der Sakralregion des Embryos einher. Im KO^{MORE} -Embryo kommt zuerst zum Ausbilden der Spina bifida und danach zur Bildung des „curly tails“. Der „curly tail“ war immer mit einer Spina bifida gekoppelt. Bei den ct-Tieren tritt ein „curly tail“ auch ohne eine Spina bifida auf. In diesem Tiermodell tritt die Spina bifida in nahezu allen Fällen an den „curly tail“ gekoppelt auf, ganz im Gegensatz zur Spina bifida in KO^{MORE} -Tieren.

Im ct-Tiermodell konnte gezeigt werden, dass ein „curly tail“ bereits beim verspäteten oder verzögerten Schluss des Neuroporus entstehen kann (van Straaten und Copp 2001). Da ein „curly tail“ in den KO^{MORE}-Tieren nie gesondert auftrat, kann vermutet werden, dass es sich immer um einen ausbleibenden Verschluss des Neuroporus bei den von Spina bifida betroffenen Tieren handelt. In diesem Fall entsteht der „curly tail“ als eine sekundäre Folge der Spina bifida, durch Wachstumsungleichgewicht bei der Ausbildung des Schwanzes. Dieses Ungleichgewicht im Wachstums des Schwanzes kann im KO^{MORE}-Embryo (Abbildung 18) anscheinend in der späteren Embryonalentwicklung aufgeholt werden. Unter den Embryonen findet man wesentlich häufiger Tiere mit Spina bifida und "curly tail" als nach der Geburt (Abbildung 19). Der "curly tail" verwächst im KO^{MORE}-Tier sekundär.

Geschlechtsspezifische Spina bifida

Beim Auftreten von Neuralrohrdefekten im Menschen findet man gehäuft Exenzephalie bei Frauen und Spina bifida bei Männern (Blatter, Lafeber et al. 1997). Die männliche Prädominanz findet man auch bei einem Teil der Mausmodelle für Spina bifida. So tritt z.B. bei der "curly tail" –Mutante eine Exenzephalie häufiger bei Weibchen auf und die Spina bifida häufiger bei Männchen. Eine absolute Prädisposition für Spina bifida ausschließlich bei männlichen Tieren findet man nur bei den AP-2 gamma KO^{MORE}-Tieren. AP-2 gamma wird während der Embryonalentwicklung im dorsalen Neuralrohr exprimiert und obwohl AP-2 gamma unabhängig vom Geschlecht exprimiert wird entsteht ein geschlechtsspezifischer Phänotyp.

Ein Tiermodell für Exenzephalie zeigt eine absolute weibliche Prädisposition für diesen Defekt. Die Nullmutation des Gens p53, das für einen Transkriptionsfaktor mit Tumorsupressor-Funktion codiert und der außerdem eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielt, führt nur in homozygoten weiblichen Tieren zur Exenzephalie (10-30% der Tiere) (Armstrong, Kaufman et al. 1995; Sah, Attardi et al. 1995). Weder die Rolle des Transkriptionsfaktors während der Embryonalentwicklung noch die Ursache dieses geschlechtsspezifischen Neuralrohrdefekts sind bislang erforscht.

Obwohl es eine Reihe von Untersuchungen und Experimenten über die männliche und weibliche Prädisposition bei den verschiedenen Neuralrohrschlussdefekten gibt, sind die Ursachen noch nicht geklärt (Seller 1987; Seller 1995). Bislang fehlte ein Tiermodell in dem männliche Tiere in nahezu ausschließlich von Spina bifida betroffen sind. In den meisten untersuchten Tiermodellen, die eine leichte männliche Prädisposition zeigen, konnte die Prädisposition bereits durch das Einkreuzen in eine andere Tierlinie modifiziert werden oder die Prädisposition konnte in Versuchen von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (van Straaten und Copp 2001).

In einigen Arbeiten zu diesem Thema wird postuliert, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede während der Neurulation geben muss, die dann zu einer geschlechtsspezifischen Prädisposition führen. In einer Studie von Seller wurden nach geschlechtsspezifischen Unterschieden während der Neurulation gesucht (Seller und Perkins-Cole 1987). Man fand heraus, dass weibliche Embryonen sich während der Phase der Neurulation langsamer als männliche Embryonen entwickeln. Die am weitesten entwickelten Embryonen waren immer männlich, sie waren etwas größer und hatten mehr Somiten als die weiblichen Embryonen. Ebenso waren die am wenigsten weit entwickelten Embryonen immer weiblich.

Verknüpft man dieses Ergebnis mit den Versuchen von Copp (Copp, Crolla et al. 1988), der in "curly tail"-Mutanten zeigen konnte, dass Wachstumsreduktion zu dem Nichtausbilden einer Spina bifida führt, lässt sich ein geschlechtsspezifisches Spina bifida-Modell aufstellen. Männliche Embryonen entwickeln sich zum Zeitpunkt der Neurulation schneller, Proliferationsdefizite ventral des posterioren Neuroporus werden nicht durch verlangsamtes Wachstum abgefangen und es kommt gehäuft zu caudalen Neuralrohrschlussdefekten.

In wieweit sich dieses Modell auf die AP-2 gamma KO^{MORE}-Tiere übertragen lässt, müssen weitere Versuche an KO^{MORE}-Embryonen zeigen. Die KO^{MORE}-Tiere eignen sich durch das alleinige Auftreten von Spina bifida in männlichen Tieren für Untersuchungen der männlichen Prädisposition.

Spina bifida und Cryptorchidismus

Von Untersuchungen am Menschen weiß man, dass eine Spina bifida häufig mit Defekten im Urogenitaltrakt einhergeht. Unter anderem tritt bei Spina bifida-Patienten Cryptorchidismus (?gr. crypt-: versteckt; ?gr. orchid-: Hoden) um 15% häufiger als in der normalen Population auf (Ferrara, Rossodivita et al. 1998). In einer Untersuchung an Patienten mit Hodenhochstand wurde gezeigt, dass in 42% der Fälle eine bis dahin nicht entdeckte Spina bifida im Lumbal- oder Sakralbereich vorliegt (Tveter und Fjaerli 1975). Bei den meisten Untersuchungen am Menschen, die unternommen wurden um den Zusammenhang zwischen Spina bifida und Cryptorchidismus aufzuklären, handelt es sich jedoch um Einzelfallberichte oder epidemiologische Studien mit einer geringen Anzahl an Patienten (Husmann und Levy 1995; Barteczko und Jacob 2000). Lediglich eine Arbeitsgruppe beschäftigte sich in den 90er Jahren experimentell mit dem Zusammenhang von Spina bifida und Cryptorchidismus. Diese Gruppe zeigte zum einen in Untersuchungen an Spina bifida-Patienten und zum anderen Versuchen an Ratten, dass das Rückenmark auf das Absinken der Hoden während der inguinotransversalen

Phase Einfluß nimmt (Hutson, Beasley et al. 1988). Ein Mausmodell für Hodenhochstand wurde in der Literatur nicht beschrieben.

