

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Funktionelle Charakterisierung des
Transkriptionsfaktors AP-2δ**

Kristina Vaupel

aus

Wuppertal

2006

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn PD Dr. Markus Moser betreut und von Herrn Prof. Dr. Alexander Pfeifer vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 08.08.2006

Kristina Vaupel

Dissertation eingereicht am

1. Gutachter	PD Dr. Markus Moser
2. Gutachter	Prof. Dr. Alexander Pfeifer
Mündliche Prüfung am	10.11.2006

Meinen Eltern und meinem Bruder Matthias gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	Die Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren	7
1.1.1	Strukturelle Gemeinsamkeiten der AP-2 Proteine	7
1.1.2	Regulation der AP-2 Transkriptionsfaktoren auf mRNA-Ebene	11
1.1.3	Regulation der AP-2 Transkriptionsfaktoren auf Protein-Ebene	12
1.1.4	Expressionsmuster der AP-2 Proteine	13
1.1.5	Interaktionspartner von AP-2	17
1.1.6	Funktionen von AP-2	20
1.1.7	In vivo Funktionen von AP-2 Proteinen	22
1.2	Ziel der Arbeit	27
2	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	Allgemeine Geräte und Materialien	28
2.1.1	Material und Chemikalien für tierbiologische Experimente	28
2.1.2	Material, Geräte und Chemikalien für die Zellkultur	28
2.1.3	Material, Geräte und Chemikalien für die Molekularbiologie	28
2.1.4	Material und Chemikalien für das Yeast-two Hybrid System	28
2.1.5	Material und Chemikalien für die Biochemie und die Zellbiologie	29
2.1.6	Material und Chemikalien für die Histologie	29
2.1.7	Mikroskopische Systeme	29
2.1.8	Medien, Puffer und Lösungen	29
2.1.9	Vektoren und Konstrukte	36
2.1.10	Primer und Oligonukleotide	37
2.1.11	Organismen	38
2.1.12	Antikörper	39
2.2	Methoden	41
2.2.1	Tierbiologische Experimente und Techniken	41
2.2.2	Zellkultur adhärenter Säugerzellen	42
2.2.3	Kultur muriner embryonaler Stammzellen	43
2.2.4	Molekularbiologie	45
2.2.5	Das Yeast-Two Hybrid System	50
2.2.6	Biochemie und Zellbiologie	52
2.2.7	Histologische Untersuchungsmethoden	55
3	ERGEBNISSE	61

3.1	Expressionsanalysen von AP-2δ	61
3.2	Expression von AP-2δ in Neuronen des Mittelhirns	64
3.3	Zellkultur-basierte neuronale Modelle zur Analyse der AP-2δ Expression	64
3.4	Generierung eines AP-2δ-spezifischen, polyklonalen Antikörpers	66
3.5	Generierung AP-2δ-defizienter Mäuse	71
3.5.1	Klonierungsstrategie	72
3.5.2	Generierung der externen Probe	74
3.5.3	Homologe Rekombination des „Targeting Vectors“ in embryonale Stammzellen	74
3.5.4	Injektion und Transfer der homolog rekombinierten ES-Zellen in Blastozysten	75
3.5.5	Generierung homozygot defizienter AP-2 δ Mäuse	76
3.6	Analyse AP-2δ-defizienter Mäuse	77
3.6.1	Nachweis der Defizienz des AP-2 δ Gens	77
3.6.2	AP-2 δ -defiziente Mäuse vollenden die Embryogenese	78
3.6.3	Gewichts- und Wachstumsanalysen AP-2 δ -defizienter Mäuse	78
3.6.4	Hirnspezifische Analysen AP-2 δ -defizienter Mäuse	81
3.6.5	Fertilitätsstudien an AP-2 δ -defizienten Weibchen	88
3.6.6	Expressions- und Funktionsanalyse an der Retina von AP-2 δ Mutanten	100
3.7	Identifizierung von Interaktionspartnern von AP-2δ	105
3.7.2	Yeast Two-Hybrid Screen	106
3.7.3	Verifikation und Analyse positiver Klone	108
3.8	Analyse der AP-2δ Expression in AP-2β Mausmutanten	116
4	DISKUSSION	118
4.1	Expressionsmuster von AP-2δ	118
4.2	Analyse der AP-2δ Mausmutanten	120
4.2.1	Infertilität AP-2 δ -defizienter Weibchen	120
4.2.2	Untersuchungen des posterioren Mittelhirns AP-2 δ -defizienter Mäuse	123
4.2.3	Untersuchungen des Thalamus AP-2 δ -defizienter Mäuse	126
4.2.4	Untersuchungen der Retina von AP-2 δ Mausmutanten	127
4.3	Interaktionspartner von AP-2δ	128
4.4	Ausblick	130
4.4.1	Analyse von Hörstörungen mithilfe von AP-2 δ Mausmutanten	130
4.4.2	Identifizierung von AP-2 δ Zielgenen durch Microarray-Analysen	132

5	ZUSAMMENFASSUNG	133
6	LITERATUR	135
7	ANHANG	151
7.1.1	AP-2 Isoformen	151
7.1.2	Ermittelte Sequenzen und Leserahmen der Interaktoren	151
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	153
9	DANKSAGUNG	155
10	LEBENS LAUF	156

1 Einleitung

1.1 Die Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren

1987 gelang zwei Gruppen die Isolierung von AP-2 (Activator Protein-2), einem 52 kDa großen Protein aus Kernextrakten von HeLa-Zellen mittels Affinitätschromatographie. Dazu nutzten sie die Eigenschaft des Proteins an cis-regulatorische Sequenzen des viralen SV40 und des humanen Metallothionein IIa (hMT IIa) Promotors zu binden (Mitchell et al., 1987; Imagawa et al., 1987). Dieses Protein verfügte lediglich über einige strukturelle Ähnlichkeiten zur Prolin-reichen Transaktivierungsdomäne der Transkriptionsfaktoren NF-1 (Mermod et al., 1989) und OTF-2 (Gerster et al., 1990), wies aber sonst keine Homologie zu bereits bekannten DNA-bindenden Proteinen auf. Das Screening einer HeLa-cDNA-Bank mit synthetischen Oligonukleotiden, die von der Peptidsequenz des Proteins abgeleitet wurden, erbrachte ein Jahr später die komplette cDNA Sequenz des Proteins (Williams et al., 1988). Im Gegensatz zu vielen anderen Familien entwicklungsbiologisch bedeutsamer Transkriptionsfaktoren wurde zunächst angenommen, daß es sich um ein einzelnes Protein handelt, welches auf Chromosom 6p22.3 lokalisiert ist (Gaynor et al., 1991).

Eine zweite AP-2 Isoform wurde 1995 durch das Screening einer humanen cDNA-Bank mit einem humanen AP-2 α cDNA-Fragment isoliert (Moser et al., 1995). Inzwischen wurden neben AP-2 α und AP-2 β drei weitere Isoformen in Mensch und Maus charakterisiert: AP-2 γ (Chazaud et al., 1996; Oulad-Abdelghani et al., 1996; Williamson et al., 1996), AP-2 δ (Zhao et al., 2001a; Cheng et al., 2002) und AP-2 ϵ (Feng und Williams, 2003; Tummala et al., 2003). *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* verfügen bislang über jeweils eine Isoform (Bauer et al., 1998; Monge and Mitchell, 1998; Winning et al., 1991), die im Bereich der DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne weitgehende Homologien zu humanen und murinen Isoformen aufweisen, was auf eine evolutionäre Konservierung der AP-2 Proteinfamilie hindeutet.

1.1.1 Strukturelle Gemeinsamkeiten der AP-2 Proteine

Footprint-Analysen, anschließende DNase I-Verdaue, sowie später folgende in vitro Analysen von Sequenzbereichen im 5'-Bereich des Transkriptionsstarts der SV40- und der hMT IIA-Gene führten zur Identifizierung der AP-2 Bindestelle (Mitchell et al., 1987; Mohibullah et al., 1999). Dabei handelt es sich um eine konservierte, palindromische und GC-reiche Erkennungssequenz 5'-GCCN₃GGC-3', die in cis-regulatorischen Regionen wie Promotorbereichen und Basal Level Enhancer (BLE) Elementen zahlreicher eukaryontischer und viraler Gene zu finden ist. Mutationsanalysen haben gezeigt, daß diese Sequenz für eine AP-2-vermittelte Aktivierung der Transkription von Zielgenen unentbehrlich ist (Hyman et al., 1989). Die AP-2-spezifische Bindestelle ist in einer Vielzahl cis-regulatorischer Sequenzen vorhanden und dient so der Aktivierung der Zielgene: *p21*^{WAF/CIP} (Zeng et al., 1997), *Tgf- α* (Wang et al., 1997), Östrogen-Rezeptor (McPherson et al., 1997), Keratinozyten-

spezifische Gene (Keratin *K1*: Oyama et al., 2002; Keratin *K5*: Byrne und Fuchs, 1993; Keratin *K10*: Maytin et al., 1999; Keratin *K14*: Sinha et al., 2000), EGF-Rezeptor (Wang et al., 2006), Tyrosin-Kinase-Rezeptor Gen *c-KIT* (Huang et al., 1998), *HIV Typ-1* (Perkins et al., 1994), *HTLV-1* (Nyborg und Dynan, 1990; Muchardt et al., 1992), Typ IV Collagenase (Frisch und Morisaki, 1990), *SV40* (Mitchell et al., 1987), *hMT IIa* (Mitchell et al., 1987), *c-erbB2* (Bosher et al., 1995; Bosher et al., 1996), Insulin-like Growth Factor Binding-5 (Duan und Clemmons, 1995) und Dopamin- β -Hydroxylase (Greco et al., 1995). Andererseits können AP-2 Proteine die Transkription der Zielgene auch negativ regulieren: so reprimieren AP-2 Proteine die Transkription von *MCAM/MUC18* (Jean et al., 1998) und von *c/EBP- α* (Jiang et al., 1998).

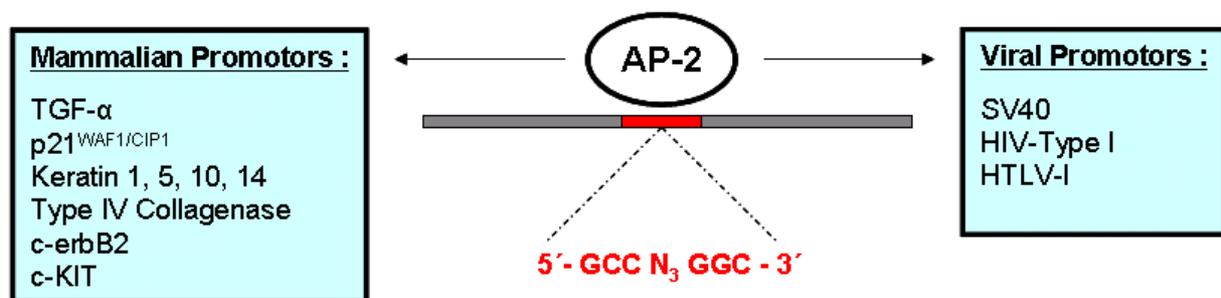


Abb. 1 : AP-2-vermittelte Transaktivierung von eukaryontischen und viralen Zielgenen durch Bindung von AP-2 Transkriptionsfaktoren an AP-2-spezifische Bindungsstellen in Promotor- und Enhancerbereichen.

AP-2 Proteine besitzen neben dem AP-2-spezifischen Bindemotiv eine gemeinsame Domänenstruktur, bestehend aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne, einer zentralen, basischen Region, die die Bindung an die DNA vermittelt und zwei C-terminalen α -Helices zur funktionalen Dimerisierung von AP-2 Proteinen. Mutationsanalysen der N-terminalen, Prolin- und Glutamin-reichen Transaktivierungsdomäne des humanen AP-2 Proteins wiesen einen 65 Aminosäuren umfassenden Kernbereich, der sich zwischen den Aminosäuren 52 bis 117 des AP-2 α Proteins erstreckt, als essentiell für die Transaktivierung aus (Williams and Tjian, 1991a; Wankhade et al., 2000). Im Gegensatz zur C-terminalen DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne weist die Transaktivierungsdomäne nur wenige konservierte Reste und Motive auf: so beinhaltet die Transaktivierungsdomäne ein zentrales, konserviertes PY-Motiv, sowie weitere konservierte Reste z.B. an den Positionen 89 (Glutamin) und 85 (Asparagin), deren Mutation die Aktivität des Transkriptionsfaktors reduziert (Abb. 2).

mAP-2 α	1	MLWKLTDNFKYEDCEDRHDGTSNGTARLPQLGTUGQSPYTSAPPLSHT----	PMEDFQP
mAP-2 β	1	MLWKLTDNFKYEDCEDRHDGVPSHSRLSQLGSUSQSPYTSAPPLSHT----	PSDFQP
mAP-2 γ	1	MLWKLTDNFKYEDCEDRHDSSSNGNPRIPHLSSPGQHLYSAPPLSHT----	GUPYQP
mAP-2 δ	1	MSTTFPGLDADIRHDGSMYSYRLMQLGCLSSUNSTVAYSSSSPLTYS---	TTGTFAS
mAP-2 ϵ	1	-----LVHTYSAMERPDGLGSAAGGTRLSSLPQSAYGPAPPLCHTPAASADDF	
TRANSAKTIVIERUNG			
mAP-2 α	56	P-YFPPPYQPYPQ-SIDFYSHUNDFYS--LMLHA-----QPQPHGQPGQRQSQE	
mAP-2 β	57	P-YFPPPYQPPYHCSIDFYSHUNDFYS--LMLHQ-----PQQHFGQQRQRQEVGSE	
mAP-2 γ	57	PPYFPPPYQQQVYSQSDFYSHUNDFYS--LMLHQPAT--SQQQQMPGRQSQECSLS	
mAP-2 δ	58	P-YFSTNHQYTFELHQQSFYEFQHSHPVUTPDAYS LN-----SLHRSQQYQQIHG	
mAP-2 ϵ	53	P-YFPPPYQPAPLPYGGGDETAADEHLE--ADPYGGLSPLQPPQAPQAAAPRA	
mAP-2 α	107	-LLNTHRELPHQLSGLDP-----RRDYRRMEDLLHGPHALCSGLGDLF-----	IN
mAP-2 β	109	SLLPQPRALPQLSGLDP-----RRDYRSORRPDUHLHSAHGLDAGMGDSL	SLHGLGN
mAP-2 γ	117	-HHSRSASLIPHLISGLEGGVSUSARREUYRSDLLPHAHALEAGLAENLG-----	IN
mAP-2 δ	112	DFIQLHNRALKSSCLDEQRRELGCLEAYRRHDLSLSHCSQYGGHPDQR-----	DL
mAP-2 ϵ	111	DEPPGLLPPARALGLDP-----RRDYAAAPRLLHSLADGHNGLADDELG-----	LPGL
mAP-2 α	151	SLPHSIEDPPEHDPGIDIPDQTVIKKGFUSLSEKSNSEVSAIPDKKMLFG--G	UNPME
mAP-2 β	163	PGMEDVQSDADANSGAMLLDQSVIKKGFPPK-----SUTSLMADKDGFLGG	SMTCG
mAP-2 γ	168	EMARP IEEVQMDADAHLLHDQTVIKKGFISITEN-----PLGLPCQKDLUG	QDNPSE
mAP-2 δ	164	PGPGLGLAASDIDLQGSVEEQCGIULNGQGGVIR-----RGGTQUMPTD	
mAP-2 ϵ	161	AEPGLEELQADDPGMSLLDQSVIKKGFIPSKAG---SLSLALSKDSLUG--G	SNPSE
DNA-BINDUNG			
mAP-2 α	210	VFCSUPGRLSLLSSTSKYKUTVAEVQRRLSPPECLNASLLGGULRRAKSKNGGRSLREKL	
mAP-2 β	218	VFCSUPGRLSLLSSTSKYKUTVAEVQRRLSPPECLNASLLGGULRRAKSKNGGRSLREKL	
mAP-2 γ	222	VFCSUPGRLSLLSSTSKYKUTVAEVQRRLSPPECLNASLLGGULRRAKSKNGGRSLREKL	
mAP-2 δ	210	VFCSUPGRLSLLSSTSKYKUTVAEVQRRLSPPECLNASLLGGULRRAKSKNGGRSLREKL	
mAP-2 ϵ	217	VFCSUPGRLSLLSSTSKYKUTVAEVQRRLSPPECLNASLLGGULRRAKSKNGGRSLREKL	
mAP-2 α	270	DKIGLNLPAGRRKAANUTLLTSLVEGEAVHLARDFGYUCETEFPAKAVAEFLNRQHS	DP-
mAP-2 β	278	EKIGLNLPAGRRKAANUTLLTSLVEGEAVHLARDFGYUCETEFPAKAVSEYLN	RQHNDP-
mAP-2 γ	282	DKIGLNLPAGRRKAANUTLLTSLVEGEAVHLARDFGYUCETEFPKAVADYLT	TRPHLGGR
mAP-2 δ	270	DRIGLNLPAGRRKAANUTLLTSLVEGEAVHLARDFGYUCETEFPKAVGEHL	ARQHAQ-
mAP-2 ϵ	277	EKIGLNLPAGRRKAANUTLLTSLVEGEAVHLARDFGYUCETEFPKAVAEYLC	RQHNDP-
DIMERISIERUNG			
mAP-2 α	329	MEQVARKMILLATKQICKETFDLLAQDRSPLGNSRPP ILEPGIQSCLTHFSLITHGFGS	
mAP-2 β	337	SDLHRRKMILLATKQICKETFDLLAQDRTPIGNSRPP ILEPGIQSCLTHFSLITHGFGS	
mAP-2 γ	342	MEMATRKSILLASQQUCKETFDLLAQDRTPMGNRP AQULEPPIQNCLEHFSLITHGFGS	
mAP-2 δ	329	KEQTARKMILLATKQICKETFDLLAQDRSPLGNSRPP ILEPDLIQRHLTHFSLITHGFGT	
mAP-2 ϵ	336	GELHRRKSILLATKQICKETFDLHAQDRSPLGNSRPP ILEPGIQSCLTHFSLITHGFGS	
mAP-2 α	389	PAICAALTALQNYLTELKAMDKMMLSNMPSMSTDN-----SAKSSDKKEEKHRK-	
mAP-2 β	397	PAICAALTALQNYLTELKAMDKMMLMNTMRTSGE-----GPGSKTGKKEEKHRK-	
mAP-2 γ	402	QAICAALSAQNYLTELALIAIDKSNMPPGDQSPADS-----SKTMEKKEEKHRK-	
mAP-2 δ	389	PAICAALSTIQTLSEMLNYLEKHTTHQGGADSGQGHANSEKAPLRKASEAAQKEGKT	
mAP-2 ϵ	396	PAICAALTALQNYLTELKGLKEMMLSGAGGGGGS-----KASEKDKKHRK-	
mAP-2 α	----		
mAP-2 β	----		
mAP-2 γ	----		
mAP-2 δ	449	EKTD	
mAP-2 ϵ	----		

Abb. 2: Vergleich der Proteinsequenzen der murinen AP-2 Familie. Identische Aminosäuren sind in schwarzen Kästchen, ähnliche Aminosäuren in grauen Boxen dargestellt. Konservierte Reste der Transaktivierungsdomäne sind gelb markiert.