Man weiß bereits das Androgene, der genitofemorale Nerv, das Gubernaculum und der Cremaster-Muskel eine entscheidende Rolle beim Testis descendens spielen. In der Arbeit von Hutson (Hutson, Beasley et al. 1988) wurde postuliert, dass es im Rückenmark einen Nukleus geben muss, der über den genitofemoralen Nerv auf das Gubernaculum Einfluss nimmt. Kommt es in diesem Nukleus durch die Spina bifida oder durch eine Verletzung (Querschnitt), wie er bei Ratten experimentell erzeugt wurde, zu Störungen wirkt sich die über den genitofemoralen Nerv auf das Gubernaculum und letztendlich auf die Lage des Hoden aus.

In den AP-2 gamma KO^{MORE}-Tiere tritt bei allen männlichen Tieren einen Hodenhochstand auf. In Abbildung 25B ist gezeigt, dass es in diesen Tieren zu einem Defekt im Gubernaculum kommt. Das Gubernaculum zieht im normalen Tier den Hoden nach unten, dies geschieht durch eine Formveränderung (Frey und Rajfer 1984). Das zunächst längliche Gubernaculum zieht sich zusammen, rundet sich ab und der Hoden wird in das Skrotum gezogen. Bei den KO^{MORE}-Tiere zieht sich das Gubernaculum nicht zusammen, es behält seine längliche Form und der Hoden wird nicht in das Skrotum gezogen. Der Hodenhochstand tritt bei allen KO^{MORE}-Tieren auf, das heißt, es sind auch Tiere vom Hodenhochstand betroffen, die keine Spina bifida haben. Trifft die Hypothese mit dem Nukleus im Rückenmark zu (Hutson, Beasley et al. 1988), kann man sich vorstellen, dass dieser Nukleus im Rückenmark auch in Tieren ohne Spina bifida verändert ist und es folglich auch in diesen KO^{MORE}-Tiere zu Hodenhochstand kommt.

Motorische Defizite in Tieren mit Spina bifida

Menschliche Neuralrohrschlussdefekte sind multifaktorielle Erkrankungen, bei denen verschiedene interagierende Gene und äußere Einflüsse eine Rolle spielen (Blatter, Lafeber et al. 1997). Daher stellen Knockout-Tiere und andere Tiermodelle immer nur einen Aspekt dieser Neuralrohrschlussdefekte dar.

In den AP-2 gamma KO^{MORE}-Tieren kommt es im Gegensatz zu menschlichen Neuralrohrschlussstörungen selten zu neurologischen Ausfällen oder motorischen Defiziten. Beim Menschen degeneriert das nach Außen proliferierte Gewebe, Exenzephalie führt letztendlich zu Anenzephalie; dieser Prozess findet in Mäusen nicht oder nur abgeschwächt statt. So findet man z.B. beim Auftreten von Exenzephalie bei heterozygoten AP-2 alpha Tieren (Kohlbecker, Lee et al. 2002) oder den in dieser Arbeit gezeigten AP-2 alpha KO-Tieren kein degeneriertes Hirngewebe und keine sekundäre Anenzephalie.

Trotzdem kommt es bei einigen, wenigen Tieren zu neurologischen Defiziten. Im Gegensatz zu Menschen mit Spina bifida, werden die KO^{MORE} -Tiere mit einer Spina bifida auf natürlichen Weg geboren. Beim Geburtsvorgang kann das weder durch Haut noch Wirbel geschützte Nervengewebe beschädigt werden, beim Geburtsvorgang kann es zu Traumata am Rückenmark kommen. Bei humanen Patienten wird die Spina bifida normalerweise pränatal diagnostiziert und Kinder mit Spina bifida durch Kaiserschnitt entbunden, um das Nervengewebe nicht weiter zu beschädigen.

Ein weiterer Grund, warum neurologische Defizite in diesem Tiermodell selten sind, ist, dass Tiere, die neurologische oder motorische Defizite haben, eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit haben als ihre gesunden Geschwister. Tiere mit schweren Schäden werden häufig aus dem Wurf aussortiert, nicht gesäugt oder sogar getötet. Die offene Spina bifida führt außerdem noch zu einer erhöhten Infektionsgefahr und einem erhöhten Blutungsrisiko, was die Überlebensrate dieser Tiere weiter senkt.

KO^{Wnt1} -Tiere

Parallel zur Analyse der AP-2 gamma KO^{MORE} -Tiere wurden auch AP-2 gamma KO^{Wnt1} -Tiere analysiert. Diese KO^{Wnt1} -Tiere zeigten keinen Phänotyp. Keiner der Defekte, die bei den KO^{MORE} -Tieren auftrat, zeigte sich bei den KO^{Wnt1} -Tieren.

Die Wnt1-Cre-Rekombinase wird während der Embryonalentwicklung in den Neuralleistenzellen exprimiert, kurz bevor diese aus dem Neuralrohr auswandern und während ihrer Wanderung (Chai, Jiang et al. 2000). In der späteren Embryonalentwicklung findet man keine Expression in den Derivaten der Neuralleiste. Die Wnt1-Cre-Rekombinase wird folglich in einem engen räumlichen und zeitlichen Fenster exprimiert.

Für die Analyse der KO^{Wnt1} -Tiere spielt es eine wichtige Rolle in welchen Geweben und Regionen die Cre-Rekombinase exprimiert wird, eine Loop-out-Reaktion stattfinden kann und es im WT-Tier zur Expression von AP-2 gamma kommt. Im Bereich des Rumpfes wird die Wnt1-Cre-Rekombinase in den Neuralleistenzellen exprimiert die später z.B. die dorsalen Wurzelganglien oder die chromaffinen Zellen der Nebenniere bilden, leider wird AP-2 gamma in keinem dieser Gewebe exprimiert. AP-2 gamma wird im Rumpf nur in der Genitalleiste und im dorsalen Neuralrohr, das sich zum Rückenmark entwickelt, exprimiert (Chazaud, Oulad-Abdelghani et al. 1996).

Im Kopfbereich wird die Cre-Rekombinase in nahezu allen Geweben exprimiert, in denen auch AP-2 gamma exprimiert wird. Hier werden im Gegensatz zum Rumpf mit Hilfe der Cre-

Rekombinase in einer Zellpopulation KO-Zellen erzeugt, in denen sich die Defizienz auch bemerkbar machen kann, da diese Zellen normalerweise AP-2 gamma exprimieren würden. Es finden sich jedoch im Kopfbereich keine Unterschiede zwischen WT-Tieren und KO^{Wnt1}-Tieren, auch im Fall der KO^{MORE}-Tiere war kein Unterschied zu entdecken gewesen. Man kann aus diesen Ergebnissen schließen, dass AP-2 gamma im Kopfbereich keine entscheidende Rolle spielt. Es ist zu vermuten, dass der Verlust von AP-2 gamma unter Umständen von den anderen in dieser Region exprimierten AP-2 Transkriptionsfaktoren kompensiert werden kann. Diese Fragestellung wurde mit Hilfe doppelt defizienter Knockout-Tiere (DKO) untersucht.

Doppelt defiziente Tiere

Alle AP-2 Transkriptionsfaktoren werden in einer Reihe von Zellen und Geweben, wie Trophoblast, Neuralleiste, Gliedmaßenknospe, Urogenitaltrakt und Haut, exprimiert. Diese Expressionsmuster überlappen sich vor allem zu Beginn der Embryonalentwicklung bis etwa Tag E10,5 stark (Chazaud, Oulad-Abdelghani et al. 1996; Moser, Ruschoff et al. 1997). Betrachtet man das weit gefächerte Expressionsmuster der einzelnen AP-2 Transkriptionsfaktoren und bedenkt welchen spezifischen abgegrenzten Phänotyp die dazugehörigen KO-Tiere haben, fällt auf, dass Expressionsmuster und KO-Phänotyp stark divergieren. Es ist daher möglich, dass die einzelnen AP-2 Transkriptionsfaktoren den Verlust eines anderen AP-2 Transskriptionsfaktor ausgleichen können. In diesem Fall entsteht ein KO-Phänotyp nur in Geweben, in denen ein Faktor alleine exprimiert wird oder nicht von den anderen Transkriptionsfaktoren ersetzt werden kann.

Dieses gegenseitige Ersetzen der einzelnen AP-2 Transkriptionsfaktoren untereinander wurde bereits von Hilger-Eversheim postuliert (Hilger-Eversheim, Moser et al. 2000) und z.B. an der Rolle von AP-2 alpha und gamma in der Haut näher beleuchtet. In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass AP-2 alpha die Expression von Keratinen reguliert (Maytin, Lin et al. 1999), die AP-2 alpha defizienten Tiere haben aber keinen Defekt in der Haut (Talbot, Loring et al. 1999). Da AP-2 gamma ebenfalls in der Haut exprimiert wird, wurde vermutet, dass AP-2 gamma den Verlust von AP-2 alpha in der Haut kompensieren kann.

DKO-Tiere eignen sich für die Fragestellung in wie weit sich die einzelnen AP-2 Transkriptionsfaktoren gegenseitig ergänzen und ersetzen können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene für AP-2 doppelt defiziente Tiere untersucht. Zum einen wurde durch die Verpaarung zweier konventionell erzeugter KO-Linien AP-2 alpha beta Doppel-Knockout-Tiere erzeugt, zum anderen wurde versucht durch die Verpaarung einer konventionellen KO-Linie mit einer konditionalen KO-Linie AP-2 alpha gamma Doppel-Knockout-Tiere zu erzeugen.

Die alpha beta defizienten Tiere zeigten schwere Defekte. Während der Kopfbereich ähnliche Defekte wie im AP-2 alpha KO-Tier zeigte, war der Rumpf der DKO-Tiere stark deformiert. Der Rumpf war wachstumsretardiert und es wurden keine Gliedmaßenknospen gebildet. Spätestens am Tag E12,5 starben die Embryonen ab und es wurden nach dem Tag E13,5 keine alpha beta DKO-Embryonen mehr isoliert. Es bestätigt sich durch diese DKO-Embryonen, dass AP-2 alpha und beta sich in einem Teil der Gewebe gegenseitig ersetzen können, denn ein derartiger Defekt tritt weder bei den AP-2 alpha noch bei den AP-2 beta KO-Tieren auf. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass AP-2 alpha und beta eine gemeinsame oder zumindestens ähnliche Funktion im Rumpfbereich erfüllen. Man weiß, dass beide Transkriptionsfaktoren zwischen dem Tag E8,0 und dem Tag E10,0 in den Neuralleistenzellen, die aus dem Rumpfbereich auswandern, und im Rückenmark coexprimiert werden (Moser, Ruschoff et al. 1997). Später findet man beide Transkriptionsfaktoren in den Gliedmaßenknospen und den dorsalen Wurzelganglien. Es kann daher gefolgert werden, dass das Fehlen beider Transkriptionsfaktoren in den Neuralleistenderivaten des Rumpfs und in der Gliedmaßenknospe zu einer schweren Wachstumsretardierung und zu starken Missbildungen führt.

Innerhalb der Verpaarung für AP-2 alpha gamma doppelt defizienter Tiere wurden zwischen dem Tag E9,5 und E15,5 keine DKO-Embryonen isoliert. Es wurden lediglich Tiere isoliert, bei denen drei der vier Allele defizient waren. Tiere mit AP-2 alpha^{WT/KO} gamma^{(c)KO/KO} MORE^{wt/cre} Genotyp zeigten zum einen die gleichen Defekte an der Wirbelsäule (Spina bifida) wie die AP-2 gamma KO^{MORE}-Tiere, hinzu kam ein Neuralrohrschlussdefekt im Kopfbereich. Beide Transkriptionsfaktoren werden ab Tag E8,5 teilweise überlappend im Kopfbereich exprimiert (Chazaud, Oulad-Abdelghani et al. 1996). Erst ab dem Tag E10,5 unterscheiden sich die Expressionsmuster im Kopf deutlich voneinander. AP-2 alpha wird verstärkt im Mittel- und Hinterhirn, den cranialen Ganglien exprimiert, während AP-2 gamma mit Schwerpunkt in Frontonasalbereich, dem Vorderhirn und im Gesichtsmesenchym zu finden ist.