Die C-terminale Dimerisierungsdomäne besteht aus zwei amphipatischen α -Helices, die durch einen Bereich von ca. 80 Aminosäuren (span) getrennt werden. Entsprechend der Familie der basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktoren, deren amphipatische α -Helices durch 10-20 Aminosäuren umfassende Polypeptidschleifen (loops) getrennt werden, wird diese für AP-2 Proteine typische DNA-Bindungs- und Dimerisierungsstruktur als helix-span-helix Motiv bezeichnet. Kotranslationsexperimente mit wildtyp-AP-2 Proteinen und AP-2 Deletionsmutanten ohne Transaktivierungsdomäne, konnten im Electromobility Shift Assay (EMSA) mit einem radioaktiv markierten hMt Ila-Oligonukleotid durch die Bildung eines intermediär shiftenden Proteinkomplexes nachweisen, daß AP-2 Proteine neben Homodimeren auch Heterodimere bilden können. Die Bildung von Homo- und Heterodimeren ist darüber hinaus essentiell für eine DNA-Bindung (Williams and Tjian, 1991a; Williams und Tjian, 1991b). Die basische Domäne, sowie die erste α -Helix, die durch das 4., 5. und 6. Exon kodiert werden (Bauer et al., 1994), sind zwischen Drosophila (Bauer et al., 1998; Monge and Mitchell, 1998), Xenopus (Snape et al., 1991; Winning et al., 1991), Vögeln (Chen et al., 1997), sowie murinen und humanen AP-2 Isoformen nahezu identisch.

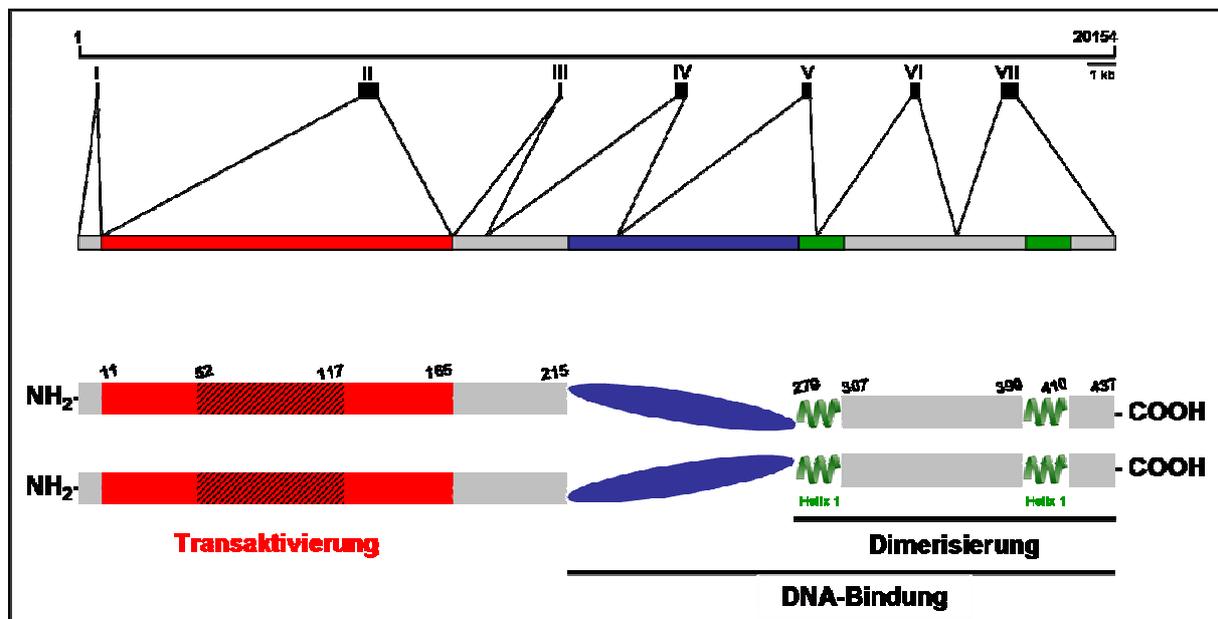


Abb. 3: Oben: Exon-Intron Struktur des humanen AP-2 α Gens und relative Positionen der AP-2 α -kodierenden Exone (gefüllte Kästchen mit römischen Zahlen I-VII) (modifiziert nach Bauer et al., 1994). Unten: Domänenstruktur des humanen AP-2 α Proteins als Homodimer. Die Nummern der Aminosäuren entsprechen ihrer Position im humanen AP-2 α Protein (modifiziert nach Williams and Tjian, 1991a).

1.1.2 Regulation der AP-2 Transkriptionsfaktoren auf mRNA-Ebene

AP-2 Transkriptionsfaktoren können auf der Ebene der Transkription und ebenso auf Protein-Ebene reguliert werden. Auf der Ebene der Transkription kann die Expression der AP-2 Gene durch cis-regulatorische Elemente reguliert werden, die mithilfe von Promotoranalysen identifiziert werden konnten. Die meisten Studien wurden bislang am AP-2 α Promotor durchgeführt und führten somit zur Charakterisierung einiger cis-regulatorischer Elemente, die die Transkription der AP-2 α mRNA regulieren.

Erste Studien zeigten, daß der AP-2 α Promotor über keine typischen cis-regulatorischen Motive wie TATA- oder CCAAT-Boxen verfügt (Creaser et al., 1996). Damit ähnelt der AP-2 α Promotor z.B. den Promotoren von beständig exprimierten house-keeping Genen, die ebenfalls nicht über eine TATA-Box verfügen (Smale, 1994). Demgegenüber konnte ein Initiator-Element, sowie eine octamer consensus sequence identifiziert werden, die für die basale AP-2 α Expression verantwortlich sind (Creaser et al., 1996). Das Octamer-bindende Protein Oct-1 kann spezifisch an diese octamer consensus sequence binden und wird Zelltyp-spezifisch exprimiert (Scholer, 1991; Herr, 1992; Creaser et al., 1996). Darüberhinaus konnten weitere cis-regulatorische Elemente, wie z.B. Enhancer-Elemente im 5. Intron charakterisiert werden, die die Expression von AP-2 α im Rückenmark, in der Epidermis, in den Trigeminalganglien und besonders im Gesicht, sowie in den vorderen Extremitäten steuern (Zhang und Williams, 2003).

Der Promotorbereich des AP-2 α Gens weist zudem drei AP-2 Bindestellen auf, die nicht zur basalen AP-2 Genexpression beitragen, sondern autoregulatorische Funktion besitzen, indem sie durch AP-2 Proteine, deren Spleißvarianten und AP-2-verwandte Proteine gebunden werden können (Bauer et al., 1994; Creaser et al., 1996). So kann z.B. die distale AP-2 Bindestelle (A32, an Position -326) durch die zwei Transkriptionsfaktoren BTEB-1 und AP-2rep gebunden werden, die hohe Homologien zu Transkriptionsfaktoren der wt-1/egr-Familie aufweisen (Imhof et al., 1999). Transfektionsstudien wiesen den Transkriptionsfaktor BTEB-1 als Aktivator des AP-2 α Promotors aus (Imataka et al., 1994), während AP-2rep die Genexpression am AP-2 α Promotor reprimiert. Da AP-2rep zu einer Familie von Repressoren gehört, die als Silencer die Expression embryonaler Gene reprimieren, könnte AP-2rep eine wichtige Rolle für die terminale Differenzierung muriner Gewebe während der Embryogenese spielen (Imhof et al., 1999).

Das Morphogen Retinsäure nimmt bei der Organentwicklung vieler Vertebraten eine zentrale Stellung ein, da Retinsäure durch die Ausbildung eines Retinsäure-Gradienten die Differenzierung zahlreicher Organe und Strukturen induziert (Thaller und Eichele, 1987). Frühe Expressionsstudien zeigten, daß AP-2 hauptsächlich in Retinsäure-sensitiven Geweben wie der Haut, dem Gesichtsmesenchym und dem Nervensystem exprimiert wird (Mitchell et al., 1991). Tatsächlich konnte eine erhöhte Expression von AP-2 α und AP-2 γ in verschiedenen, mit Retinsäure behandelten Zellen nachgewiesen werden (Williams et al., 1988; Lüscher et al., 1989; Mitchell et al., 1991; Oulad-Abdelghani et al., 1996). Da die AP-2 α Expression nach der Inkubation von NT2-Teratocarcinoma-Zellen mit Retinsäure nur kurzzeitig erhöht war und lediglich vorübergehend anhielt, ist zu vermuten, daß der AP-2 α Promotor

nicht direkt durch eine Retinsäure-aktivierte Signalkaskade induziert wird (Lüscher et al., 1989). Da bislang kein Retinsäure-responsives Element im AP-2 α Promotorbereich nachgewiesen werden konnte, ist unklar, wie die transiente Induktion von AP-2 α durch Retinsäure erfolgt. Eine Induktion von AP-2 γ durch Retinsäure konnte in P19-Zellen beschrieben werden, die vermutlich durch ein Retinsäure-responsives Element im AP-2 γ Promotorbereich vermittelt wird (Oulad-Abdelghani et al., 1996).

1.1.3 Regulation der AP-2 Transkriptionsfaktoren auf Protein-Ebene

Auf Protein-Ebene kann die Aktivität von AP-2 Proteinen maßgeblich durch die Aktivität von sekundären Botenstoffen (second messenger), durch Abbau-Prozesse, sowie durch Protein-Protein-Interaktionen reguliert werden.

In in vitro Studien mit verschiedenen Zelllinien wurde der Effekt des Phorbolesters TPA, einem Diacylglycerol (DAG)-Analog und Forskolin auf die Expression von AP-2 untersucht (Imagawa et al., 1987; Hyman et al., 1989; Lüscher et al., 1989). Nach der Stimulierung der Zellen mit TPA konnte jedoch keine erhöhte AP-2 Expression nachgewiesen werden. Die Behandlung der Zellen mit TPA stimulierte lediglich die DNA-Bindung von AP-2 Proteinen an AP-2 Bindestellen in Promotorbereichen und führte zu einer erhöhten Transaktivierung von AP-2 Zielgenen. Daher lassen diese Experimente vermuten, daß die Aktivität von AP-2 Proteinen durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden kann. Eine direkte Regulation von AP-2 Proteinen durch einen DAG/TPA-vermittelten Protein Kinase C-Signalweg konnte dagegen noch nicht beschrieben werden. Demgegenüber kann AP-2 in vitro und in vivo vermutlich durch die **cAMP-abhängige Protein Kinase A** reguliert werden (Park und Kim, 1993). Genauere Analysen haben ergeben, daß diese Regulation auf der Phosphorylierung des Serins an der Position 239 beruht und zu einer erhöhten Aktivität von AP-2 führt (Garcia et al., 1999).

In vielen Tumoren und Tumorzelllinien wurden hohe AP-2 Spiegel detektiert. Eine mögliche Ursache könnte in fehlerhaften Abbauprozessen, wie z.B. der Ubiquitynylierung liegen, die in erhöhten Halbwertszeiten von AP-2 Proteinen in Tumorzellen resultieren. Die Regulation von AP-2 durch **Ubiquitynylierung** konnte mithilfe von Studien an Brustkrebs-Zelllinien, die AP-2 α und AP-2 γ überexprimieren, nachgewiesen werden: AP-2 Proteine werden in Tumorzellen im Vergleich zu untransformierten Zellen in geringerem Maße ubiquitynyliert (Bosher et al., 1996; Li et al., 2006). Li und Kollegen vermuteten daher, daß Tumorzellen Proteine, die für den Abbau durch das Proteasom bestimmt sind, nicht korrekt ubiquitynylieren können (Li et al., 2006).

Bereits zuvor konnte die Interaktion des E2-konjugierenden Enzyms UBC9 mit AP-2 α beschrieben werden (Eloranta und Hurst, 2002). Das E2-konjugierende Enzym übernimmt ein aktiviertes SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier)-Protein vom E1-Enzym und überträgt es auf die E3-Ligase, die die Verknüpfung von SUMO mit einem speziellen Lysin-Rest des Substrates katalysiert. So konnte für AP-2 α neben der Interaktion von UBC9 auch die Markierung von AP-2 α durch Sumoylierung eines N-terminalen Lysinrests an der Position 10 beschrieben werden. Diese Sumoylierung setzt die transkriptionelle Aktivität von AP-2 α herab, zum einen eventuell durch die Maskierung von

Bindestellen für Coaktivatoren (Eloranta und Hurst, 2002). Infolge der Sumoylierung ist aber auch eine Lokalisation des sumoylierten AP-2 α 's in inaktive subnukleäre Kompartimente denkbar, wie es bereits für den Transkriptionsfaktor p73 beschrieben wurde (Minty et al., 2000; Eloranta und Hurst, 2002). Da die **Sumoylierung** im Gegensatz zur Ubiquitylierung Proteine nicht für den Abbau markiert, sondern lediglich ihre Stabilität erhöht (Muller et al., 2001), könnte die Sumoylierung neben der fehlerhaften Ubiquitylierung ein weiterer Grund für die erhöhte Halbwertszeit von AP-2 Proteinen in Tumoren zu sein.

Neben der Ubiquitylierung wurde auch die TNF- α -vermittelte Induktion von apoptotischen Prozessen in Tumorzellen analysiert (Rath und Aggarwal, 1999; Nyormoi et al., 2001). Erste Beobachtungen hatten gezeigt, daß TNF- α zur Reduktion der AP-2 α Expression in Brustkrebszellen führt. Genauere Analysen ergaben, daß AP-2 α infolge der TNF- α -vermittelten Induktion der **Apoptose** durch die Caspase-6 gespalten und anschließend durch das Proteasom abgebaut wird (Nyormoi et al., 2001).

Die Aktivität von AP-2 Proteinen kann zudem negativ durch **Protein-Protein-Wechselwirkungen** reguliert werden, indem AP-2 Proteine von anderen DNA-bindenden Proteinen durch Konkurrenz von ihrer spezifischen Bindestelle verdrängt werden (Isreal et al., 1989; Mercurio and Karin, 1989; Courtois et al., 1990). Durch Untersuchungen der Enhancer-Region des DNA-Tumovirus SV40 konnten Mitchell und Kollegen Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-2 und AP-3 beschreiben, die nebeneinander angeordnet sind. Weitere Analysen dieser Region ergaben, daß sich diese Bindestellen auch teilweise überlappen, was zur Verdrängung von AP-2 durch die Bindung von AP-3 an die AP-3 Bindestelle führen kann (Mercurio und Karin, 1989). Die DNA-Bindung von AP-2 an den SV40 Enhancer, sowie an den humanen Metallothionein IIa Promotor kann ebenfalls durch die Interaktion des SV40 T-Antigens mit AP-2 verhindert werden (Mitchell et al., 1987). Ebenso wird AP-2 zum einen durch NF κ B vom murinen H-2K^b Promotor nach Stimulation mit TNF- α verdrängt (Isreal et al., 1989), zum anderen kann die DNA-Bindung durch AP-2 im hGH Promotor durch NF-1 verhindert werden (Courtois et al., 1989).

1.1.4 Expressionsmuster der AP-2 Proteine

Die Expression der AP-2 Proteine während der murinen Embryonalentwicklung, sowie in adulten Mäusen wurde mithilfe von in situ Hybridisierungen und RT-PCR-Analysen untersucht. Von den 5 in der Maus bekannten AP-2 Genen werden AP-2 α , AP-2 β und AP-2 γ in einer Vielzahl ektodermaler, neuroektodermaler und mesodermaler Gewebe exprimiert, während AP-2 δ und AP-2 ϵ überwiegend in neuronalen Geweben gebildet werden.

1.1.4.1 Erste Expression von AP-2 Proteinen in frühen Embryonalstadien

Neuere Studien zur Genexpression an präimplantierten Mausembryonen zeigten, daß maternale Transkripte der AP-2 Isoformen AP-2 β , AP-2 γ und AP-2 ϵ bereits in unbefruchteten Oozyten detektiert

werden, jedoch nimmt ihre Expression nach der Befruchtung mit der Aktivierung des genetischen Programms der Zygote ab (Hamatani et al., 2004; Wang et al., 2004a; Zeng et al., 2004; Pan et al., 2005; Winger et al., 2006). Während die Expression von AP-2 β erst wieder mit dem Beginn der Gastrulation zu beobachten ist, werden AP-2 γ und AP-2 ϵ auch im weiteren Verlauf der Präimplantationsentwicklung exprimiert (Winger et al., 2006). Mit der Einnistung des Embryos in den Uterus kann erstmalig AP-2 α detektiert werden, sodaß AP-2 α , AP-2 γ und AP-2 ϵ in der Blastula koexprimiert werden (Winger et al., 2006). Im Zuge der Differenzierung der embryonalen Zellen in Trophoblastenzellen und Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden alle AP-2 Isoformen bis auf AP-2 δ in Zellen des Trophoblasten wie auch in ES-Zellen koexprimiert (Chazaud et al., 1996; Moser et al., 1997b; Winger et al., 2006). Die Expression von AP-2 δ während der Präimplantationsphase, während des Blastula- und des Gastrula-Stadiums konnte bisher nicht beobachtet werden und wurde erstmalig mit der Differenzierung des Nervensystems am Tag E9.5 beschrieben (Zhao et al., 2003).

1.1.4.2 AP-2 Expression in Neuralleistenzellen

Die Neuralleisten sind eine transiente Struktur ektodermaler Stammzellen, die während der Neurulation durch den Verschuß des Neuralrohrs dorsolateral zu beiden Seiten des Neuralrohres strangartig angelegt werden. Aufgrund der Expression spezieller Transkriptionsfaktoren in den Neuralleistenzellen beginnen Zellen diese Epithelschicht zu verlassen und wandern in dorsolateraler und ventrolateraler Richtung vom Neuralrohr aus (Carl et al., 1999; LaBonne und Bronner-Fraser, 2000; Barembaum and Bronner-Fraser, 2005). Unter dem Einfluß der Zielregion beginnen sich die Neuralleistenzellen zu differenzieren und tragen so zur Bildung vieler Gewebe- und Organstrukturen bei. Craniale Neuralleistenzellen des Vorder- und des Mittelhirns wandern dorsolateral und bilden das cranio-faciale Mesenchym, welches sich in Binde- und Knorpelgewebe, sowie in Knochen des Gesichts und in Neuronen und Gliazellen des Kopfes differenziert. Craniale Neuralleistenzellen des Hinterhirns wandern ventrolateral in die Kiemenbögen ein und tragen zur Bildung des Thymus, der Odontoblasten der Zahnanlagen, der Gehörknöchelchen und der Kieferknochen bei. Die Neuralleistenzellen des Herzens wandern in den Ausflußtrakt des Herzens ein und tragen dort unter anderem zur Bildung des Septums bei, welches die Aorta von der Lungenarterie trennt (Jiang et al., 2000). Früh migrierende Neuralleistenzellen des Rumpfes wandern ventrolateral durch die anterioren Hälften der Sklerotome und bilden sympathische Ganglien, das Nebennierenmark und das Nervengeflecht der Aorta. Neuralleistenzellen, die in den Sklerotomen verbleiben, bilden die dorsalen Wurzelganglien. Demgegenüber wandern die spät-migrierenden Neuralleistenzellen dorsolateral in das Ektoderm ein und bilden dort die Pigmentzellen der Haut (Gilbert, 2003; Trainor, 2005).

Bereits zum Zeitpunkt E8.0 werden AP-2 α , AP-2 β und AP-2 γ in prä-migratorischen Neuralleistenzellen exprimiert. Im weiteren Verlauf der Embryogenese werden AP-2 α , AP-2 β und AP-2 γ zunächst in Derivaten cranialer Neuralleistenzellen wie dem Kopfmesenchym, dem Gesichtsmesenchym und dem Mesenchym des ersten Kiemenbogens exprimiert. Gleichzeitig exprimieren kardiale Neuralleistenzellen zusätzlich zu den cranialen Neuralleistenzellen ebenfalls AP-2 α und AP-2 β (Brewer et al., 2002). Später kann die Expression von AP-2 α und AP-2 β zusätzlich in Derivaten von

Neuralleistenzellen des Rumpfes wie den dorsalen Wurzelganglien beobachtet werden. Die Expression von AP-2 γ beschränkt sich dagegen auf die cranialen Ganglien (Chazaud et al., 1996). Die Expression von AP-2 α und AP-2 β beginnt sich indes auszudehnen und zu spezifizieren. So kann AP-2 α exklusiv im Nervus Trigemini und im unteren Zungen-Rachennerv detektiert werden, während AP-2 β ausschließlich in sympathischen und parasympathischen Ganglien exprimiert wird (Mitchell et al., 1991; Moser et al., 1997b). Die Expression von AP-2 β und AP-2 γ geht ab dem Tag E11.5 in den peripheren Ganglien zurück, während AP-2 α -spezifisches Transkript auch zu späteren Embryonalphasen z.B. in der Hornhaut als einem weiteren Derivat der Neuralleistenzellen detektiert werden kann (Mitchell et al., 1991; Chazaud et al., 1996; Moser et al., 1997b). Obwohl AP-2 δ und AP-2 ϵ ebenfalls in frühen Embryonalstadien exprimiert werden und AP-2 ϵ darüberhinaus zwischen E8.5 und E9.5 in den Neuralfalten exprimiert wird, ist keine Expression von AP-2 δ und AP-2 ϵ in Neuralleistenzellen oder ihren Derivaten zu beobachten.

1.1.4.3 Neuronale Expression von AP-2 Proteinen

Alle AP-2 Proteine werden im embryonalen Gehirn gebildet und eine Koexpression aller AP-2 Isoformen ist in frühen Embryonalphasen im Mittel-Hinterhirnbereich zu beobachten. Im Laufe der Embryogenese beginnen sich die neuronalen Expressionsmuster der einzelnen Isoformen zu differenzieren und spezifizieren sich in späteren Entwicklungsstadien in einem für die jeweilige Isoform charakteristischen Hauptexpressionsort.

Während **AP-2 α** und **AP-2 β** am Tag E9.5 und E10.5 noch parallel im Mittel- und im Hinterhirn exprimiert werden, trennen sich die Expressionsmuster beider Isoformen am Tag E11.5. Die Expression von AP-2 α nimmt im Mittelhirn ab und verlagert sich caudal, sodaß AP-2 α verstärkt im Hinterhirn und in der Anlage des zukünftigen Cerebellums detektiert werden kann. Demgegenüber nimmt die Expression von AP-2 β im Mittelhirn zu und konzentriert sich im Bereich des Mittelhirndachs und in der Grenzregion von Mittel- und Hinterhirn (Mitchell et al., 1991, Moser et al., 1997b). Studien an den Kleinhirnen adulter Mäuse zeigen eine Koexpression von AP-2 α und AP-2 β in den Purkinje-Zellen mit einem stärkeren Signal für AP-2 α , sowie eine zusätzliche Expression von AP-2 β in der Körnerschicht. Beide Isoformen werden ebenfalls in den Pyramidenzellen des Hippocampus nachgewiesen, im Gegensatz zum Expressionsmuster beider Isoformen im Cerebellum dominiert jedoch das AP-2 β -spezifische Signal (Shimada et al., 1999).

Die Expression von **AP-2 γ** wird am Tag E9.5 im Vorderhirn detektiert und fokussiert sich im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung auf den dorsalen Teil des Vorderhirns, der den zukünftigen cerebralen Cortex bildet (Chazaud et al., 1996).

Erste Expressionsstudien mit der **AP-2 δ** Isoform zeigen ein diffuses Expressionsmuster zwischen E9.5 bis E12.5 im Mittelhirn, im Hinterhirn und im Vorderhirn. Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung konzentriert sich die Expression von AP-2 δ auf das Diencephalon und das Dach des Mittelshirns, nimmt jedoch zum Ende der Embryogenese im Diencephalon ab, sodaß AP-2 δ

lediglich im Mittelhirndach detektiert werden kann. Zusätzlich zu diesem hauptsächlichsten Expressionsort wird AP-2 δ ab dem Tag E12.5 der Embryonalentwicklung auch im neopallialen Cortex exprimiert.

AP-2 ϵ wird über einen weiten Zeitraum der Embryonalentwicklung beginnend mit dem Tag E8.5 im Mittelhirn exprimiert und zeigt somit ein Expressionsmuster, daß von E8.5 bis E13.5 mit den Expressionsmustern von AP-2 α , AP-2 β und AP-2 δ im Mittelhirn überlappt (Moser et al., 1997b; Zhao et al., 2003; Wang et al., 2004b). Beginnend mit dem Tag E11.5 der Embryogenese wird AP-2 ϵ zusätzlich zur Expression im Mittelhirn im anterioren Vorderhirn, dem zukünftigen Riechkolben (Bulbus olfactorius) exprimiert und grenzt sich damit vom Expressionsmuster der AP-2 γ Isoform im dorsalen Vorderhirn ab (Feng and Williams, 2003; Wang et al., 2004b).

Ein weiteres Organ der Koexpression von AP-2 Proteinen stellt das **Rückenmark** dar. AP-2 α , AP-2 β und AP-2 γ werden während der Embryonalentwicklung im dorsalen, sensorischen Teil des Rückenmarks exprimiert (Chazaud et al., 1996; Moser et al., 1997b). Demgegenüber konnte AP-2 δ nicht im Rückenmark nachgewiesen werden (Zhao et al., 2003). AP-2 ϵ wird nur schwach in rostralen Regionen des Rückenmarks exprimiert (Feng and Williams, 2003; Wang et al., 2004b).

1.1.4.4 Expression von AP-2 Proteinen im Auge

Mit Ausnahme von AP-2 γ und AP-2 ϵ werden alle in der Maus bekannten AP-2 Isoformen in Strukturen und Geweben des embryonalen Auges exprimiert. So werden AP-2 α und AP-2 β bereits während früher Phasen der Embryogenese in der Linse koexprimiert (Zhao et al., 2003) und später ebenfalls in der Epidermis des Augenlids, sowie in der Hornhaut als der äußeren Epithelschicht (Mitchell et al., 1991; Moser et al., 1997b; Zhao et al., 2003). Zum gleichen Zeitpunkt wird AP-2 δ in einer inneren Schicht der embryonalen Retina detektiert (Zhao et al., 2003). Gegenüber AP-2 α und AP-2 β kann die Expression von AP-2 δ dagegen nicht im embryonalen Linsenvesikel oder in der Hornhaut beobachtet werden (Zhao et al., 2003).

1.1.4.5 Expression von AP-2 Proteinen im Oberflächenektoderm und in der Haut

Mithilfe von in situ Hybridisierungen konnte eine Koexpression von AP-2 α , AP-2 β und AP-2 γ bereits in frühen Embryonalstadien im Oberflächenektoderm und in der Epidermis nachgewiesen werden (Moser et al., 1997b). Demgegenüber konnte AP-2 δ zwar in sensorischen Epithelien der Retina und im Neuroektoderm detektiert werden, jedoch nicht im Oberflächenektoderm. Lediglich eine schmale epidermale Region oberhalb des Brustkorbs exprimiert AP-2 δ (Zhao et al., 2003). Ergebnisse von Northern Blots und RT-PCR-Analysen wiesen zudem eine Expression von AP-2 ϵ , von AP-2 α und auch von AP-2 γ in der Haut adulter Mäuse nach (Tummala et al., 2003; Wang et al., 2006).

1.1.4.6 Expression von AP-2 Proteinen im Urogenitaltrakt

Beginnend mit dem Tag E13.5 werden AP-2 α und AP-2 β überlappend in tubulären Strukturen der embryonalen Niere exprimiert, differenzieren sich jedoch während der fortschreitenden Embryogenese, sodaß AP-2 β in distalen tubulären Strukturen und im Sammelrohrepithel nachgewiesen wird. Demgegenüber beschränkt sich die Expression von AP-2 α auf die periphere nephrogene Zone (Moser et al., 1997b). AP-2 γ wird in der embryonalen Genitalleiste, im Epithel und im Mesenchym der Genitalknospe, sowie in Epithelien der Harnröhre und des Rektums exprimiert und grenzt sich somit stark von den Expressionsmustern der AP-2 α und der AP-2 β Isoform ab (Chazaud et al., 1996).

1.1.4.7 Expression von AP-2 Proteinen in den Extremitätenanlagen

Ebenfalls koexprimiert werden AP-2 α , AP-2 β und AP-2 γ während der Embryonalentwicklung im Mesenchym der Extremitätenknospen. Das anfangs diffuse Expressionsmuster der drei Isoformen konzentriert sich später in der sich direkt distal an das AER (apical ectodermal ridge) anschließenden Zone mitotisch-aktiver Zellen (progress zone) (Mitchell et al., 1991; Chazaud et al., 1996). Im weiteren Verlauf der Embryogenese erstreckt sich die Expression von AP-2 α auf den anterioren und posterioren Bereich der progress zone, während sich die Expression von AP-2 β auf den posterioren Bereich beschränkt. Demgegenüber ist keine Spezifizierung des Expressionsmusters von AP-2 γ innerhalb der progress zone zu beobachten (PD Dr. M. Moser, persönliche Kommunikation).

1.1.5 Interaktionspartner von AP-2

Für die AP-2 Transkriptionsfaktoren AP-2 α und AP-2 γ konnten bisher Interaktionen mit verschiedenen Proteinen, wie z.B. mit Coaktivatoren der Transkription, die AP-2 mit der basalen Transkriptionsmaschinerie verbinden, sowie Interaktionen mit Tumorsuppressoren und Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden.

1.1.5.1 Coaktivatoren

Mithilfe eines Yeast-Two Hybrid Assays und GST-Pulldown Experimenten konnte die Interaktion der Coaktivatoren **CITED2** und **CITED4** der CITED-Familie mit der ersten Helix der Dimerisierungsdomäne von AP-2 α nachgewiesen werden (Braganca et al., 2002; Braganca et al., 2003).

Coaktivatoren der CITED-Familie binden die Coaktivatoren p300 und CBP, die eine intrinsische Histon-Acetyltransferase Aktivität besitzen (Braganca et al., 2003). Histon-Acetyltransferasen katalysieren die kovalente Bindung einer Acetylgruppe an den N-Term von Histonen. Die Affinität des

Histon-Komplexes zur DNA wird durch diese Modifikation verringert und ermöglicht eine Konformationsänderung des Chromatins, die die Aktivierung der Transkription einleitet.

Die Rolle von CITED Proteinen als Coaktivatoren von AP-2 α wird zum einen durch die Analyse von Zielgenen von AP-2 α und zum anderen durch den Phänotyp von CITED2-defizienten Mäusen unterstützt. Untersuchungen der Expression von AP-2 α Zielgenen zeigten, daß diese Zielgene in CITED2-defizienten Mäusen nicht aktiviert werden können. Zudem starben CITED2-defiziente Mäuse zum Abschluß der Embryogenese und wiesen Mißbildungen des Herzens, Exencephalie, sowie Mißbildungen der Neuralleisten und besonders der cranialen Ganglien auf und zeigten damit ähnliche Mißbildungen wie AP-2 α -defiziente Mäuse (Bamfort et al., 2001).

Humane PA-1 Teratocarcinoma-Zellen, die durch die Transfektion mit N-ras transformiert worden waren, zeigten eine erhöhte AP-2 α Expression, die aber nicht zu einer höheren Transaktivierung von Zielgenen durch AP-2 α , sondern zu einer verstärkten Selbstinhibition der AP-2 α Aktivität führte (Kannan et al., 1994). Diese Selbstinhibition entsteht durch die hohe AP-2 α Expressionsrate, der eine limitierte Menge an verfügbaren Coaktivatoren gegenüber steht. Mithilfe eines GST~AP-2 Pulldown Interaktionsassays in PA1-Zellen konnte der AP-2 Coaktivator **PC4** identifiziert werden, der an die Transaktivierungsdomäne von AP-2 α binden und die AP-2 α -vermittelte Selbstinhibition aufheben kann (Kannan und Tainsky, 1999; Zhong et al., 2003).

In demselben Interaktionsassay konnte die poly-ADP-Ribose-Polymerase (**PARP**) als ein weiterer Coaktivator von AP-2 α identifiziert werden. Ebenso wie PC4 ergänzt PARP den Coaktivator-Pool von AP-2 α und kann somit AP-2 α in N-ras-transformierten PA-1 Zellen reaktivieren (Kannan et al., 1999). PARP spielt eine wichtige Rolle für die Reparatur beschädigter DNA, indem PARP die Basen-Exzisionsreparatur stimuliert und zum anderen die Transkription beschädigter Gene reprimiert (Oei et al., 1998). Die Bindung von PARP an den Tumorsuppressor **p53** konnte bereits zuvor beschrieben werden und daher wird eine Beteiligung von PARP am p53-vermittelten G1-Arrest vermutet (Masutani et al., 1995; Vaziri et al., 1997). AP-2 α interagiert auch direkt mit dem Tumorsuppressor p53, der durch die Transaktivierung von Zielgenen wie p21/WAF1/CIP1 und MDM-2 zum einen den Arrest in der G1- und der G2-Phase induziert und apoptotische Prozesse einleitet (Mc Pherson et al., 2002; Modugno et al., 2002).

Neben p53 kann PARP auch mit dem Yin Yang Transkriptionsfaktor **YY1** interagieren (Oei et al., 1997), dessen direkte Interaktion mit AP-2 α später ebenfalls beschrieben werden konnte (Wu und Lee, 2001). YY1 interagiert ebenfalls mit der Histon-Acetyltransferase p300/CBP als einem weiteren Coaktivator von AP-2 α . Die Histon-Acetyltransferase wird durch YY1 zu den Promotoren von YY1-Zielgenen rekrutiert und erleichtert dort die YY1-vermittelte Transkription von Zielgenen durch Konformationsänderungen des Chromatins (Lee et al., 1995).