Der Schlussdefekt in den AP-2 alpha^{WT/KO} gamma^{(c)KO/KO} MORE^{wt/cre} Tieren hatte geringere Ausmaße als der Schlussdefekt in den AP-2 alpha KO-Tieren, bei denen sich im gesamten Kopfbereich das Neuralrohr nicht schließt. Bei den AP-2 alpha^{WT/KO} gamma^{(c)KO/KO} MORE^{wt/cre} Tiere fusioniert das Neuralrohr im Frontonasalbereich zumindest teilweise, während der Bereich des Mittel- und Nachhirns nicht fusioniert. Ein noch milder ausgeprägter Neuralrohrschlussdefekt findet man bei einem Teil der AP-2 alpha heterozygoten Tieren (alpha^{WT/KO}), 14% dieser Tiere entwickeln eine Exenzephalie im Bereich des Mittelhirns (Kohlbecker, Lee et al. 2002). Der bei den AP-2 alpha^{WT/KO} gamma^{(c)KO/KO} MORE^{wt/cre} Tiere beobachtete Phänotyp liegt also in der Schwere und Ausprägung zwischen den bei AP-2 alpha defizienten und heterozygot defizienten Tieren beobachteten Phänotypen.

Man kann daraus schließen, dass AP-2 gamma und AP-2 alpha während der Kopfbildung teilweise ähnliche Funktionen haben, der Verlust von AP-2 alpha nicht durch AP-2 gamma kompensiert werden kann, während der Verlust von AP-2 gamma von AP-2 alpha kompensiert wird. Und zwar so lange, wie zwei funktionsfähige AP-2 alpha Allele vorhanden sind. Der Funktionsverlust eines AP-2 alpha Allels führt in AP-2 gamma KO^{MORE}-Tieren bereits zu den Neuralrohrschlussdefekten.

Zielgene von AP-2 alpha

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Gene vorgestellt, die von AP-2 alpha reprimiert werden. Diese Gene wurden durch eine subtraktive Hybridisierung (SSH, subtractive suppression hybridisation) isoliert. Diese Methode hat zum einen den Vorteil, dass man die *in vivo* differentiell exprimierten Gene isolieren kann, zum anderen, dass es zu einer Anreicherung von schwach exprimierten Genen kommt. Man geht davon aus, dass regulative Gene, die z.B. für Transkriptionsfaktoren kodieren, nur in geringer Kopienzahl exprimiert werden und daher sind diese schwach exprimierten Gene von besonderen Interesse. Sogenannte „Haushalts“-Gene, die in großer Kopienzahl exprimiert werden, treten durch die SSH-Methode in den Hintergrund. Grundlage der subtraktiven Hybridisierung war jeweils ein Kopf eines WT- und eines AP-2 alpha KO-Tieres am Tag E8,75 (Pfisterer et al. 2002). Dieser Zeitpunkt war ausgewählt worden, weil sich zu diesem Zeitpunkt das Neuralrohr schließt und der AP-2 alpha KO-Phänotyp sich ausbildet.

Zunächst wurden 4800 cDNAs von differentiell exprimierten Genen isoliert. Mit Hilfe erneuter Analyse durch reversen Northern wurden letztendlich 52 differentiell exprimierten Genen ausgewählt und eingehend analysiert. Es wurden die „full length“-Klone dieser Gene aus einer cDNA Bibliothek isoliert und diese sequenziert. Durch *in Situ* Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass die isolierten Gene im Kopfbereich exprimiert werden. Dies ist in diesem Fall eine Voraussetzung für ein Zielgen von AP-2 alpha, da auch das Ausgangsmaterial der Zielgensuche aus Köpfen stammt.

Weitergehend wurden vier Gene weitergehend untersucht, die von AP-2 alpha reprimiert werden. Es konnte durch RT-PCR gezeigt werden, dass diese Gene in AP-2 alpha KO-Embryonen vorzeitig oder verstärkt exprimiert werden. Besonders verfrüht war die Expression von KLF4 in AP-2 alpha KO-Embryonen, hier konnte bereits zwei Tag vor der Expression im WT-Embryo eine Expression im KO-Tier gezeigt werden. Pfisterer konnte außerdem in *in Situ* Hybridisierungen von WT- und AP-2 alpha KO-Embryonen am Tag E8,5 zeigen, dass KLF4 vorzeitig im Mesenchym der KO-Embryonen exprimiert wird (Pfisterer et al. 2002). Die anderen Gene wurden einen Tag (EFEMP-1, Mtd) früher oder nur verstärkt (Stra13) exprimiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass alle vier Gene zu terminaler Differenzierung und zum Ausstieg aus dem Zellzyklus führen.

Diese Studien zeigen z.B. dass KLF4 im Kolon mitverantwortlich ist für die terminale Differenzierung der Becherzellen (Katz, Perreault et al. 2002). Außerdem wird KLF4 von den postmeiotischen Spermatozoen exprimiert, kurz bevor diese in das Hodenkanälchenlumen abgegeben werden (Behr und Kaestner 2002) und ist in die postmitotische Differenzierung der Epithelzellen involviert (Brembeck und Rustgi 2000). Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass

die Überexpression von KLF4 zu einem Wachstumsstopp führt (Garrett-Sinha, Eberspaecher et al. 1996; Shields, Christy et al. 1996; Zhang, Geiman et al. 2000). Pfisterer konnte in Zellkulturexperimenten zeigen, dass embryonale Mausfibroblasten von AP-2 alpha defizienten Tieren deutlich schwächer proliferieren als die WT-Kontroll-Zellen, und dass die KO-Zellen im Gegensatz zu den WT-Zellen KLF4 exprimieren (Pfisterer et al. 2002).

Wie die bisherigen Untersuchungen zeigen scheint EFEMP-1 eine wichtige Rolle bei der Alterung und der Differenzierung von Zellen zu spielen. So wurde in Zellkulturexperimenten gezeigt, dass die Expression von EFEMP-1 mit Zellalterung einher geht (Lecka-Czernik, Lumpkin et al. 1995) und mit dem Werner-Syndrom, das mit vorzeitiger Alterung einhergeht, in Verbindung gebracht werden kann. Auch bei der Doyn'sche Honigwaben-Dystrophie, einer Mutation im humanen EFEMP-1 Gen (Stone, Lotery et al. 1999; Sauer, White et al. 2001), kommt es zu einem Krankheitsbild, das der altersabhängigen Maculadegeneration ähnelt (Marmorstein, Munier et al. 2002). Von Stra 13 Expression ist ebenfalls beschrieben, dass es in Zellkulturexperimenten zu Wachstumsstopp und terminaler Differenzierung führt (Boudjelal, Taneja et al. 1997). Mtd, Mitglied der Bcl-2 Familie, kann Apoptose aktivieren (Hsu und Hsueh 1998).