Neben der Transkriptions-aktivierenden Wirkung konnten andere Gruppen auch einen reprimierenden Effekt von YY1 auf die Transkription von Zielgenen nachweisen. Obwohl der genaue molekulare Mechanismus noch nicht beschrieben wurde, setzt die YY1-vermittelte Repression die Bindung von AP-2 Proteinen an benachbarte AP-2 Bindestellen in den Promotorbereichen dieser Zielgene voraus (Shi et al., 1997; Wu und Lee, 2001), wie es bereits für die Galactocerebrosidase (Beier und Gorogh,

2005) und das Hamster H3.2 Histon Gen (Wu und Lee, 2001) nachgewiesen werden konnte. Am Beispiel der Galactocerebrosidase konnte gezeigt werden, daß die Kooperation von YY1 und AP-2 α die Repression des Galactocerebrosidase Gens verstärkt und somit die Entstehung und den Erhalt von Tumorzellen fördert (Beier und Gorogh, 2005). Da YY1 mit einer Vielzahl weiterer Coaktivatoren von AP-2 α wie c-Myc (Shrivastava et al., 1996) und RB (Petkova et al., 2001) interagiert und YY1-heterozygote Mäuse ähnliche Mißbildungen (Wachstumsretardation, Neurulationsdefekte, Exenzephalie) wie AP-2 α -defiziente Mäuse zeigen, wird eine Beteiligung beider Proteine an einem gemeinsamen regulatorischen Mechanismus vermutet (Donohoe et al., 1999).

1.1.5.2 Tumorsuppressoren und Transkriptionsfaktoren

E-Cadherin spielt eine wichtige Rolle für die Biogenese, die Differenzierung und den Erhalt des Epithels während der Embryogenese. Die Expression von E-Cadherin in Tumorzellen senkt deren Invasivität, weshalb E-Cadherin auch als Tumorsuppressor gilt. Studien mit verschiedenen Zelltypen zeigten, daß das Retinoblastoma Genprodukt **RB**, sowie das Proto-Onkogen **c-Myc** die Transkription von E-Cadherin spezifisch in Epithelzellen aktivieren können (Batsche et al., 1998). Als erforderlich für die RB- und c-Myc-vermittelte Transaktivierung von E-Cadherin erwies sich die Interaktion der beiden Proteine mit AP-2 α (Decary et al., 2002).

Im Gegensatz zur beobachteten Aktivierung der Transkription von E-Cadherin infolge der Bindung von c-Myc an AP-2 α in Epithelzellen konnten Gaubatz und Kollegen eine Inhibierung von c-Myc durch Interaktion mit AP-2 α in HeLa-Zellen beschreiben (Gaubatz et al., 1995). So konnte gezeigt werden, daß AP-2 α an das c-Myc-Max Heterodimer bindet, welches anschließend nicht mehr an c-Myc Bindestellen, sogenannte E-Box-Elemente in Promotorbereichen binden und so die Transkription von c-Myc Zielgenen aktivieren kann.

Expressionsstudien am embryonalen Auge zeigten, daß AP-2 α und der paired box-Transkriptionsfaktor **Pax6** überlappend im Linsenepithel, im Epithel der Hornhaut, der Iris, im Ziliarkörper und in der Retina exprimiert werden (Nottoli et al., 1998; West-Mays et al., 1999). Pax6 spielt eine wichtige Rolle für die Augenentwicklung und wird zusätzlich während der Wundheilung verstärkt im Epithel der Hornhaut exprimiert (Sivak et al., 2000). Die Expression der zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen gehörende Gelatinase B (gelB) wird ebenfalls während der Wundheilung zur Erneuerung des Hornhautepithels in der Hornhaut exprimiert und eine deregulierte Expression von gelB resultiert in einer defekten Wundheilung der Hornhaut. Transfektionsstudien zeigten, daß Pax6 den gelB Promotor zum einen durch die direkte Bindung an eine Pax6 Bindestelle regulieren kann. Zum anderen wurde auch eine indirekte Regulation des gelB Promotors durch Pax6 nachgewiesen, die durch die Interaktion von Pax6 mit AP-2 α infolge der Bindung von AP-2 α an eine benachbarte AP-2 Bindestelle im gelB Promotors vermittelt wird (Sivak et al., 2004).

1.1.6 Funktionen von AP-2

Da die AP-2 Transkriptionsfaktoren nicht direkt mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren können, üben AP-2 Transkriptionsfaktoren ihre Funktion durch die Interaktion mit Coaktivatoren, sowie durch die von ihnen regulierten Zielgene aus. So bindet AP-2 α an die Coaktivatoren CITED2 und CITED4, die ihrerseits die Histon-Acetyltransferasen p300/CBP binden. In Tumorzellen konnte ebenfalls die Interaktion des AP-2 α Coaktivators YY1 mit den Histon-Acetyltransferasen p300/CBP beschrieben werden. Ebenso konnte die poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) in Tumorzellen als Coaktivator von AP-2 α identifiziert werden, die auch mit YY1 interagiert und somit die daraus resultierenden Veränderungen der Chromatinstruktur weiter verstärkt. Somit können AP-2 Transkriptionsfaktoren durch die Interaktion mit verschiedenen Coaktivatoren Einfluß auf die Veränderung der Chromatinstruktur nehmen.

1.1.6.1 Regulation von Zellproliferation und Apoptose durch AP-2

Das Proto-Onkogen *c-Myc* ist ein nukleäres Phosphoprotein der helix-loop-helix Proteinfamilie und kann sowohl Zellproliferation als auch Apoptose induzieren (Evan et al., 1992; Evan und Littlewood, 1993). Hinweise auf eine Funktion von AP-2 α als negativem Regulator von *c-Myc* lieferten die Promotorstudien der Ornithin-Decarboxylase und von Prothymosin- α (Gaubatz et al., 1995). Das *c-Myc* Protein bindet und transaktiviert die Expression von Genen über E-Box-Elemente. Das E-Box-Element im 3'-Bereich der Promotoren der beiden Gene überlappt mit einer AP-2 Bindestelle, sodaß die Bindung eines AP-2 Dimers an AP-2 Bindestellen zur Maskierung der benachbarten E-Box-Elemente führt und die gleichzeitige Bindung des Myc-Max- oder Max-Max-Dimers an die E-Box Elemente verhindert wird. C-Myc-vermittelte Transaktivierung wird zudem auf Proteinebene durch Anlagerung von AP-2 Proteinen an die Myc-Max- oder Max-Max-Dimere inhibiert (Gaubatz et al., 1995). Somit stellt AP-2 α einen negativen Regulator für die Transkription von *cMyc* Zielgenen dar. Darüberhinaus reguliert *c-Myc* die Zellproliferation und kann den Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus induzieren (Eilers et al., 1991). Mitotische Signale stimulieren den Übergang einer Zelle in die G1-Phase und induzieren die Expression von D-Cyclinen (Matsushime et al., 1991). Untersuchungen des CyclinD2 Promotors zeigten, daß die Expression von CyclinD2 durch die Bindung von *c-Myc* an ein kombiniertes E-Box/AP-2 Element aktiviert wird (Bouchard et al., 1999), während AP-2 α die CyclinD2 Expression reprimiert (Jun et al., 1997). Die Repression von CyclinD2 als einem wichtigen Zielgen von *c-Myc* zeigt, daß AP-2 α einen wichtigen Regulator der *c-Myc*-vermittelten Proliferation darstellt.

Neben der Proliferation spielt AP-2 α auch eine wichtige Rolle für die Regulation apoptotischer Prozesse. In vielen Tumoren konnte eine Überexpression von *c-Myc* nachgewiesen werden. Die deregulierte *c-Myc* Expression resultiert in DNA-Schäden, die zur Aktivierung des Tumorsuppressors p53 führen. Der Tumorsuppressor p53 induziert den Arrest in der G1- und der G2-Phase und leitet apoptotische Prozesse ein, indem p53 die Zielgenen *p21/Waf1/Cip1* und *Mdm2* aktiviert und *c-Myc* reprimiert (Mc Pherson et al., 2002; Ho et al., 2005). AP-2 α kann mit p53 interagieren und ebenfalls

die Transkription von *p21/Waf1/Cip1* aktivieren und damit den Arrest in der G1-Phase einleiten (Zeng et al., 1997; McPherson et al., 2002; Modugno et al., 2002).

Im Gegensatz zu Tumorzellen, in denen AP-2 α durch die Interaktion mit p53 den Arrest der Zellen in der G1-Phase einleitet, der zum Tod der Zellen führt, konnte in Epithelzellen eine anti-apoptotische Wirkung von AP-2 nachgewiesen werden. AP-2 α bindet in Epithelzellen zusammen mit RB an ein gemeinsames Element im Promotorbereich des *Bcl-2* Gens und aktiviert so die Transkription des *Bcl-2* Gens (Decary et al., 2002). Somit unterstützt AP-2 α indirekt RB-vermittelte Differenzierungsprozesse und sichert das Überleben der Epithelzellen.

Wird AP-2 in Zellen z.B. durch eine virale Infektion überexprimiert und erreicht die deregulierte AP-2 Expression eine für die Zellen toxische Konzentration, so wird in diesen Zellen eine AP-2-vermittelte Apoptose induziert. Diese erfolgt zunächst durch die Repression von *Bcl-2* und durch die anschließende Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran im Zuge eines Bax/Cytochrom C/Apaf1/Caspase9-abhängigen Mechanismus' (Wajapeyee et al., 2006).

1.1.6.2 Funktionen von AP-2 Proteinen in Tumoren

In in vitro Studien an Tumorzelllinien mit einer stark erhöhten AP-2 α Expression erwies sich AP-2 α durch die Induktion von Apoptose und der Blockade des Zellzyklus' als potentieller Tumorsuppressor (Wajapeyee und Somasundaram, 2003). Dies wurde unterstützt durch Analysen humaner maligner Melanome. AP-2 α reguliert die Expression des Proto-Onkogens c-Kit und des Adhäsionsmoleküls MCAM/MUC18, die eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und in der Tumorumprogression spielen (Huang et al., 1998; Jean et al., 1998). Kennzeichnend für metastasierende Melanomzellen ist der Verlust der AP-2 α Expression und der daraus resultierende Verlust der c-Kit Expression. Die Transfektion von Melanomzellen mit AP-2 α konnte jedoch die Expression von c-Kit induzieren und führte zur unmittelbaren Induktion von SCF-vermittelter Apoptose (Huang et al., 1996). Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß die verminderte Expression von c-Kit aufgrund fehlender Transaktivierung durch AP-2 α die Einleitung apoptotischer Prozesse in den Melanomzellen verhindert. Gegenüber c-Kit wird MCAM/MUC18, das invasive Prozesse und somit die Bildung von Metastasen durch die Vermittlung von Zell/Zell- oder Zell/Matrix-Kontakten fördert, aufgrund der fehlenden Regulation durch AP-2 α in metastasierenden Melanomzellen überexprimiert (Jean et al., 1998). Ebenso wirkt AP-2 α in Prostata-Tumorzellen als Tumorsuppressor, indem AP-2 α die Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) reprimiert. Die Repression erfolgt durch Konkurrenz mit dem Transkriptionsfaktor Sp3 an GC-reiche Bindungsstellen im VEGF Promotor. In AP-2 α -defizienten Zellen konnte so die Bindung von Sp3 an den VEGF Promotor erfolgen, die zur Expression von VEGF führt und somit zur Entstehung von Prostata-Tumoren beiträgt (Ruiz et al., 2004).

Eine gegenteilige Rolle spielt AP-2 α in Brustkrebszellen, in denen sich die Expression von AP-2 Proteinen förderlich auf die Entstehung und die Progression von Tumoren auswirkt. Dabei korrelieren hohe Expressionsspiegel der AP-2 Isoformen AP-2 α und AP-2 γ mit der Überexpression des Proto-

Onkogens *ErbB2*, da beide Isoformen die *ErbB2* Transkription durch Bindung an AP-2 Bindestellen im *ErbB2* Promotor aktivieren (Bosher et al., 1996; Grootclaes et al., 1999; Vernimmen et al., 2003). Neuere Studien zeigen, daß eine fehlerhafte Ubiquitylierung ursächlich für eine verlängerte Halbwertszeit von AP-2 α in den Tumorzellen ist und daher zu einer vermehrten Transaktivierung des *ErbB2* Promotors führt (Li et al., 2006).

1.1.7 In vivo Funktionen von AP-2 Proteinen

1.1.7.1 Mausmodelle

I AP-2 α

Die Generierung AP-2 α -defizienter Mausstämmen gelang 1996 zwei Gruppen unabhängig voneinander durch gezielte Mutationen des 5. bzw. 6. Exons (Schorle et al., 1996; Zhang et al., 1996). Erste Mißbildungen in Form verschiedener Verschußdefekte traten am Tag E9.5 der Embryonalentwicklung auf. So war die Ausbildung einer cranio-facialen Spalte durch Verschußdefekte der cranialen Neuralfaltens zu beobachten (Cranioschisis). Bei dieser Exenzephalie überwachsen die Neuralwülste die frontonasale Region und die medial angelegten Strukturen der Nase, des Ober- und des Unterkiefers entwickeln sich seitlich des Kopfes. Untersuchungen an wandernden cranialen Neuralleistenzellen, die normalerweise hohe Expressionsspiegel an AP-2 α aufweisen, belegten, daß diese Zellen zwar ihre Zielgewebe im Gesichtsmesenchym finden, dann jedoch in den apoptotischen Zelltod übergehen. Das Schließen der anterioren Neuralfaltens ist ein komplexer Prozess und wird von einer konzertierten Aktion des Neuroepithels, des Oberflächenektoderms und des Kopfmesenchyms gesteuert (Smith und Schoenwolf, 1997). Der apoptotische Zelltod im Neuroepithel und in den Gesichtsstrukturen beeinflusst diese morphogenetischen Differenzierungsprozesse und mag ursächlich für die schweren cranialen Defekte sein. Zusätzlich zu den Verschußdefekten der cranialen Neuralfaltens wiesen AP-2 α -defiziente Mäuse Verschußdefekte des Rumpfes auf, da das laterale Ektoderm des Thorax und des Abdomens die inneren Organe nicht vollständig umwächst. Die inneren Organe entwickelten sich daher außerhalb des Embryos (Abdominoschisis).

Untersuchungen an chimären Mäusen, die durch Injektionen von AP-2 α -defizienten ES-Zellen in wildtyp-Blastozysten generiert wurden, zeigten, daß die an AP-2 α -defizienten Mäusen beobachteten Defekte des Gesichts, der Augen, der Gliedmaßen und des Neuralrohrs auch unabhängig voneinander in den chimären Mäusen auftraten. Diese Beobachtungen unterstreichen damit die essentielle Bedeutung von AP-2 α für die Entwicklung dieser Strukturen (Nottoli et al., 1998).

Während der Embryogenese wird AP-2 α auch in kardialen Neuralleistenzellen exprimiert und um die Beteiligung von AP-2 α an der Entwicklung des Herzens zu analysieren, generierten Brewer und Kollegen AP-2 α -defiziente Mäuse durch die Insertion einer IRES-LacZ-Kassette in das 7. Exon des AP-2 α Gens (AP-2 α :LacZ KI) (Brewer et al., 2002). Die AP-2 α -defizienten Mäuse zeigten die entsprechenden Defekte, die schon zuvor bei den AP-2 α -defizienten Mausstämmen von Schorle und Zhang beobachtet worden waren, sowie zwei maßgebliche Entwicklungsdefekte des Ausflußtraktes,

einen offenen Truncus Arteriosus und eine Fehlanlage der Aorta, die aus dem rechten Ventrikel austritt. Damit spielt AP-2 α in kardialen Neuralleistenzellen eine essentielle Rolle für die Entwicklung des Ausflußtraktes (Brewer et al., 2002).

Um die Funktion von AP-2 α in weiteren Derivaten der Neuralleistenzellen zu analysieren, generierten Brewer und Kollegen „gefloxt“ AP-2 α Mäuse durch die Flankierung des 5. und des 6. Exons mit LoxP-Sequenzen (Brewer et al., 2004a). Die konditionalen AP-2 α -defizienten Mäuse, die aus der Verpaarung der homozygot geflochten Tiere (AP-2 $\alpha^{fl/fl}$) mit heterozygoten Wnt1-Cre/AP-2 α :LacZ KI Mäusen hervorgegangen (Danielian et al., 1998; Brewer et al., 2002), zeigten Neuralleisten-assoziierte Defekte. Mutanten mit schweren Verschußdefekten des Neuralrohrs und des Gaumens starben perinatal. Mutanten mit einem milderen Phänotyp dagegen überlebten mit skeletalen Defekten der Gesichtsknochen und der Gehörknöchelchen, sowie mit Pigmentierungsstörungen. Die beobachteten Defekte unterstreichen, daß die spezifische Expression von AP-2 α in Neuralleistenzellen für die Entwicklung des Gesichts, des Innenohrs und der Melanozyten von großer Bedeutung ist (Brewer et al., 2004a) und bestätigten die nachgewiesenen skeletalen Mißbildungen im Kopfbereich und des axialen Skeletts der initial beschriebenen AP-2 α -defizienten Mäuse (Schorle et al., 1996; Zhang et al., 1996). Die Rolle von AP-2 α während Retinsäure-vermittelter morphogenetischer Entwicklungsprozesse wird durch die schweren Defekte im Gesichtsmesenchym und der vorderen Gliedmaßen bestätigt (Schorle et al., 1996; Nottoli et al., 1998). Vitamin A-defiziente Mäuse und Doppelmutanten der Retinsäure-Rezeptoren RAR α und RAR γ zeigten ähnliche Gesichtsdefekte und Fehlbildungen der vorderen Gliedmaßen (Lohnes et al., 1994). Die Beobachtung einer Induktion der AP-2 α Expression nach Behandlung der Zellen mit Retinsäure und der Expression von AP-2 α in Retinsäure-sensitiven Geweben wie dem Gesichtsmesenchym und den Extremitätenanlagen läßt vermuten, daß AP-2 α in die transkriptionelle Regulation Retinsäure-vermittelter morphogenetischer Prozesse involviert ist.

Ebenso konnten Brewer und Kollegen mithilfe der AP-2 α -defizienten Mauslinie (Brewer et al., 2002) zeigen, daß die beobachteten Verschußdefekte des Rumpfes auf Migrations- und Differenzierungsdefekten des embryonalen Mesoderms beruhen (Brewer et al., 2004b). Die daraus resultierende Fehlentwicklung des Mesoderms wurde von apoptotischem Zelltod im stark vergrößerten Bereich des Nabelrings begleitet. Die Expression von AP-2 α konnte nur im Oberflächenektoderm, jedoch nicht in mesodermalen Strukturen nachgewiesen werden. Aufgrund des beobachteten Phänotyps folgerten Brewer und Kollegen daher, daß das im Oberflächenektoderm exprimierte AP-2 α für die Vermittlung epithelial-mesodermaler Interaktionen mit dem darunterliegenden Mesoderm erforderlich ist (Brewer et al., 2004b).