Aufgrund dieser Daten kann man postulieren, dass AP-2 alpha die vier Zielgene reprimiert. Diese Gene sind alle beschrieben als Gene, die zu terminaler Differenzierung und Zellzyklus-Ausstieg führen. Man kann also davon ausgehen, dass AP-2 alpha zunächst verhindert, dass diese Gene exprimiert werden, z.B. während der Migration der cranialen Neuralleistenzellen. Nach dem Erreichen der Zielstruktur schwächt sich die Expression von AP-2 alpha ab und die reprimierten Zielgene können exprimiert werden. Im AP-2 alpha KO-Tier führt der Verlust von AP-2 zur vorzeitigen Expression dieser Gene und die Zellen stoppen im Zellzyklus und differenzieren zu früh. Dies führt dann letztendlich zu Apoptose, da diese Zellen nicht ihr Zielgewebe erreicht haben.

Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Projekte bearbeitet. Durch die Analyse der konditionalen AP-2 gamma KO^{MORE}-Tiere konnte gezeigt werden, dass AP-2 gamma eine wichtige Rolle beim Neuralrohrschluss und bei der Keimzellentwicklung spielt. Ein Teil der KO-Tiere hatte eine Spina bifida, alle waren von einem Keimzelldefekt betroffen.

Das konditionale KO-System ermöglicht noch eine Reihe weitere Versuche mit anderen gewebespezifischen KO-Tieren. Da die Rolle von AP-2 gamma in der Brustdrüse nicht geklärt werden konnte, könnte man mit Hilfe einer Brustdrüsen spezifischen Cre-Rekombinase (MMTV-Cre) die Funktion z.B. während der Schwangerschaft untersuchen. Um den Keimzellphänotyp zu umgehen, könnte man eine induzierbare Cre-Rekombinase-Mauslinie verwenden. Da es bei den hier vorgestellten KO-Tieren schwierig war die Effizienz der Cre-Rekombinase vermittelten Loop-out-Reaktion zu ermitteln und dadurch auch die Einschätzung des individuellen Phänotyps erschwert war, könnte man Gewebe für die Genotypisierung mittels Laserdissektion aus den histologischen Schnitten gewinnen und direkt das untersuchte Gewebe genotypisieren.

Die Analyse der doppelt defizienten Tiere kann die redundante Funktion der einzelnen AP-2 Proteine aufklären, mit Hilfe von anderen konditionalen AP-2 defizienten Tieren (z.B. konditionale AP-2 alpha Tiere) können gewebespezifische KO-Tiere erzeugt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde nach Zielgenen von AP-2 alpha gesucht und vier reprimierte Zielgene (KLF4, Stra13, Mtd, EFEMP-1) wurden näher charakterisiert. Ausgehend von diesen Daten stehen zum einen Promotorstudien an, um zu belegen, dass diese Gene tatsächlich von AP-2 alpha reprimiert werden. Die Erzeugung von KO-Tieren dieser Gene ist ein weiterer Schritt, der die teilweise unbekannte Rolle während der Embryonalentwicklung aufklären kann. Von KLF4 ist bereits ein KO-Tier erzeugt worden, daher könnte man anhand KLF4 AP-2 alpha doppelt defizienten Tiere testen, ob der AP-2 alpha KO-Phänotyp in den DKO-Tieren abgemildert werden kann. Dies würde bestätigen, dass die verfrühte Expression von KLF4 in den AP-2 alpha KO-Tieren eine Rolle bei der Entstehung des AP-2 alpha Phänotyps spielt.

Literaturverzeichnis

- Anderson, D. J., A. Groves, et al. (1997). "Cell lineage determination und the control of neuronal identity in the neural crest." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **62**: 493-504.
- Anderson, R., R. Fassler, et al. (1999). "Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads." Development **126**(8): 1655-64.
- Armstrong, J. F., M. H. Kaufman, et al. (1995). "High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice." Curr Biol **5**(8): 931-6.
- Barteczko, K. J. und M. I. Jacob (2000). "The testicular descent in human. Origin, development und fate of the gubernaculum Hunteri, processus vaginalis peritonei, und gonadal ligaments." Adv Anat Embryol Cell Biol **156**: III-X, 1-98.
- Bashir, M. S. und M. Wells (1995). "Mullerian inhibiting substance." J Pathol **176**(2): 109-10.
- Bauer, R., M. E. McGuffin, et al. (1998). "Cloning und characterization of the Drosophila homologue of the AP-2 transcription factor." Oncogene **17**(15): 1911-22.
- Behr, R. und K. H. Kaestner (2002). "Developmental und cell type-specific expression of the zinc finger transcription factor Kruppel-like factor 4 (Klf4) in postnatal mouse testis." Mech Dev **115**(1-2): 167-9.
- Blatter, B. M., A. B. Lafeber, et al. (1997). "Heterogeneity of spina bifida." Teratology **55**(4): 224-30.
- Bosher, J. M., N. F. Totty, et al. (1996). "A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma." Oncogene **13**(8): 1701-7.
- Boudjelal, M., R. Taneja, et al. (1997). "Overexpression of Stra13, a novel retinoic acid-inducible gene of the basic helix-loop-helix family, inhibits mesodermal und promotes neuronal differentiation of P19 cells." Genes Dev **11**(16): 2052-65.
- Brembeck, F. H. und A. K. Rustgi (2000). "The tissue-dependent keratin 19 gene transcription is regulated by GKLF/KLF4 und Sp1." J Biol Chem **275**(36): 28230-9.
- Brock, D. J. und J. B. Scrimgeour (1972). "Early prenatal diagnosis of anencephaly." Lancet **2**(7789): 1252-3.
- Burns, K. H., G. E. Owens, et al. (2002). "Characterization of integrin expression in the mouse ovary." Biol Reprod **67**(3): 743-51.
- Cain, M. P., S. A. Kramer, et al. (1994). "Expression of androgen receptor protein within the lumbar spinal cord during ontologic development und following antiandrogen induced cryptorchidism." J Urol **152**(2 Pt 2): 766-9.
- Cecchi, C., A. Mallamaci, et al. (1999). "Mouse forebrain development. The role of Emx2 homeobox gene." C R Acad Sci III **322**(10): 837-42.
- Chai, Y., X. Jiang, et al. (2000). "Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth und mandibular morphogenesis." Development **127**(8): 1671-9.
- Char, F. (1978). "Peculiar facies with short philtrum, duck-bill lips, ptosis und low-set ears--a new syndrome?" Birth Defects Orig Artic Ser **14**(6B): 303-5.
- Chazaud, C., M. Oulad-Abdelghani, et al. (1996). "AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs und face during mouse embryogenesis." Mech Dev **54**(1): 83-94.
- Chen, Z. F. und R. R. Behringer (1995). "twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis." Genes Dev **9**(6): 686-99.
- Clermont (1962). "Quantitativ analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia." American Journal of Anatomy **111**: 111-129.
- Cooke, H. J. und P. T. Saunders (2002). "Mouse models of male infertility." Nat Rev Genet **3**(10): 790-801.
- Copp, A. J., J. A. Crolla, et al. (1988). "Prevention of spinal neural tube defects in the mouse embryo by growth retardation during neurulation." Development **104**(2): 297-303.

- Cornel, M. C. und J. D. Erickson (1997). "Comparison of national policies on periconceptional use of folic acid to prevent spina bifida und anencephaly (SBA)." *Teratology* **55**(2): 134-7.
- Dolk, H., P. De Wals, et al. (1991). "Heterogeneity of neural tube defects in Europe: the significance of site of defect und presence of other major anomalies in relation to geographic differences in prevalence." *Teratology* **44**(5): 547-59.
- Duan, C., E. M. Plisetskaya, et al. (1995). "Expression of insulin-like growth factor I in normally und abnormally developing coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)." *Endocrinology* **136**(2): 446-52.
- Echelard, Y., D. J. Epstein, et al. (1993). "Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity." *Cell* **75**(7): 1417-30.
- Ehlers, K., H. Sturje, et al. (1992). "Spina bifida aperta induced by valproic acid und by all-trans-retinoic acid in the mouse: distinct differences in morphology und periods of sensitivity." *Teratology* **46**(2): 117-30.
- Emmen, J. M., A. McLuskey, et al. (2000). "Involvement of insulin-like factor 3 (Insl3) in diethylstilbestrol-induced cryptorchidism." *Endocrinology* **141**(2): 846-9.
- Ewart, J. L., M. F. Cohen, et al. (1997). "Heart und neural tube defects in transgenic mice overexpressing the Cx43 gap junction gene." *Development* **124**(7): 1281-92.
- Ferrara, P., A. Rossodivita, et al. (1998). "Cryptorchidism associated with meningocele." *J Paediatr Child Health* **34**(1): 44-6.
- Fleming, A. und A. J. Copp (1998). "Embryonic folate metabolism und mouse neural tube defects." *Science* **280**(5372): 2107-9.
- Foster, J. W., F. E. Brennan, et al. (1992). "Evolution of sex determination und the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials." *Nature* **359**(6395): 531-3.
- Frey, H. L. und J. Rajfer (1984). "Role of the gubernaculum und intraabdominal pressure in the process of testicular descent." *J Urol* **131**(3): 574-9.
- Fuchs, E. und C. Byrne (1994). "The epidermis: rising to the surface." *Curr Opin Genet Dev* **4**(5): 725-36.
- Garrett-Sinha, L. A., H. Eberspaecher, et al. (1996). "A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells und transiently in certain mesenchymal cells." *J Biol Chem* **271**(49): 31384-90.
- Gaubatz, S., A. Imhof, et al. (1995). "Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2." *Embo J* **14**(7): 1508-19.
- Giltay, R., R. Timpl, et al. (1999). "Sequence, recombinant expression und tissue localization of two novel extracellular matrix proteins, fibulin-3 und fibulin-4." *Matrix Biol* **18**(5): 469-80.
- Goh, D. W., W. Middlesworth, et al. (1994). "Prenatal androgen blockade with flutamide inhibits masculinization of the genitofemoral nerve und testicular descent." *J Pediatr Surg* **29**(6): 836-8.
- Gorlov, I. P., A. Kamat, et al. (2002). "Mutations of the GREAT gene cause cryptorchidism." *Hum Mol Genet* **11**(19): 2309-18.
- Gossen, M. und H. Bujard (1995). "Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary." *Biotechniques* **19**(2): 213-6; discussion 216-7.
- Greco, D., E. Zellmer, et al. (1995). "Transcription factor AP-2 regulates expression of the dopamine beta-hydroxylase gene." *J Neurochem* **65**(2): 510-6.
- Hall, M., F. Gofflot, et al. (2001). "Effects of the curly tail genotype on neuroepithelial integrity und cell proliferation during late stages of primary neurulation." *J Anat* **199**(Pt 6): 645-55.
- Harris, M. J. und D. M. Juriloff (1999). "Mini-review: toward understanding mechanisms of genetic neural tube defects in mice." *Teratology* **60**(5): 292-305.
- Hartshorne, G. M. (1997). "In vitro culture of ovarian follicles." *Rev Reprod* **2**(2): 94-104.
- He, W. W., M. V. Kumar, et al. (1991). "A frame-shift mutation in the androgen receptor gene causes complete androgen insensitivity in the testicular-feminized mouse." *Nucleic Acids Res* **19**(9): 2373-8.
- Hennighausen, L., R. J. Wall, et al. (1995). "Conditional gene expression in secretory tissues und skin of transgenic mice using the MMTV-LTR und the tetracycline responsive system." *J Cell Biochem* **59**(4): 463-72.