II AP-2 β

Obwohl das frühe embryonale Expressionsmuster von AP-2 α und AP-2 β überlappt (Mitchell et al., 1991; Moser et al., 1997b), konnte keiner der in den AP-2 α -defizienten Mauslinien beschriebenen Defekte in AP-2 β -defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Moser et al., 1997a). Die Mutanten

entwickelten sich zunächst unauffällig, bis am Tag E16.5 der Embryonalentwicklung zystische Veränderungen der Nierentubuli und der Sammelrohre zu beobachten waren. Obwohl AP-2 α und AP-2 β bereits sehr früh in der Nierenentwicklung im einwachsenden und sich verzweigenden Nierenepithel koexprimiert werden, traten die Defekte der AP-2 β -defizienten Mäuse erst sehr spät auf. Eine mögliche Erklärung für das späte Einsetzen der Defekte könnte in der gegenseitigen Kompensation beider Gene in frühen Phasen der Embryonalentwicklung bestehen. In späteren Entwicklungsphasen geht diese Kompensation aufgrund der sich differenzierenden Expressionsmuster verloren. So wird AP-2 α verstärkt in der Nierenrinde und in der peripheren nephrogenen Zone exprimiert, während AP-2 β hauptsächlich im Epithel des Sammelrohrs und im distalen Tubulussystem nachweisbar ist. Aufgrund der speziellen Expressionsmuster der beiden Isoformen ist eine Kompensation nicht mehr möglich und der Phänotyp der AP-2 β -defizienten Tiere manifestiert sich. Die Analyse der frühen Markergene *Wt1*, *Wnt4*, *Pax2* und *Pax8* unterstützt diese Theorie und belegt, daß alle frühen Induktions- und Konversionsprozesse in AP-2 β -defizienten Nieren normal ablaufen (Moser et al., 1997a).

Untersuchungen dieser polyzystischen Niereninsuffizienz zeigten eine erhöhte Apoptoserate im Nierenepithel bei gleichzeitig verminderter Expressionsrate des anti-apoptischen *Bcl-2* Gens. Moser und Kollegen konnten anhand von in vitro Daten mit Expressionsstudien an PA-1 Zellen zeigen, daß die Apoptose in den Nieren AP-2 β -defizienter Mäuse vermutlich aus der deregulierten c-Myc Expression resultierte. Diese Annahme wird unterstützt durch Ergebnisse mit c-Myc transgenen und *Bcl-2* knockout Mäusen, in denen ebenfalls polyzystische Nieren nachgewiesen werden konnten (Trudel et al., 1991; Veis et al., 1993). Somit scheint die Entstehung von Zysten die Folge fehlregulierter Gene zu sein, die den kontrollierten Zelltod im Nierenepithel steuern (Moser et al., 1997a).

III AP-2 γ

AP-2 γ wird in allen Zelltypen des präimplantierten Embryos exprimiert, mit der Einnistung des Embryos in den Uterus spezifiziert sich die Expression von AP-2 γ jedoch in extraembryonalen Geweben. Im weiteren Verlauf der Embryogenese wird AP-2 γ hauptsächlich in Derivaten des Trophoblasten, wie den sekundären Riesenzellen, den Zellen des Spongiotrophoblasten und der Labyrinthzone exprimiert (Shi und Kellems, 1998; Sapin et al., 2000). Die Funktion von AP-2 γ für die Entwicklung der Plazenta konnte mithilfe AP-2 γ -defizienter Mauslinien genauer analysiert werden, deren Generation 2002 zwei Gruppen unabhängig voneinander durch gezielte Mutationen der AP-2 γ -kodierenden Region gelang (Auman et al., 2002; Werling et al., 2002). In beiden AP-2 γ -defizienten Mauslinien waren bereits zu Beginn der Gastrulation am Tag E6.0 erste Veränderungen erkennbar. In dieser frühen Embryonalphase waren AP-2 γ -defiziente Embryonen im Vergleich zu wildtyp-Embryonen bereits um 50% kleiner. Zudem konnten Werling und Kollegen zeigen, daß AP-2 γ Mutanten die Gastrulation mit der Ausbildung des mesodermalen Keimblattes zwar initiieren, aber nicht fortführen konnten, was auf eine wichtige Rolle für AP-2 γ für die postimplantive Entwicklung schließen läßt (Werling et al., 2002). Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung zeigten sich

schwere Defekte des extraembryonalen Ektoderms mit Mißbildungen des ekto-plazentalen Kegels und einer reduzierten Population der Riesenzellen des Trophoblasten. Zudem konnten AP-2 γ -defiziente Embryonen keine Labyrinthzone ausbilden. Aufgrund der zahlreichen Defekte des extraembryonalen Ektoderms können AP-2 γ -defiziente Embryonen nicht ausreichend zur Ausbildung einer funktionalen Plazenta beitragen, sterben und ihre Resorption war ab dem Tag E9.0 zu beobachten.

Untersuchungen an Trophoblastenzellen kultivierter, AP-2 γ -defizienter Blastozysten wiesen zudem morphologische und apoptotische Veränderungen, sowie eine reduzierte Expression der Adenosin-Deaminase (ADA) auf (Werling et al., 2002). Die ADA spielt eine wichtige Rolle für den Purin-Metabolismus und wird u.a. in den Riesenzellen des Trophoblasten exprimiert (Blackburn et al., 1996). Da AP-2 Bindestellen in der Promotorregion der ADA identifiziert werden konnten, wurde eine Regulation der ADA durch AP-2 Transkriptionsfaktoren bereits früher postuliert (Shi und Kellems, 1998). Werling und Kollegen vermuteten daher, daß die Deletion des AP-2 γ Gens für die Reduktion des ADA Expressionsspiegels ursächlich ist. Somit könnte die verbundene Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte in morphologischen Veränderungen und schließlich im apoptotischen Zelltod der Trophoblastenzellen von AP-2 γ Mutanten resultieren.

1.1.7.2 AP-2 Mutationen in der humanen Keimbahn (Char Syndrom)

Das Char Syndrom wurde erstmalig 1978 durch Florence Char als eine autosomal dominante humane Erkrankung beschrieben, die durch verschieden stark ausgeprägte Mißbildungen im Gesicht und an den Händen, sowie einem angeborenem Herzfehler, dem offenen Ductus arteriosus (persistent ductus arteriosus, PDA) gekennzeichnet ist (Char, 1978). Um die genetische Ursache für die Entstehung des PDAs zu klären, wurden die Genome zweier unabhängiger Familien auf den Locus des Char Syndrom-verursachenden Gens gescreent (Satoda et al., 1999). Mithilfe von positionellen Klonierungen und Haplotyp-Analysen konnte dieses Gen auf dem Chromosom 6p12-p21 identifiziert werden - einer Region, die ebenso für das humane AP-2 β Homolog TFAP2B kodiert. PCR Analysen der kodierenden Region erkrankter Individuen ergaben, daß einzelne Punktmutationen im 5. Exon zum Austausch von Aminosäuren führten. Diese Aminosäuresubstitutionen (A264D, R289C) betrafen konservierte Reste in der Aminosäuresequenz des humanen AP-2 β Proteins und identifizierten das humane AP-2 β Gen TFAP2B somit als Kandidaten-Gen für das Char Syndrom (Satoda et al., 2000). Weitere Analysen der Aminosäuresubstitutionen im 5. Exon ergaben, daß mutierte, dominant-negative Proteine entstehen, die funktionale Dimere ausbilden, aber nicht mehr an die DNA binden können (Satoda et al., 2000). Daß eins dieser dominant-negativen Proteine in einem AP-2 Dimer ausreicht, um die DNA-Bindung zu inhibieren, erklärt die Dominanz der Erkrankung. Somit unterscheiden sich die Mechanismen, die zur Ausprägung des Char Syndroms beim Menschen und zum Phänotyp der durch Nullmutationen generierten AP-2 β knockout Mäuse führt.

Da AP-2 Proteine auch Heterodimere bilden können, kann ein mutiertes AP-2 β Protein auch Auswirkungen auf die Funktionalität anderer AP-2 Isoformen haben. Diese Veränderungen in der Zusammensetzung funktionaler Homo- und Heterodimere kann ursächlich für die beobachteten Variationen in der individuellen Ausprägung des Char Syndroms sein. Geringe Mengen an

funktionalen AP-2 β Homodimeren, die durch das zweite, intakte Allel gebildet werden, scheinen offensichtlich ausreichend für eine normale Nierenentwicklung bei den Char Syndrom Patienten zu sein, da keine Nierendefekte analog zum AP-2 β Mausmodell bekannt sind.

Die Entstehung des PDA ist wahrscheinlich auf Entwicklungsdefekte der kardialen Neuralleistenzellen zurückzuführen. In den kardialen Neuralleistenzellen, die AP-2 α und AP-2 β koexprimieren, bilden Char Patienten neben AP-2 α auch das mutierte AP-2 β , welches mit AP-2 α heterodimerisiert. Der dominant-negative Effekt des mutierten AP-2 β auf AP-2 α führt vermutlich zum Funktionsverlust von AP-2 α und somit zur Entstehung der PDA-Symptomatik. In AP-2 β Mausmutanten wurde bislang noch keine PDA-Symptomatik nachgewiesen. Jedoch wurde die Bedeutung von AP-2 β für eine korrekte Herzentwicklung aufgrund der frühen Letalität von AP-2 β Mutanten noch nicht näher untersucht. Sollte ebenfalls AP-2 β in den kardialen Neuralleistenzellen eine Funktion ausüben, ist daher nicht auszuschließen, daß der Verlust von AP-2 β in den Mausmutanten zur Entstehung eines Char-typischen Herzphänotyps führt.

Darüberhinaus ist die Bedeutung von AP-2 Genen für die Entwicklung der Extremitätenknospen und der Gesichtsstrukturen evolutionär konserviert. Bereits Invertebraten wie die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zeigen eine starke AP-2 Expression im Bereich des Kopfes (Bauer et al., 1998; Monge und Mitchell, 1998). Da die Gesichtsanomalien selbst beim Menschen differieren und keine schweren skeletalen Defekte sichtbar sind, ist es nicht überraschend, daß bei den AP-2 β -defizienten Mäusen keine offensichtlichen Gesichtsdefekte auftreten. Interessanterweise besitzen AP-2 β Mausmutanten eine postaxiale Polydaktylie des 5. Fingers. Ähnlich der AP-2 β -defizienten Mäuse besitzen Char Syndrom Patienten oftmals Handanomalien, die den 5. Finger betreffen. Hierbei handelt es sich meist um eine Brachydaktylie, die mit einer Verschmelzung zweier Fingerglieder einhergeht und seltener um eine Polydaktylie (Slavotinek et al., 1997; Satoda et al., 1999).

2001 konnte neben den bisher bekannten TFAB2B Mutationen in der basischen Domäne auch eine Mutation in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne von AP-2 β identifiziert werden (P62R; Zhao et al., 2001b). Diese missense-Mutation betrifft ein konserviertes, für die Transaktivierung wichtiges PY-Motiv, das die Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren vermittelt (Yagi et al., 1999). Das entstehende mutierte AP-2 β Protein kann als Homodimer die Transkription nicht mehr aktivieren und hemmt die Transaktivierung im heterodimeren Zustand. Die Patienten zeigten neben einer stark ausgeprägten PDA-Symptomatik wesentlich mildere Gesichtsanomalien. Im Gegensatz zu den Mutationen, die die basische Domäne betreffen, zeigten diese Patienten keine Handanomalien. Eine mögliche Ursache für diese Symptomatik könnte in der Zelltyp-spezifischen Verteilung von Coaktivatoren liegen: die Effekte der N-terminalen AP-2 β Mutation könnten somit in denjenigen Geweben stärker sein, in denen Coaktivatoren mit einem großen Einfluß auf die Transaktivierung von Zielgenen mit dem PY-Motiv interagieren. Insgesamt wirft die Identifizierung von AP-2 β Mutationen beim Char Syndrom die interessante Frage auf, ob noch weitere erblich mutierte AP-2 Allele oder Veränderungen im Expressionsmuster von AP-2 Genen beim Menschen existieren, die in angeborenen Gesicht-, Nieren- oder Gliedmaßendefekten resultieren.

1.2 Ziel der Arbeit

Genomische Studien des Char-Syndroms am humanen AP-2 β Genlokus führten 2001 zur Identifizierung der AP-2 δ Isoform, die somit das 4. Gen innerhalb der in Maus und Mensch charakterisierten AP-2 Familie darstellt (Zhao et al., 2001a). Das orthologe Maus-Gen wurde aus einer fetalen murinen cDNA-Bank, bestehend aus Gewebe des Kopfes isoliert. Das AP-2 δ Protein wird im Gegensatz zu den bisher bekannten AP-2 Isoformen von 8 Exons kodiert und umfaßt 452 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von ca. 50 kDa. Erste Expressionsstudien zeigten, daß AP-2 δ neben anderen AP-2 Isoformen wie AP-2 α und AP-2 β im embryonalen Mittelhirn koexprimiert wird (Moser et al., 1997b; Zhao et al., 2003).

- I Um die räumliche und zeitliche Dynamik des Expressionsmusters von AP-2 δ im Nervensystem genauer zu analysieren, ist ein Ziel der vorliegenden Arbeit, weitere Expressionsanalysen durchzuführen, mithilfe derer das AP-2 δ Expressionsmuster von den Expressionsmustern anderer AP-2 Proteine abgegrenzt werden soll. Diese Untersuchungen sind wesentliche Voraussetzungen für die Analysen an den AP-2 δ Mausmutanten, die in dieser Arbeit generiert werden sollen.
- II Um die in vivo Funktion von AP-2 δ genauer zu analysieren, soll eine konstitutiv AP-2 δ -defiziente Mauslinie mithilfe des gene targetings generiert und deren Phänotyp charakterisiert werden. Aufgrund der Hirn-spezifischen Expression von AP-2 δ ist keine embryonale Letalität der Mäuse zu erwarten und daher soll auf einen konditionalen, induzierbaren AP-2 δ knockout verzichtet werden.
- III Die innerhalb der AP-2 Familie wenig konservierte N-terminale Transaktivierungsdomäne verfügt nur über wenige charakteristische Reste und Motive, die als entscheidend für die transaktivierenden Eigenschaften der AP-2 Proteine beschrieben wurden (Wankhade et al., 2000). Obwohl einige dieser Reste, wie z.B. das PY-Motiv in der Transaktivierungsdomäne der AP-2 δ Isoform fehlen, resultiert dies nicht in einer verringerten Transaktivierungseffizienz von AP-2 δ gegenüber anderen AP-2 Isoformen. Eine effektive Transkription von AP-2 δ Zielgenen kann trotz dieser Veränderungen wichtiger Motive möglicherweise durch die Mitwirkung anderer, AP-2 δ -spezifischer Coaktivatoren bei der AP-2 δ -vermittelten Transkriptionsinitiation erfolgen. Daher besteht ein weiteres Ziel der Arbeit in der Identifizierung und Charakterisierung von AP-2 δ Interaktionspartnern durch ein Interaktions-Screening einer murinen, Hirn-spezifischen Expressions-Bibliothek in *Saccharomyces cerevisiae* (Yeast-Two Hybrid).

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Geräte und Materialien

Alle Geräte und Materialien wurden von den Firmen Corning (Verbrauchsmaterial; Kaiserslautern), Schott (Glaswaren; Zwiesel), Schleicher&Schuell (3MM-Whatman-Papier, Rundfilter; Dassel) und Eppendorf (Kleingeräte wie Thermomixer und Tischzentrifugen; Hamburg) bezogen.

2.1.1 Material und Chemikalien für tierbiologische Experimente

Ohrmarken sowie die entsprechenden Zangen zum Setzen der Ohrmarken wurden von der Firma Hauptner&Herberholz (Solingen), die Superovulationshormone PMSG (Intergonan, 1337) und HCG (Ovogest, 89219) von der Firma Intervet (Unterschleissheim), Injektionsmaterial (Einmalspritzen und -kanülen) von den Firmen Braun (Melsungen) und Terumo (Leuven, Belgien) bezogen.

2.1.2 Material, Geräte und Chemikalien für die Zellkultur

Alle Materialien, Geräte und Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (DMSO, DAPI, all-trans-Retinsäure (R2625), PBS-Tabletten; Deisenhofen), Gibco-BRL/Invitrogen (10x Trypsin/EDTA, Zellkulturmedium DMEM mit 4.5g/L D-Glucose, Na-Pyruvat und L-Glutamin (GlutaMAX™), G418, FKS, LIF, 100x nicht-essentielle Aminosäuren, Lipofectamine®; Karlsruhe), Falcon/Becton Dickinson (Verbrauchsmaterial wie Petrischalen und Flaschen zur Kultivierung von Zellen; Basel, Schweiz), PAA Laboratories (100x Penicillin/Streptomycin; Pasching, Österreich) und Biorad (Biorad Gene Pulser, Elektroporationsküvetten für eukaryontische Zellen; München) bezogen.