- Heyns, C. F. und J. M. Hutson (1995). "Historical review of theories on testicular descent." J Urol **153**(3 Pt 1): 754-67.
- Hilger-Eversheim, K., M. Moser, et al. (2000). "Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis und cell-cycle control." Gene **260**(1-2): 1-12.
- Hsu, S. Y. und A. J. Hsueh (1998). "A splicing variant of the Bcl-2 member Bok with a truncated BH3 domain induces apoptosis but does not dimerize with antiapoptotic Bcl-2 proteins in vitro." J Biol Chem **273**(46): 30139-46.
- Huff, D. S., D. M. Fenig, et al. (2001). "Abnormal germ cell development in cryptorchidism." Horm Res **55**(1): 11-7.
- Huff, D. S., F. Hadziselimovic, et al. (1991). "Early postnatal testicular maldevelopment in cryptorchidism." J Urol **146**(2 (Pt 2)): 624-6.
- Husmann, D. A. und J. B. Levy (1995). "Current concepts in the pathophysiology of testicular undescend." Urology **46**(2): 267-76.
- Hutson, J. M., S. W. Beasley, et al. (1988). "Cryptorchidism in spina bifida und spinal cord transection: a clue to the mechanism of transinguinal descent of the testis." J Pediatr Surg **23**(3): 275-7.
- Hutson, J. M., S. Hasthorpe, et al. (1997). "Anatomical und functional aspects of testicular descent und cryptorchidism." Endocr Rev **18**(2): 259-80.
- Ikegawa, S., T. Toda, et al. (1996). "Structure und chromosomal assignment of the human S1-5 gene (FBNL) that is highly homologous to fibrillin." Genomics **35**(3): 590-2.
- Imagawa, M., R. Chiu, et al. (1987). "Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C und cAMP." Cell **51**(2): 251-60.
- Jean, D., J. E. Gershenwald, et al. (1998). "Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 und an increase in tumor growth und metastasis of human melanoma cells." J Biol Chem **273**(26): 16501-8.
- Kaplan, L. M., M. A. Koyle, et al. (1986). "Association between abdominal wall defects und cryptorchidism." J Urol **136**(3): 645-7.
- Katz, J. P., N. Perreault, et al. (2002). "The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon." Development **129**(11): 2619-28.
- Kogan, B. A., R. Gupta, et al. (1987). "Fertility in cryptorchidism: further development of an experimental model." J Urol **137**(1): 128-31.
- Kohlbecker, A., A. E. Lee, et al. (2002). "Exencephaly in a subset of animals heterozygous for AP-2alpha mutation." Teratology **65**(5): 213-8.
- Kühnel, W. "Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischer Anatomie." Thieme.
- Kwan, K. M. (2002). "Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts." Genesis **32**(2): 49-62.
- Lakso, M., B. Sauer, et al. (1992). "Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6232-6.
- Le Douarin, K. (1999). "the neural crest." cambridge university press.
- Lecka-Czernik, B., C. K. Lumpkin, Jr., et al. (1995). "An overexpressed gene transcript in senescent und quiescent human fibroblasts encoding a novel protein in the epidermal growth factor-like repeat family stimulates DNA synthesis." Mol Cell Biol **15**(1): 120-8.
- Lue, Y. H., A. P. Hikim, et al. (1999). "Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity." Endocrinology **140**(4): 1709-17.
- Luscher, B., P. J. Mitchell, et al. (1989). "Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid und by second messengers." Genes Dev **3**(10): 1507-17.
- MacGregor, G. R., B. P. Zambrowicz, et al. (1995). "Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic und extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells." Development **121**(5): 1487-96.
- Marmorstein, L. Y., F. L. Munier, et al. (2002). "Aberrant accumulation of EFEMP1 underlies drusen formation in Malattia Leventinese und age-related macular degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13067-72.
- Matsushime, H., M. F. Roussel, et al. (1991). "Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle." Cell **65**(4): 701-13.
- Matzuk, M. M., K. H. Burns, et al. (2002). "Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation." Science **296**(5576): 2178-80.

- Maytin, E. V., J. C. Lin, et al. (1999). "Keratin 10 gene expression during differentiation of mouse epidermis requires transcription factors C/EBP und AP-2." Dev Biol **216**(1): 164-81.
- McPherson, L. A. und R. J. Weigel (1999). "AP2alpha und AP2gamma: a comparison of binding site specificity und trans-activation of the estrogen receptor promoter und single site promoter constructs." Nucleic Acids Res **27**(20): 4040-9.
- Migchielsen, A. A., M. L. Breuer, et al. (1995). "Adenosine-deaminase-deficient mice die perinatally und exhibit liver-cell degeneration, atelectasis und small intestinal cell death." Nat Genet **10**(3): 279-87.
- Miner, J. H., J. Cunningham, et al. (1998). "Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, und placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain." J Cell Biol **143**(6): 1713-23.
- Mitchell, P. J., P. M. Timmons, et al. (1991). "Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis." Genes Dev **5**(1): 105-19.
- Mitchell, P. J., C. Wang, et al. (1987). "Positive und negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen." Cell **50**(6): 847-61.
- Moase, C. E. und D. G. Trasler (1987). "Retinoic acid-induced selective mortality of splotch-delayed mouse neural tube defect mutants." Teratology **36**(3): 335-43.
- Mohibullah, N., A. Donner, et al. (1999). "SELEX und missing phosphate contact analyses reveal flexibility within the AP-2[alpha] protein: DNA binding complex." Nucleic Acids Res **27**(13): 2760-9.
- Morrish, B. C. und A. H. Sinclair (2002). "Vertebrate sex determination: many means to an end." Reproduction **124**(4): 447-57.
- Moser, M., A. Imhof, et al. (1995). "Cloning und characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 beta." Development **121**(9): 2779-88.
- Moser, M., A. Pscherer, et al. (1997). "Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta." Genes Dev **11**(15): 1938-48.
- Moser, M., J. Ruschoff, et al. (1997). "Comparative analysis of AP-2 alpha und AP-2 beta gene expression during murine embryogenesis." Dev Dyn **208**(1): 115-24.
- Neubuser, A., H. Peters, et al. (1997). "Antagonistic interactions between FGF und BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation." Cell **90**(2): 247-55.
- Noden, D. M. (1983). "The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, und muscle tissues." Dev Biol **96**(1): 144-65.
- Orban, P. C., D. Chui, et al. (1992). "Tissue- und site-specific DNA recombination in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 6861-5.
- Oulad-Abdelghani, M., P. Bouillet, et al. (1996). "AP-2.2: a novel AP-2-related transcription factor induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells." Exp Cell Res **225**(2): 338-47.
- Payne, J., F. Shibasaki, et al. (1997). "Spina bifida occulta in homozygous Patch mouse embryos." Dev Dyn **209**(1): 105-16.
- Pfisterer, P., J. Ehlermann, et al. (2002). "A subtractive gene expression screen suggests a role of transcription factor AP-2 alpha in control of proliferation und differentiation." J Biol Chem **277**(8): 6637-44.
- Regnier, C. H., R. Masson, et al. (2002). "Impaired neural tube closure, axial skeleton malformations, und tracheal ring disruption in TRAF4-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5585-90.
- Rose, G., I. D. Cooke, et al. (1983). "Vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences." Lancet **1**(8334): 1164-5.
- Sah, V. P., L. D. Attardi, et al. (1995). "A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly." Nat Genet **10**(2): 175-80.
- Satokata, I., G. Benson, et al. (1995). "Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice." Nature **374**(6521): 460-3.
- Sauer, C. G., K. White, et al. (2001). "EFEMP1 is not associated with sporadic early onset drusen." Ophthalmic Genet **22**(1): 27-34.
- Schorle, H., P. Meier, et al. (1996). "Transcription factor AP-2 essential for cranial closure und craniofacial development." Nature **381**(6579): 235-8.