2.1.3 Material, Geräte und Chemikalien für die Molekularbiologie

Alle Materialien, Geräte und Chemikalien stammten von den Firmen Roche (Shrimp Alkaline Phosphatase, 10x Digoxigenin Nukleotid-Mix; Penzberg), Invitrogen (Formamid (redestiliert), Agarose, 1kb DNA-Standard, Salmon Testes DNA, Trizol, Superscript II cDNA Synthese Kit, Taq-Polymerase, TOPO TA Cloning Kits; Karlsruhe), Stratagene (RNA-Polymerasen (Sp6, T3, T7); La Jolla, USA), New England Biolabs (DNA Polymerase 1 (Klenow Fragment), Restriktionsenzyme und Puffer, T4 Polynukleotidkinase, Vent-Polymerase; Frankfurt am Main), Sigma (Chemikalien für Puffer und Lösungen, Aminosäuren, Maleinsäure, tRNA; Deisenhofen), Amersham Pharmacia (³²P/³³P-Nukleotide, Redivue™ L-[³⁵S] methionine (*in vitro* translation grade), Micro Spin G50 Columns, pDN6 random primer, Rediprime II Labeling Kit; Buckinghamshire, England), Metabion (Oligonukleotide und Primer; Martinsried) und Qiagen (Kits für die Molekularbiologie : RNA- und DNA-Präparation, DNA-Aufreinigung; Hilden).

2.1.4 Material und Chemikalien für das Yeast-two Hybrid System

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen) und Merck (Darmstadt) bezogen. Materialien für den Yeast-two Hybrid Screen stammen von der Firma Q-Biogene (Dropout Agar Base for synthetic dropout (SD) media (DOBA), Complete Supplement Mixture (CSM without Ade, His, Leu, Trp), YPD; Heidelberg).

2.1.5 Material und Chemikalien für die Biochemie und die Zellbiologie

Alle Materialien und Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Ponceau S (P 7170), APS, TEMED, β -Mercaptoethanol, Titermax Gold Adjuvant (T 2684); Deisenhofen), Biorad (Biorad Protein Assay, Coomassie brilliant blue G-250, Precision Plus Protein Standard; München), Pierce (BCA Protein Assay Kit, Imject[®] Maleimide Activated mc KLH, Sulfo Link[®] Kit; Rockford, USA) und Amersham Pharmacia (ECL plus, PVDF Membran, Glutathion Sepharose 4 Fast Flow beads, Amplify[™] Fluorographic Reagent, Hyperfilm[™] ECL[™]; Buckinghamshire, England) bezogen.

2.1.6 Material und Chemikalien für die Histologie

Alle Materialien und Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Diaminobenzidin, DAPI, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, 25% Glutaraldehyd, Levamisole, Parablast Embedding Medium; Deisenhofen), Merck ($K_3[Fe(CN)_6]$, Entellan, H_2O_2 ; Darmstadt), Kodak (Entwickler D19, Fixierer, Fotoemulsion NBT-2; Stuttgart), Menzel (Deckgläser, Superfrost[®] Objektträger; Braunschweig), Roche (Blocking Reagent, In situ Cell Death Detection Kit, anti-BrdU-POD, BM Purple; Penzberg) und Roth (Einbettkassetten, Hellendahl-Färbekästen; Karlsruhe) bezogen.

2.1.7 Mikroskopische Systeme

Die verwendeten Mikroskope stammten von den Firmen Zeiss (Modelle : Axioskop, Axiophot, Axiovert; Jena) und Leica (Modelle : MZFL III, CTR MIC; Wetzlar). Die phototechnische Dokumentation der Experimente erfolgte mit Kameras der Firmen Leica (Modell DC 500; Wetzlar) und Hamamatsu (Herrsching) und die erhaltenen Daten wurden mithilfe der Software folgender Firmen ausgewertet : Leica (Modell IM 1000; Wetzlar), Jenoptik (Modell Camera Prog Res C14; Jena), Compix Inc. (Modell Simple PCI; Cranberry Township, USA) und PCO (Modell Camware; Kelheim/Altmühltal).

2.1.8 Medien, Puffer und Lösungen

2.1.8.1 Tierbiologische Experimente

Avertin Stock-Lösung 5.6 M 2,2,2 Tribromoethanol in tertiärem Amylalkohol bei 65°C lösen

Avertin (final) 67 mM Avertin-Stock-Lösung in 0.9% NaCl

2.1.8.2 Zellkultur

Standard-Medium DMEM mit 4.5 g/L D-Glucose, 110 mg/L Na-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin (GlutaMAX[™])
10% FKS
1x Penicillin/Streptomycin (1 U/mL Penicillin, 10 μ g/ml Streptomycin)

ES-Zell-Medium DMEM mit 4.5 g/L D-Glucose, 110 mg/L Na-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin (GlutaMAX[™])
20% FKS
1x nicht-essentielle Aminosäuren,
100 mM 2-Mercaptoethanol
1000 U/mL LIF

Flush-Medium	94.66 mM NaCl 23.28 mM Na-Laktat 20.85 mM Hepes 5.56 mM Glucose 4.78 mM KCl 4.15 mM NaHCO ₃ 1.19 mM KH ₂ PO ₄ 1.19 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O 1.17 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.33 mM Na-Pyruvat
PC12-Medium	DMEM mit 4.5 g/L D-Glucose, 110 mg/L Na-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin (GlutaMAX™) 10% Pferdeserum 5% FKS
Retinsäure	10 mM all-trans Retinsäure in 95% Ethanol
1x Trypsin/EDTA	500 mg/L Trypsin, 200 mg/L EDTA in 1x PBS

2.1.8.3 Molekularbiologie

Anzucht von E.coli - Kulturen

LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl H ₂ O dest. auf 1 L ergänzen
LB-Platten	15 g Bacto Agar 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl H ₂ O dest. auf 1 L ergänzen
LB ⁺ -Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 20 mM MgSO ₄ 10 mM KCl H ₂ O dest. auf 1 L ergänzen
TFB 1	100 mM RbCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 25 mM KAc 10 mM CaCl ₂ 15% Glycerin pH 5.8 mit 5% Essigsäure einstellen, sterilfiltrieren, Glycerin hinzugeben
TFB 2	10 mM MOPS pH 7.0 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15% Glycerin
Ampicillin-Stocklösung	50 mg /mL in H ₂ O dest.
Kanamycin-Stocklösung	10 mg/mL in H ₂ O dest.

Tetracyclin-Stocklösung 5 mg/mL in 100% Ethanol

Isolierung, Reinigung und Analyse von DNA

DNA-Lysepuffer	100 mM Tris-Cl pH 8.0 5 mM EDTA pH 8.0 0.2% SDS 20 mM NaCl 100 µg/mL Proteinase K (frisch dazugeben)
Puffer P1	50 mM Tris-Cl pH 8.0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer P2	200 mM NaOH 1% SDS (w/v)
6x Probenauftragspuffer	0.2% Orange G 60.0% Glycerin 60 mM EDTA pH 8.0
50x TAE	2 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan 50 mM EDTA pH 8.5 mit Essigsäure
1x TE	10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan 1 mM EDTA pH 8.0

Southern Blot und Hybridisierung

Denaturierungslösung	500 mM NaOH 1.5 M NaCl
Neutralisierungslösung	500 mM Tris-Cl pH 7.0 1.5 M NaCl
20x SSC	3 M NaCl 300 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
NaPi	500 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 0.34% H ₃ PO ₄
Church-Puffer	500 mM NaPi 7% SDS 1% BSA Fraktion V 100 µg/mL Lachs Spermien DNA bei 70°C lösen
Church-Wash	40 mM NaPi 1% SDS

Isolierung, Reinigung und Analyse von RNA

20x MOPS Laufpuffer pH7.0	800 mM MOPS 200 mM Natrium-Acetat 20 mM EDTA
PCI	Phenol (25) : Chloroform (24) : Isoamylalkohol (1)
10x RNA-Probenpuffer	50% Glycerin 10 mM EDTA pH 8.0 0.25% Xylencyanol

2.1.8.4 Hefemedien und Lösungen

PTL	40% PEG 1x TE 100 mM Litium-Acetat
TLS	1 M Sorbitol 1x TE 100 mM Litium-Acetat
Lyse-Puffer	100 mM NaCl 1 mM EDTA 2% TritonX-100 1% SDS
Overlay Lösung 1	50 mL 500 mM NaPi pH 7.0 1 mL 10% SDS 1 mL 1M KCl 100 µL 1 M MgCl ₂ Unter Rühren auf 40°C erwärmen
Overlay Lösung 2	600 mg LM-Agarose in 30 mL H ₂ O dest. aufkochen, auf 5°C abkühlen
Overlay Lösung final	Overlay Lösung 1 (52.1 mL, s.o.) und Overlay Lösung 2 (30 mL, s.o.) mischen, auf 100 mL ergänzen, 400 µg/mL X-Gal hinzugeben
X-Gal Stock-Lösung	25 mL Z-Puffer 68 µL β-Mercaptoethanol 400 µL 20 mg/mL X-Gal in DMF
Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 40 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O pH 7.0, autoklavieren

2.1.8.5 Biochemie und Zellbiologie

SDS-PAGE und Immunoblotting

RIPA-Puffer	0.1% SDS 1% Natrium-Desoxycholat 1% TritonX-100 50 mM Tris-Cl pH 8.0 150 mM NaCl 10 mM EDTA 1 Tablette Complete Mini EDTA free Proteinase Inhibitor Cocktail (Roche, Penzberg)/10 mL RIPA-Puffer
10x Laufpuffer	250 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan 2 M Glycin 1% SDS
Kernextrakt-Lysispuffer 1	10 mM Hepes-KOH pH 7.9 10 mM KCl 100 mM EDTA 10 mM EGTA 1 mM DTT

Kernextrakt-Lysispuffer 2
 20 mM Hepes-KOH pH 7.9
 400 mM NaCl
 1 mM EDTA
 1 mM EGTA
 1 mM DTT

SDS-Polyacrylamid-Gele

Trenngel-Komponenten	10%	12.5%
30% Acrylamid, 0.8% Bis-Acrylamid	3.8 mL	4.16 mL
1.5 M Tris-Cl pH 8.8	5.0 mL	2.5 mL
TEMED	8 µL	10 µL
10% APS	80 µL	100 µL
H ₂ O dest.	1.2 mL	3.22 mL
Sammelgel-Komponenten	3.4%	
30% Acrylamid, 0.8% bis-Acrylamid	577 µL	
0.5 M Tris-Cl pH 6.8	2.5 mL	
TEMED	7 µL	
10% APS	67 µL	
H ₂ O dest.	1.96 mL	

6x Laemmli-Probenpuffer
 375 mM Tris-Cl pH 6.8
 2% SDS
 30% β-Mercaptoethanol
 60% Glycerin
 0.012% Bromphenolblau

Coomassie-Färbelösung
 40% Methanol
 10% Essigsäure
 0.1% Coomassie brilliant blue G-250

Transfer-Puffer
 25 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan
 200 mM Glycin
 20% Methanol

1x TBS pH 7.4
 150 mM NaCl
 50 mM Tris-Cl

Ponceau S
 0.1% (w/v) Ponceau S
 5% (v/v) Essigsäure

TBST
 0.05% Tween-20 in 1x TBS

Stripping-Buffer
 62.5 mM Tris-Cl pH 6.7
 2% (w/v) SDS
 100 mM β-Mercaptoethanol

GST-Pulldown

Puffer A
 50 mM Tris-Cl, pH7.4
 5 mM MgCl₂
 50 mM NaCl

Puffer A⁺
 PufferA
 1 mM PMSF
 1 mM DTT
 1 Tablette Complete Mini EDTA free Proteinase Inhibitor Cocktail (Roche, Penzberg)/10 mL Puffer A⁺

HBB-Puffer
20 mM Hepes pH 7.8
100 mM KCl
5 mM MgCl₂

HBB⁺-Puffer
20 mM Hepes pH 7.8
100 mM KCl
5 mM MgCl₂
500 nM DTT
0.5% NP-40

HBB⁺300-Puffer
20 mM Hepes pH 7.8
300 mM KCl
5 mM MgCl₂
500 nM DTT
0.5% NP-40

ELISA-Assay

0.1 M Phosphat-Puffer pH 6.8
51 mM NaH₂PO₄·xH₂O
49 mM Na₂HPO₄·x2H₂O

Substrat-Lösung
1 mg/mL 5-Aminosalicyl-Säure
20 mM Phosphat-Puffer pH 6.8

2.1.8.6 Histologie

Nachweis des LacZ-Reportergens in situ

100 mM Phosphat-Puffer pH 7.3
11.5 mM NaH₂PO₄
38.5 mM Na₂HPO₄

Fixierungslösung
0.2% Glutaraldehyd
5 mM EGTA pH 7.3
2 mM MgCl₂
in 100 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7.3

Wasch-Puffer
2 mM MgCl₂
0.02 % NP-40
in 100 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7.3

X-Gal Färbelösung
1 mg/mL X-Gal
5 mM K₄Fe(CN)₆·x3H₂O
5 mM K₃[Fe(CN)₆]
in Wasch-Puffer

Immunfärbungen

10x PBS
1.37 M NaCl
27 mM KCl
43 mM Na₂HPO₄·x7H₂O
14 mM KH₂PO₄
pH 7.4 mit HCl

10x Citratpuffer pH 6.0
100 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
100 mM Citronensäure-Monohydrat

ABC-Lösung
1 Tropfen Lösung A, 1 Tropfen Lösung B in 2.5 mL 1x PBS

DAB-Färbelösung	500 mM Tris-Cl pH 7.6 750 µM DAB-Stock 1 0.006% DAB-Stock 2
DAB-Stock 1	15 mM 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DAB-Stock 2	5% H ₂ O ₂ in H ₂ O dest.
DAPI-Stock	3 mM 4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid in DMSO
Evanol	<ul style="list-style-type: none"> • 12g Mowiol (Hoechst) in 30 mL H₂O lösen • 60 mL 200 mM Tris-Cl pH 8.5 und 30 g Glycerin hinzugeben, 10 min bei 56°C lösen • 15 min bei 5.000xg pelletieren • Überstand mit 2 g DABCO (Sigma) versetzen • In 500 µL Aliquots bei -20°C lagern

Radioaktive in situ Hybridisierung

Hybridisierungs-Mix	50% redestilliertes Formamid 10% Dextran Sulfat (Natrium-Salz) 10 mM Tris-Cl pH 8.0 2x SSC 5 mM EDTA 150 µg/mL tRNA 150 µg/mL Lachsspermien DNA 10 mM DTT 10 mM β-Mercaptoethanol <ul style="list-style-type: none"> • Formamid mit Dextran Sulfat mischen, vortexen und bei 50°C lösen • restliche Bestandteile hinzugeben, in 1 mL Aliquots bei 20°C lagern
---------------------	--

Digoxigenin in situ Hybridisierung auf Paraffin-Schnitten

Hybridisierungs-Mix	2x SSC 10% Dextran-Sulfat (Natrium-Salz) 0.01% Lachsspermien DNA 0.02% SDS 50% Formamid
Blockierungslösung	2% Blocking Reagenz 10% normales Schaf-Serum 0.1% Tween-20 in 1x TBS-DEPC

Whole mount Digoxigenin in situ Hybridisierung

Hybridisierungs-Mix	50% (v/v) redestilliertes Formamid 5x SSC pH 4.5 50 µg/ml tRNA 1% SDS 50 µg/mL Heparin
Wasch-Lösung 1	50% (v/v) Formamid 4x SSC pH 4.5 1% SDS
Wasch-Lösung 2	500 mM NaCl 10 mM Tris pH 7.5 0.1% Tween-20

Wasch-Lösung 1 + Lösung 2	50% Lösung 1 50% Lösung 2
Wasch-Lösung 3	50% (v/v) Formamid 2x SSC pH 4.5
Maleinsäure- (MAB) Puffer	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl 0.1% Tween-20 2 mM Levamisole
NTMT pH 7.5	100 mM NaCl 100 mM Tris-Cl pH 9.5 50 mM MgCl ₂ 0.1% Tween-20

2.1.9 Vektoren und Konstrukte

Vektor	Insert	Referenz
Klonierungs- und Shuttle-Vektoren		
pBSIISK	-	Stratagene, La Jolla, USA
pBSIIKS	-	Stratagene, La Jolla, USA
pGEM3	-	Promega, Mannheim
pCMX-PL1	-	Umesono et al., 1991
pWH9	NTR-β-Gal-polyA-neo	M. Moser, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
pCR [®] II-TOPO		Invitrogen, Karlsruhe
pCR [®] -Blunt II-TOPO		Invitrogen, Karlsruhe
pCMV-Tag2b		Stratagene, La Jolla, USA
AP-2δ-Konstrukte		
pSP64-mAP-2δ	mAP-2δ cDNA	M. Moser, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
pCMX-PL1-mAP-2δ	mAP-2δ cDNA	Diese Arbeit
pBSIISK-mAP-2δ spec	mAP-2δ cDNA Fragment des 1./2. Exons	M. Moser, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
pBSIIKS-mAP-2δ spec	mAP-2δ cDNA Fragment des 1./2. Exon	Diese Arbeit
pBSIISK-mAP-2δ-Genlokus : pBSIISK (ΔSpeI/XbaI/XhoI)- mAP-2δ StuI Fragment	7.3 kb StuI-StuI genomisches DNA Fragment des mAP-2δ-Lokus	Diese Arbeit
Externe Probe : pBSIISK-StuI-EcoRV	StuI-EcoRV genomisches DNA Fragment des mAP-2δ-Lokus	Diese Arbeit
„Targeting Vector“: pBSIISK (ΔSpeI/XbaI/XhoI)- mAP-2δ StuI (XhoI in SpeI)- Sall in XhoI NTR-β-Gal-polyA-neo Fragment	7.3 kb StuI-StuI genomisches DNA Fragment des mAP-2δ-Lokus mit NTR-β-Gal-polyA-neo Insert	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Referenz
Vektoren und Konstrukte für das Yeast-two Hybrid-System		
pGBKT7	GAL4 DBD	Clontech ¹
pGBKT7-mAP-2δ TA	GAL4 DBD-mAP-2δ TA (nt: 4-628)	Diese Arbeit
pACT-2	GAL4 TA	Clontech ¹
pACT-2-cDNA library (adult mouse brain)	GAL4 TA-cDNA Hirn Bank adulter BALB/c-Mäuse	Diese Arbeit
pCL-1	GAL4 Protein	Clontech ¹
pGEX-3x	-	Amersham ²
pGEX-3x-mAP-2δ TA	mAP-2δ TA	Diese Arbeit
pGEX-3x-mAP-2δ DBD	mAP-2δ DBD (nt: 598-1359)	Diese Arbeit
pGEX-3x-hAP-2α TA	hAP-2α TA	Diese Arbeit
pHA-hCyclinC	hCyclinC	E. Keidel, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
pCR [®] II-TOPO-mNFAT1-D spex	mNFAT-1D 3'ISH probe	Diese Arbeit
pCMV-Tag2b-NFAT1-D	mNFAT-1D full length cDNA	Diese Arbeit
pCMX-PL1-NFAT-1D	mNFAT-1D 700 bp cDNA fragment	Diese Arbeit
pCMX-PL1-FoxG1	mFoxG1 880 bp cDNA fragment	Diese Arbeit