- Segre, J. A., C. Bauer, et al. (1999). "Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin." Nat Genet **22**(4): 356-60.
- Seller, M. J. (1987). "Neural tube defects und sex ratios." Am J Med Genet **26**(3): 699-707.
- Seller, M. J. (1995). "Sex, neural tube defects, und multisite closure of the human neural tube." Am J Med Genet **58**(4): 332-6.
- Seller, M. J. und M. Adinolfi (1981). "The curly-tail mouse: an experimental model for human neural tube defects." Life Sci **29**(16): 1607-15.
- Seller, M. J. und K. J. Perkins-Cole (1987). "Sex difference in mouse embryonic development at neurulation." J Reprod Fertil **79**(1): 159-61.
- Shen, H., T. Wilke, et al. (1997). "Chicken transcription factor AP-2: cloning, expression und its role in outgrowth of facial prominences und limb buds." Dev Biol **188**(2): 248-66.
- Shi, D. und R. E. Kellems (1998). "Transcription factor AP-2gamma regulates murine adenosine deaminase gene expression during placental development." J Biol Chem **273**(42): 27331-8.
- Shields, J. M., R. J. Christy, et al. (1996). "Identification und characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest." J Biol Chem **271**(33): 20009-17.
- Shurtleff, D. B. (1986). "Meningomyelocele: a new or a vanishing disease?" Z Kinderchir **41 Suppl 1**: 5-9.
- Simpson, J. L. und A. Rajkovic (1999). "Ovarian differentiation und gonadal failure." Am J Med Genet **89**(4): 186-200.
- Skakkebaek, N. E., J. G. Berthelsen, et al. (1987). "Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes und precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma." Int J Androl **10**(1): 19-28.
- Snape, A. M., R. S. Winning, et al. (1991). "Transcription factor AP-2 is tissue-specific in *Xenopus* und is closely related or identical to keratin transcription factor 1 (KTF-1)." Development **113**(1): 283-93.
- Stone, E. M., A. J. Lotery, et al. (1999). "A single EFEMP1 mutation associated with both Malattia Leventinese und Doyme honeycomb retinal dystrophy." Nat Genet **22**(2): 199-202.
- Talbot, D., J. Loring, et al. (1999). "Spatiotemporal expression pattern of keratins in skin of AP-2alpha-deficient mice." J Invest Dermatol **113**(5): 816-20.
- Tallquist, M. D. und P. Soriano (2000). "Epiblast-restricted Cre expression in MORE mice: a tool to distinguish embryonic vs. extra-embryonic gene function." Genesis **26**(2): 113-5.
- Turner, B. C., J. Zhang, et al. (1998). "Expression of AP-2 transcription factors in human breast cancer correlates with the regulation of multiple growth factor signalling pathways." Cancer Res **58**(23): 5466-72.
- Tveter, K. J. und J. Fjaerli (1975). "Roentgenological findings in cryptorchidism." Scand J Urol Nephrol **9**(3): 171-3.
- van Straaten, H. W. und A. J. Copp (2001). "Curly tail: a 50-year history of the mouse spina bifida model." Anat Embryol (Berl) **203**(4): 225-37.
- Wang, W., X. Chen, et al. (1996). "Msx3: a novel murine homologue of the *Drosophila* msh homeobox gene restricted to the dorsal embryonic central nervous system." Mech Dev **58**(1-2): 203-15.
- Wang, W., H. E. Johansson, et al. (1997). "Expression of c-Myc, TGF-alpha und EGF-receptor in sporadic medullary thyroid carcinoma." Acta Oncol **36**(4): 407-11.
- Werling, U. und H. Schorle (2002). "Conditional inactivation of transcription factor AP-2gamma by using the Cre/loxP recombination system." Genesis **32**(2): 127-9.
- Werling, U. und H. Schorle (2002). "Transcription factor gene AP-2 gamma essential for early murine development." Mol Cell Biol **22**(9): 3149-56.
- Williams, L. J., C. T. Mai, et al. (2002). "Prevalence of spina bifida und anencephaly during the transition to mandatory folic acid fortification in the United States." Teratology **66**(1): 33-9.
- Williams, T., A. Admon, et al. (1988). "Cloning und expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements." Genes Dev **2**(12A): 1557-69.
- Williams, T. und R. Tjian (1991). "Characterization of a dimerization motif in AP-2 und its function in heterologous DNA-binding proteins." Science **251**(4997): 1067-71.

- Williamson, J. A., J. M. Boshier, et al. (1996). "Chromosomal mapping of the human und mouse homologues of two new members of the AP-2 family of transcription factors." Genomics **35**(1): 262-4.
- Winograd, J., M. P. Reilly, et al. (1997). "Perinatal lethality und multiple craniofacial malformations in MSX2 transgenic mice." Hum Mol Genet **6**(3): 369-79.
- Xu, Y., T. Ashley, et al. (1996). "Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, und thymic lymphoma." Genes Dev **10**(19): 2411-22.
- Zeng, Y. X., K. Somasundaram, et al. (1997). "AP2 inhibits cancer cell growth und activates p21WAF1/CIP1 expression." Nat Genet **15**(1): 78-82.
- Zhang, J., S. Hagopian-Donaldson, et al. (1996). "Neural tube, skeletal und body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2." Nature **381**(6579): 238-41.
- Zhang, W., D. E. Geiman, et al. (2000). "The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter." J Biol Chem **275**(24): 18391-8.
- Zhao, F., M. Satoda, et al. (2001). "Cloning und characterization of a novel mouse AP-2 transcription factor, AP-2delta, with unique DNA binding und transactivation properties." J Biol Chem **276**(44): 40755-60.
- Zhao, F., C. G. Weismann, et al. (2001). "Novel TFAP2B mutations that cause Char syndrome provide a genotype-phenotype correlation." Am J Hum Genet **69**(4): 695-703.
- Zhao, Q., R. R. Behringer, et al. (1996). "Prenatal folic acid treatment suppresses acrania und meroanencephaly in mice mutant for the Cart1 homeobox gene." Nat Genet **13**(3): 275-83.