¹Clontech, Palo Alto, USA; ²Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England

2.1.10 Primer und Oligonukleotide

Genotypisierungsprimer	
mAP2δ1 sense	5'-AAT GCA TCG TAA GCT TTT GGA G-3'
AP2δ-ko-as1	5'-GGA GGA GAG TTG CCC TCC CTG CG-3'
PGK PolyA down	5'-CTG CTC TTT ACT GAA GGC TCT TT-3'
Sequenzierprimer	
AP-2δseq-s	5'-TTA TTA ACC TGC ACA ATG CGC G-3'
AP2δseq-as	5'-GGC GAG ATG CTC TCC CAC TGC C-3'
pGBKT7 seq rev	5'-TAA GAG TCA CTT TAA AAT TTG TAT-3'
pcDNA 1.1/Amp fw seq	5'-TCT CTG GCT AAC TAG AGA AC-3'
Gal4 AD seq sense	5'-TAC CAC TAC AAT GGA TG-3'
pGEX-3x seq fw	5'-CCT TTG CAG GGC TGG CAA GC-3'
pGEX-3x seq rev	5'-CGC TTA CAG ACA AGC TGT GAC C-3'
T7 seq fw	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG-3'
RT-PCR-Primer	
mAP2αRT s	5'-ACC AGC AAC GGG ACG GCA CGG-3'
mAP2αRT as	5'-TGG CGG AGA CAG CAT TGC TGT TG-3'
mAP2βRT s	5'-GAA GTG GGC TCA GAA GCC GGC T-3'

RT-PCR-Primer

mAP2 β RT as	5'-AAT GAC TGA CTG GTC CAA TAG G-3'
mAP2 γ RT s	5'-CCT GGA TTT AAC TGG CGA CT-3'
mAP2 γ RT as	5'-CCT CCA GCC CTG AAA TAT GG-3'
mAP-2 δ sense	5'-TGG AGA AAC CCA TCA TGT CAA C-3'
mAP-2 δ anti	5'-GGC AGG AGT CTT TGA TCT GGG-3'
mAP-2 ϵ spec sense	5'-CAA GCA TCG GAA GTA ACT GGC-3'
mAP-2 ϵ spec anti	5'-CAC CTC TGA TGT GTT ATC AGC-3'
GAPDH sense	5'-AGC CAC ATC GCT CAG AAC AC-3'
GAPDH anti	5'-GTT CTA GTA GTC GTT ACG GAG-3'
β -Actin sense	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AA-3'
β -Actin anti	5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'

Primer für das Yeast-two Hybrid System

AP-2 δ TA EcoRI	5'-CAT GAA TTC TCA ACT ACC TTT CCC GGA CTA GTC-3'
AP-2 δ TA BamHI	5'-GAT GGA TCC AGT CTG TGG GGT TGA CTA CAC AGG-3'
AP-2 δ DBD SmaI fw	5'-CAT CCC GGG GGT GGC ACC TGT GTA GTC AAC CCC-3'
AP-2 δ DBD EcoRI rev	5'-CAT GAA TTC CTA GTC TGT CTT TTC TGT TTT GCC-3'
hAP2 α TA fw	5'-CAT GAA TTC AAT GCT TTG GAA ATT GAC GGA TAA TAT C-3'
hAP2 α TA rev	5'-CAT GAA TTC GTT GGG GTT CAC CAC GCC GCC-3'
NFAT1-D fw	5'-GGA CCT GCA GGG ACC TGT GAG-3'
NFAT1-D rev	5'-AGG GCA GAA TGT TAC AGA GAA-3'

Linker

BamHI in EcoRI	5'-AAT TGG ATC C-3'
BamHI in NcoI	5'-CAT GCG GAT CCG-3'
EcoRV in SpeI	5'-CTA GGA TAT C-3'
Sall in EcoRI	5'-AAT TGT CGA C-3'
XhoI in SpeI	5'-CTA GCT CGA G-3'

2.1.11 Organismen

I. Verwendete Labor-Mausstämme

Mäuse der Linien SV129, C57Bl/6 und CD-1 stammen aus der Zucht des Tierstalls des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried unter der Leitung von Dr. H. Brandstetter.

Adhärente eukaryontische Zelllinien

P19	McBurney and Rogers, 1982
HeLa	Scherer et al., 1953
HepG2	Morris et al., 1982
NIH/3T3	Jainchill et al., 1969; Copeland et al., 1979
PC12	Greene and Tischler, 1976

Die Zelllinien P19 und PC12 wurden von der Abteilung Molekularbiologie (Prof. Dr. A. Ullrich) des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried zur Verfügung gestellt.

E.coli-Stämme

XL1-blue	Stratagene, La Jolla, USA Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, Lac [F', proAB, lacI ^q Z.M15, Tn10 (Tet ^r)]
BL21	Stratagene, La Jolla, USA Genotyp: F', ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻), gal, dcm

Hefestamm AH109

Clontech, Palo Alto, USA	
Genotyp	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ, gal80 Δ
Reportergene	LYS2::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -HIS3 GAL2 _{UAS} -GAL2 _{TATA} -ADE2 URA3::MEL1 _{UAS} -MEL1 _{TATA} -lacZ
Auxotrophe Marker	TRP1, LEU2

2.1.12 Antikörper

Antikörper wurden von den Firmen Geneka (AP-2α; Montreal, Kanada), Chemicon (β-TSH, NeuN, LHRH, ACTH, GH; Temecula, USA), Dako (GFAP; Hamburg), Roche (BrdU, DIG-AP; Penzberg), Cell Signaling/New England Biolabs (Influenza Hemagglutinin, human Cleaved Caspase3 (Asp175); Frankfurt am Main), Abcam (Tubulin YL1/2; Cambridge, UK), Biorad (HRP-gekoppelte Sekundäntikörper; München), Molecular Probes/Invitrogen (Alexa Fluor-Sekundäntikörper; Karlsruhe), Vector Laboratories (Biotin-gekoppelte Sekundäntikörper; Burlingame, USA) oder vom NIDDK (LH, FSH; UCLA, Los Angeles, USA) bezogen. Die polyklonalen Peptidantikörper gegen die AP-2 Isoformen β, γ und δ wurden in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Markus Moser in der Abteilung Molekulare Medizin am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) generiert.

Primäntikörper für die Immunhistologie

Antikörper	Verdünnung	Vorbehandlung
Kaninchen anti hAP-2α	1:200	5x 5 min 10 mM Citratpuffer pH 6.0 (Mikrowelle), Blockieren: 6 Stunden in 10%Ziegenserum/1%BSA/ 0.1% TritonX-100
Kaninchen anti mAP-2β	1:2.500	“
Kaninchen anti mAP-2γ	1:2.500	“

Primärantikörper für die Immunhistologie

Antikörper	Verdünnung	Vorbehandlung
Kaninchen anti mAP-2 δ	1:2.500	“
Kaninchen anti mNeuN	1:500	“
Maus anti hGFAP	1:50	“
Kaninchen anti rLH	1:500	Blockieren: 60 min in 10% Ziegenserum/1%BSA/ 0.1% TritonX-100
Kaninchen anti rFSH	1:500	“
Kaninchen anti β -TSH	1:1000	“
Kaninchen anti ACTH	1:1000	“
Kaninchen anti GH	1:1000	“
Kaninchen anti LHRH	1:1000	“
Maus anti BrdU~POD	1:30	20 min 4 N HCl, 20 min 0.1% Trypsin/0.1% CaCl ₂ , 3x 5 min blockieren in 0.5% BSA/0.1% Tween-20
Kaninchen anti human Cleaved Caspase-3	1:200	10 min 0.2% TritonX-100, 3x 5 min 10 mM Citratpuffer pH 6.0 (Mikrowelle), Blockieren: 60 min in 5% Ziegenserum/0.1% Tween-20

Primärantikörper für Immunoblots

Antikörper	Verdünnung
Kaninchen anti mAP-2 α	1:1.000
Kaninchen anti mAP-2 δ	1:5.000
Maus anti HA	1:1.000
Ratte anti Tubulin YL1/2 tyrosinated	1:10.000

Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Anwendung
Ziege anti Maus~Alexa Fluor 568		
Ziege anti Kaninchen~Alexa Fluor 488	1 : 500	Immunfluoreszenz auf Zellen oder Paraffinschnitten
Ziege anti Kaninchen~Alexa Fluor 568		
Ziege anti Ratte~Alexa Fluor 633		
Ziege anti Maus~Biotin	1:200	DAB-Färbung
Ziege anti Kaninchen~Biotin		
Ziege anti Maus~HRP	1:10.000	Immunoblotting
Ziege anti Kaninchen~HRP		

2.2 Methoden

2.2.1 Tierbiologische Experimente und Techniken

2.2.1.1 Tierhaltung

Zucht und Haltung der für tierbiologische Experimente vorgesehenen Mäuse erfolgte unter SPF- (spezifiziert Pathogen-frei) Bedingungen in der Tierhaltungsanlage des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried. Ein Tag/Nacht-Rhythmus wurde durch 12-stündige Licht/Dunkel-Perioden simuliert. Jungmäuse wurden im Alter von 4 Wochen von den Elterntieren getrennt, durch Ohrmarken gekennzeichnet und in Käfigen getrennt nach Geschlecht gehalten. Zur genotypischen Analyse wurde ihnen gleichzeitig zum Setzen der Ohrmarke die Schwanzspitze entfernt. Zur Zucht wurden geschlechtsreife Tiere im Alter von mindestens 8 Wochen verwendet.

2.2.1.2 Superovulation

Studien ergaben, daß die Gonadotropin-vermittelte Stimulation fertiler Mäuseweibchen zu einer erhöhten Anzahl ovulierter Eizellen führt (Hogan et al., 1994). C57BL/6-Weibchen reagieren im Alter von 25 Tagen am effizientesten auf eine hormonelle Stimulation durch PMSG und hCG. PMSG wurde am ersten Tag intraperitoneal injiziert und stimuliert als FSH-Ersatz die Follikelreifung. Im Abstand von 46 bis 48 Stunden wurde hCG injiziert, welches identisch zum Hypophysen-LH den Eisprung auslöst. Der Eisprung erfolgte 10 bis 13 Stunden nach der hCG-Injektion. Die so hormonell stimulierten Weibchen wurden am Abend der hCG-Injektion mit fertilen Männchen im Verhältnis 1:1 verpaart. Eine erfolgreiche Verpaarung wurde am nächsten Morgen anhand eines Vaginalpfropfes festgestellt. Am Tag 3.5 post coitum wurden die Weibchen durch zervikale Dislokation getötet, der Uterus wurde herauspräpariert und vom Mesometrium getrennt. Die beiden Enden des Uterus wurden angeschnitten und mithilfe einer Kanüle, die durch die Zervix in den freien Uterus-Arm geschoben wurde, wurden die enthaltenen Blastozysten mit einer Spüllösung (PBS oder Flush-Medium) aus dem Uterus hinausgespült.

2.2.1.3 Bestimmung der Zyklus-Phase

Mithilfe der Analyse des Vaginalsekrets wurde die Zyklus-Phase anhand der Zusammensetzung der Zellpopulationen im Sekret bestimmt. Dazu wurden jeweils am Morgen eines jeden Tages zu einer festgelegten Uhrzeit Abstriche der Vagina von 8 Wochen alten AP-2 δ -defizienten und von Kontrollweibchen genommen. Gruppen von 4-6 Kontroll- oder AP-2 δ -defizienten Weibchen wurden mit einem geschlechtsreifen Männchen in einem Käfig durch ein Trenngitter separiert gehalten. Dieses Trenngitter verhinderte den Körperkontakt zwischen den Weibchen und dem Männchen, ermöglicht jedoch eine visuelle, auditorische und vor allem olfaktorische Wahrnehmung des Männchens. Diese spezielle Käfigvorrichtung war notwendig, da frühe Studien mit in Gruppen gehaltenen Mäuseweibchen zeigten, daß sich die Zyklusdauer verlängern kann (Lee-Boot-Effekt; van der Lee und Boot, 1955; van der Lee und Boot, 1956). Dieser Effekt kann durch den Zusatz eines geschlechtsreifen Männchens verhindert werden, da der Geruch des Männchens den Eintritt in die Estrus-Phase induzieren und den Zyklus der Weibchen synchronisieren kann (Whitten-Effekt; Whitten, 1956; Whitten, 1958). Die Abstriche wurden zur Fixierung der Zellen kurz in Methanol getaucht und anschließend mit Hämalaun und Eosin gefärbt. Die zelluläre Zusammensetzung des Abstrichs wurde unter einem Mikroskop untersucht.

2.2.1.4 Retrobulbäre Blutentnahme zur Serumgewinnung

Zur Blutentnahme aus dem Auge (retrobulbär) wurde ein Becherglas mit Isoflo[®] (Abbott Laboratories, Kent, UK) getränktem Zellstoff ausgelegt. Die Mäuse wurden in diesem Becherglas so lange narkotisiert, bis die Atmung stoßweise erfolgte. Die narkotisierte Maus wurde entnommen, eine Kapillare (Mikro-Hämatokrit-Kapillare; Brand, Wertheim) wurde in den Augenwinkel eingeführt und drehend in das Venengeflecht im Inneren der Augenhöhle eingestochen. Das in der Kapillare aufsteigende Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen,

eine Stunde bei 37°C inkubiert, 5 min bei 2.500 rpm abzentrifugiert und das den Überstand bildende Serum wurde bei -80°C für die folgenden Untersuchungen aufbewahrt.

2.2.1.5 Perfusion

Vor der Perfusion wurden die Tiere durch die intraperitoneale Injektion mit einer letalen Dosis Avertin betäubt. Die Dosierung des Avertins richtete sich nach dem Körpergewicht des Tieres; dabei galt die Formel: 25 µL der finalen Avertin-Konzentration/g Körpergewicht. Dabei mußte die Dosis erfahrungsgemäß um den Faktor 1.3 erhöht werden, um die Tiere terminal zu betäuben. Sobald das Tier nach der Betäubung keine Reaktion auf einen Berührungsreiz erwiderte, wurde es in Rückenlage auf dem Perfusionstisch fixiert. Das Bauchfell wurde auf beiden Seiten bis zum Hals geöffnet und vom darunterliegenden Bindegewebe getrennt. Der Brustkorb wurde mit einer am Sternum angesetzten Pinzette etwas in die Richtung des Kopfes gezogen, das Zwerchfell mit einem Skalpell eingeschnitten und vom Brustkorb abgetrennt. Durch zwei seitliche Scherenschnitte wurde der Brustkorb vollständig geöffnet, in Richtung des Kopfes aufgeklappt und mit zwei Klammern fixiert. Die Lunge durfte bei der Öffnung des Brustkorbs nicht verletzt werden. Anschließend wurde der Herzbeutel mit einer Pinzette geöffnet und abgezogen. Zu diesem Zeitpunkt sollte das Herz noch sichtbar schlagen, um eine möglichst gute Fixierung des Gewebes zu erreichen. Um das Gewebe vor der Fixierung von Blutbestandteilen zu säubern, wurde zunächst eine Spüllösung (1x PBS) durch den Körper des Tieres geleitet. Bei laufender Pumpe (Peristaltische Pumpe LKB 1; Pharmacia LKB, Freiburg), wurde der linke Ventrikel punktiert, indem das Herz mit einer stumpfen Pinzette gehalten wurde und eine Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt wurde. Unmittelbar danach wurde der rechte Vorhof durch einen Schnitt geöffnet, damit das Blut, bzw. die Spüllösung nach der Zirkulation wieder aus dem Körper austreten kann und der entstehende Druck nicht zum Platzen von Gefäßen führt. Die Perfusion verläuft erfolgreich, wenn sich die Leber während der Perfusion entfärbt, da der große Körperkreislauf vollständig durchströmt wird. Tritt nur noch klare Flüssigkeit aus dem Tier aus, wurde die Fixierungslösung (4% PFA) eingeleitet. Ein weiterer Hinweis auf eine erfolgreiche Perfusion stellt das Verkrampfen des Tieres beim Einströmen der Fixierungslösung dar. Eine vollständige Perfusion wurde erreicht, wenn der Tierkörper völlig versteift ist. Das perfundierte Tier kann anschließend für weitere Präparationen verwendet werden.

2.2.1.6 Entkalken von Knochen

Um Paraffinschnitte von Knochen anzufertigen, wurden diese vorher entkalkt. Dazu wurden die Hinterläufe zuvor getöteter Mäuse möglichst bis zum Ansatz des Femurs in der Hüftregion extrahiert, die Haut wurde entfernt und die extrahierten Hinterläufe wurden in 4% PFA fixiert. Beginnend mit dem nächsten Tag wurden die Knochen für 5 Tage in 10% EDTA entkalkt. Um ein Ausfallen des EDTAs durch Ethanol zu vermeiden, wurden die Knochen zunächst in 1x PBS gespült, anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und so für die Anfertigung von Paraffinschnitten vorbereitet.

2.2.2 Zellkultur adhärenter Säugerzellen

Falls nicht anders aufgeführt, wurden alle verwendeten Zelllinien in Standard-Medium bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 85% und 5% CO₂ kultiviert. Zur Passage der Zellen wurden diese nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS durch 1 mL 1x Trypsin/EDTA pro 10 cm-Schale trypsinisiert. Die abgelösten Zellen wurden in 7 mL Medium aufgenommen und 5 min bei 900 rpm sedimentiert. Das Zellpellet wurde in Medium aufgenommen, im Verhältnis 1:5 oder 1:10 in vorgelegtem Medium verdünnt und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.2.1 Kryokonservierung

Um adhärenente Zellen einzufrieren, wurden die Zellen wie gewohnt trypsinisiert, in Medium aufgenommen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium mit 10% DMSO aufgenommen, erneut resuspendiert und auf bereitgestellte, gekühlte 1.5 mL Cryo-Röhrchen verteilt. Die Zellen wurden zunächst bei -80°C eingefroren und bei längerer Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.2.2 Revitalisierung kryokonservierter Zellen

Werden die eingefrorenen Zellen benötigt, so wurde das jeweilige Röhrchen schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, die Zellen wurden mit 7 mL frischem Medium versetzt, in ein Röhrchen überführt und 5 min bei 900 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen wurden in einem geeigneten Volumen mit frischem Medium resuspendiert und in ein neues Kulturgefäß überführt.

2.2.2.3 Transiente Transfektion mittels Lipofectamine® Reagens

Zellen (NIH/3T3, HeLA oder HepG2) wurden transient mit 1 bis 10 µg Plasmid-DNA mithilfe des Lipofectamine® Reagens transfiziert. Die Zellen waren am Tag zuvor mit einem Neubauer-Hämatocytometer (Merck, Darmstadt) gezählt und in einer bestimmten Dichte in geeigneten Zellkulturschalen ausgesät worden. Die Transfektion erfolgte anhand des Hersteller-Protokolls in Serum-freiem Medium. Drei bis 6 Stunden nach der Transfektion erhielten die Zellen frisches, Serum-haltiges Medium.

2.2.2.4 Induktion von P19-Zellen durch Retinsäure

Die P19-Teratocarcinoma-Zelllinie stammt aus einem embryonalen Karzinom von C3H/He-Mäusen (McBurney and Rogers, 1982). Die Zellen sind pluripotent und können durch die Zugabe von Retinsäure in neuronale und Gliazellen differenziert werden (Jones-Villeneuve et al., 1982). Dazu wurden P19-Zellen in einer Dichte von 2.5×10^6 Zellen/10 cm Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag begann die Induktion der Zellen durch die Zugabe von 1 µM Retinsäure ins Kulturmedium. Parallel dazu wurden Kontrollplatten ohne Retinsäure kultiviert. Nach 0, 0.5, 2, 6, 12 und 24 Stunden wurden die Zellen photographiert, mit 1x PBS gewaschen und durch Abschaben geerntet.

2.2.2.5 Induktion von PC12-Zellen durch NGF

Die PC12-Zelllinie wurde aus einem Tumor der Nebenniere (Pheochromocytoma) der Ratte generiert und kann durch NGF in neuronale Zellen differenziert werden (Greene and Tischler, 1976). Die Zellen wurden in speziellem PC12-Medium auf 10 cm Zellkulturschalen kultiviert, die 2-3 Stunden zuvor mit 1mg/mL Collagen I beschichtetet worden waren. Das Passagieren der Zellen erfolgte durch Abspülen der Zellen von der Collagen-Beschichtung. Zur Induktion der Zellen mit NGF wurden die Zellen in einer Dichte von 2.5 bis 10×10^4 Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurde den Zellen NGF (Mouse NGF 2.5S, Grade II; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) in einer Konzentration von 50 ng/ml in frischem Kulturmedium zugesetzt. Parallel dazu wurden Kontrollplatten ohne NGF kultiviert. Nach 0, 1, 2, 4 und 8 Tagen wurden die Zellen photographiert, mit 1x PBS gewaschen und durch Abschaben geerntet.

2.2.3 Kultur muriner embryonaler Stammzellen

Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) stammen aus der inneren Zellmasse von Blastozysten. Die Pluripotenz der ES-Zellen wird durch den Zusatz des leukemia inhibitory factors (LIF) im Medium aufrechterhalten. Für die Erzeugung der hier beschriebenen Mauslinie wurde die 15. Passage der murinen R1 ES-Zelllinie (Nagy et al., 1993) genutzt. Die Kultivierung der ES-Zellen erfolgte auf murinen embryonalen Fibroblasten (Feederzellen) in ES-Zell-Medium. Die ES-Zellen wurden jeden zweiten Tag passagiert und das Medium wurde täglich erneuert.

2.2.3.1 Präparation von murinen embryonalen Fibroblasten (Feederzellen)

Embryonale Feederzellen stellen eine Mischpopulation aus Zellen des Rumpfes 13 bis 14 Tage alter Mausembryonen dar. Der Hauptanteil der Zellen sind somit embryonale Fibroblasten. Sie dienen der Versorgung der ES-Zellen mit wichtigen Wachstumsfaktoren und helfen, einen undifferenzierten Zustand der Zellen aufrecht zu erhalten. Da bei der Kultivierung der ES-Zellen zur Selektion der homolog rekombinierten Stammzellen Neomycin, bzw. G418 als Selektionsmarker verwendet wird, müssen die Feederzellen ebenfalls eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum besitzen. Um dies zu erreichen, wurden Collagen 9-defiziente Männchen, die auf beiden Allelen ein Neomycin-Resistenzgen tragen, mit C57Bl/6 Weibchen verpaart (Fassler et al., 1994). Nach 13 bis 14 Tagen

wurden die trächtigen Weibchen durch Genickbruch getötet, der Bauchraum wurde geöffnet und der Uterus mit den Embryonen in PBS gelegt. Die folgenden Schritte wurden aus Gründen der Sterilität unter einem Laminair mit sterilen Instrumenten durchgeführt. Nach der Entfernung der Uteruswand und der Embryonalhüllen wurden der Kopf, sowie sämtliche inneren Organe entfernt. In kleinere Stücke zerteilt, wurden die Embryonen für 10 min bei 37°C in Trypsin/EDTA (1 mL/Embryo) inkubiert. Die angedauten Gewebestücke wurden schrittweise mit immer kleineren Pipetten durch mehrmaliges Resuspendieren zerkleinert. Der Verdau wurde durch Serum-haltiges Medium gestoppt und die größeren Gewebestücke wurden durch Gravitation von der homogenen Zellsuspension getrennt. Schließlich wurden die Zellen 5 min bei 1.000 rpm pelletiert, das Zellpellet wurde in frischem DMEM mit 10% FKS aufgenommen und pro Embryo auf je zwei T175-Zellkulturflaschen verteilt. Nach etwa 3-4 Tagen war ein konfluenter Zellrasen entstanden. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und trypsinisiert. Die Zellsuspension wurde in DMEM mit 10% FKS aufgenommen, bei 500xg für 10 min pelletiert, in 50 mL 1x PBS resuspendiert und einer γ -Strahlung von 40 Gray ausgesetzt, um die Zellteilung der Zellen zu unterbinden. Die bestrahlten Zellen wurden pelletiert, in DMEM mit 10% DMSO und 20% FKS aufgenommen, aliquotiert und eingefroren. Pro T175 Flasche wurden drei Aliquots eingefroren.

2.2.3.2 Elektroporation embryonaler Stammzellen

100 μg des „Targeting Vectors“ wurden durch einen Restriktionsverdau linearisiert, mittels Phenol/Chloroform-Extraktion von Proteinen befreit und in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS gelöst. Die ES-Zellen wurden wie beschrieben kultiviert und trypsinisiert. Die abgelösten Zellen wurden in ES-Zell-Medium aufgenommen, abzentrifugiert, in frischem ES-Zell-Medium resuspendiert und gezählt. Damit statistisch etwa jede Zelle eine Kopie der Plasmid-DNA erhält, wurden 15 μg DNA/ 10^7 Zellen eingesetzt. Nach mehreren Waschschritten in 1x PBS wurden die Zellen schließlich in der DNA-PBS-Lösung aufgenommen, resuspendiert und luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation der ES-Zellen erfolgte bei 800 V und 3 μF . Die elektroporierten Zellen wurden in 7 mL ES-Zell-Medium resuspendiert und auf sieben 10 cm-Schalen mit Feeder-Zellen verteilt.

2.2.3.3 Selektion Neomycin-resistenter ES-Zell-Klone, DNA-Präparation von ES-Zellen und Analyse rekombinanter Klone

Die Selektion Neomycin-resistenter ES-Zell-Klone begann 24 Stunden nach der Elektroporation mit 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Neomycin (G418) im ES-Zell-Medium und wurde für etwa 7 Tage bei täglichem Mediumwechsel fortgeführt, bis sichtbare ES-Zell-Klone entstanden waren. Einen Tag vor der Selektion von Einzelklonen wurden 15 Platten mit jeweils 24 Einzelschalen („24 well“) mit Feederzellen beschichtet. Die einzelnen ES-Zell-Klone wurden mit einer Pipette gepickt, in eine Mikrotiterplatte mit jeweils 96 Einzelschalen („96 well“) überführt und dort durch eine Inkubation in 150 μL Trypsin/EDTA bei 37°C für 5 min vereinzelt. Danach wurde die Zellsuspension in ES-Zell-Medium aufgenommen und jeder Einzelklon wurde in eins der 24 wells überführt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. 3-4 Tage nach erfolgter Vereinzelnung wurden die ES-Zell-Klone erneut trypsinisiert, in 1 mL Einfriermedium (ES-Zell-Medium mit 10% DMSO) aufgenommen und 700 μL dieser Zellsuspension wurden eingefroren. Um die verbleibenden Zellen der ES-Zell-Klone nach dem Einfrieren für eine anschließende DNA-Analyse nutzen zu können, wurde den 24 well-Platten frisches ES-Zell-Medium zugesetzt. Dieses Medium wurde am nächsten Tag durch frisches ES-Zell-Medium ersetzt, um toxische Spuren des DMSO zu beseitigen. Nach einem weiteren 3-4 tägigen Wachstum der ES-Zellen wurde das verbrauchte, gelbliche Medium entfernt und die Zellen wurden $\times 10^6$ mit 500 μL DNA-Lyse-Puffer bei 37°C inkubiert. Die ES-Zell-DNA wurde mit 500 μL Isopropanol gefällt, auf eine Pipettenspitze gezogen und in 200 μL TE bei 55°C und 900 rpm $\times 10^6$ gelöst. 26 μL der gelösten DNA wurden mit 40 U Restriktionsenzym geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Southern Blot auf eine Nylonmembran transferiert. ES-Zell-Klone, bei denen der „Targeting Vector“ homolog rekombiniert hatte, wurden mithilfe der externen Probe detektiert.

2.2.3.4 Injektion und Transfer von ES-Zellen in murine Blastozysten

Am Morgen des Tages 3.5 post coitum wurden die Uteri von trächtigen C57BL/6-Weibchen nach Genickbruch präpariert und die Blastozysten wurden mit Flush-Medium herausgespült. Befanden sich einige Embryonen noch im Morula-Stadium, so wurde bis zur Injektion noch etwa 3 Stunden gewartet.

ES-Zell-Klone, bei denen im Southern Blot das rekombinante Allel nachgewiesen wurde, wurden selektiert, aufgetaut und zum Zweck der Mikroinjektion kultiviert. Kurz vor der Injektion wurden sie trypsinisiert und in ES-Zell-Medium aufgenommen. Die Injektion der ES-Zell-Klone in die gewonnenen Blastozysten wurde durch PD Dr. Markus Moser vorgenommen: Die ES-Zellen wurden unter einem Mikroskop mittels einer feinen Kapillare in das Blastozoen der Blastozysten injiziert. Kurz nach der Injektion kollabierten die injizierten Blastozysten und die ES-Zellen vermischten sich mit den Embryonalzellen der Blastozyste. Einige Stunden später erfolgte der Transfer der chimären Embryonen in scheinträchtige CD-1 Empfänger-Weibchen. Zu diesem Zweck wurden die Weibchen üN mit vasktomierten Männchen verpaart, der Erfolg der Verpaarung wurde anhand des Vaginalpfropfes (Plug) überprüft und die erfolgreich verpaarten, „geplugten“ Weibchen gesondert gehalten. Nach 3 Tagen wurden die Weibchen betäubt, ein kleiner Schnitt am Rücken zwischen Rippen und Hüfte in der Höhe der Ovarien durchgeführt und der Uterus am Fettpolster des Ovars leicht herausgezogen. Mit einer Nadel wurde ein Loch in die Uteruswand gestochen und die Blastozysten wurden mit einer Glaskapillare in den Uterus transferiert. Der Schnitt wurde mit einer Klammer versorgt. Etwa 18 Tage nach dem Uterustransfer wurden die chimären Mäuse geboren. Nach ca. einer Woche konnte der Chimärismus anhand des Verhältnisses von agouti-farbiger, brauner (SV129) und schwarzer (C57Bl/6) Fellfarbe geschätzt werden. Um die Weitergabe des ES-Zell-Erbgutes durch die Keimbahn zu prüfen, wurden hoch-chimäre Männchen mit C57Bl/6-Weibchen verpaart. Agouti-farbige Nachkommen (F1-Generation) wurden mittels Southern Blot Analyse analog zu den ES-Zellen auf den veränderten AP-2 δ Genloкус untersucht. Homozygote Mutanten wurden schließlich durch Verpaarung von heterozygoten Tieren der F1 Generation erzeugt.

2.2.4 Molekularbiologie

2.2.4.1 Generation chemisch kompetenter Bakterien

Eine einzelne Kolonie des E.coli Stammes XL-1 blue wurde von einer Tetracyclin-haltigen LB-Platte gepickt und 5 mL LB⁺-Medium wurden mit der gepickten E.coli-Kolonie beimpft. Am folgenden Tag wurden mit 1 mL dieser Vorkultur 150 mL vorgewärmtes LB⁺-Medium inokuliert und bis zu einer Dichte von OD_{600nm} = 0.3 – 0.4 bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 6.000 rpm und 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 75 mL gekühltem TFB 1 resuspendiert, erneut 10 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 6 mL TFB 2 aufgenommen, resuspendiert und in 50 μ L Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien des E.coli-Stammes XL-1 blue

Kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, der Ligationsansatz wurde hinzupipettiert und 15-25 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42°C, an den sich eine 90-sekündige Abkühlung auf Eis anschloß. Nach Zugabe von 800 μ L LB-Medium wurde der Transformationsansatz bei 37°C für 45 min bei 700 rpm geschüttelt. Je nach Antibiotika-Resistenz des transformierten Konstruktes wurde der Ansatz auf der entsprechenden LB-Platte ausgestrichen und 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.4.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolation von Plasmid-DNA im Mini- wie auch im Maxi-Maßstab erfolgte mit einem Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Anschließend wurde die Konzentration der erhaltenen DNA photometrisch bestimmt. Dabei entspricht 1 OD gemessen bei 260 nm einer Konzentration von 50 μ g/mL doppelsträngiger DNA.

2.2.4.4 Isolation genomischer DNA aus murinen Schwanz- und Zehenbiopsien

Das Gewebe wurde üN in 500 μ L frischem DNA-Lyse-Puffer schüttelnd oder rotierend bei 55°C lysiert, unlysierte Bestandteile (Haare, Knochen) wurden über Zentrifugation (5 min, 14.000 rpm) abgetrennt und aus dem Überstand wurde genomische DNA zum einen mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- (PCI) Extraktion oder mithilfe der Isopropanol-Fällung gewonnen. Durch die PCI-Extraktion wird die DNA von Proteinen gereinigt und kann für eine Genotypisierung durch Southern Blot verwendet werden. Hierzu wurde der erhaltene Überstand mit 500 μ L PCI versetzt, gevortext und

abzentrifugiert (5 min, 14.000 rpm). Dieser zweite Überstand wurde mit 500 µL Chloroform versetzt, erneut gevortext und abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde nach Zugabe von 500 µL Isopropanol die präzipitierte DNA durch kurzes Zentrifugieren pelletiert. Schließt sich eine Genotypisierung mit gut etablierten Primern an, so kann auf die PCI-Extraktion und anschließende Chloroform-Extraktion verzichtet werden, sodaß die DNA lediglich mit Isopropanol gefällt wird. Abschließend wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50-200 µL H₂O dest. aufgenommen.

2.2.4.5 Isolation von PAC-DNA

PAC-Vektoren (P1 artificial chromosome; I.M.A.G.E-Konsortium, Livermore, USA), die 1994 erstmals als Banken für genomische DNA beschrieben wurden (Ioannou et al., 1994), wurden zur Klonierung des AP-2δ „Targeting Vectors“ verwendet. Dazu wurde die murine genomische SV129-PAC-Bank RPCI21 (Osoegawa et al., 2000) mit einer AP-2δ-spezifischen Sonde hybridisiert und die DNA des positiven Klons wurde wie folgt aufgereinigt: zwei Erlenmeyerkolben mit jeweils 300 mL LB-Medium wurden mit einer Vorkultur des gewünschten PAC-Klons im Verhältnis 1:1.000 inokuliert und üN bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation bei 6.000 rpm für 15 min bei 4°C. Das erhaltene Pellet wurde in 10 mL Puffer P1 resuspendiert und in 10 mL Puffer P2 für 5 min lysiert. Die Lyse wurde durch die Zugabe von 10 mL 3 M KAc pH 5.5 gestoppt, das Bakterienlysate für 20 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (10.000 rpm, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde mit 0.7 Volumen Isopropanol versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die gefällte DNA wurde nach erfolgter Zentrifugation getrocknet und anschließend in 3 mL TE gelöst. Durch die Zugabe von 3 mL 5 M LiCl und einer 30-minütigen Inkubation auf Eis präzipitierte vorhandene RNA. Diese wurde durch Zentrifugation pelletiert und die im Überstand vorhandene DNA wurde mit 6 mL Isopropanol versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde abzentrifugiert, das erhaltene Pellet wurde getrocknet, in 700 µL TE mit 100 µg RNase A aufgenommen und für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Phenol/Chloroform-Extraktionen und eine Chloroform-Extraktion. Der Überstand wurde mit 70 µL 3 M Natriumacetat pH 5.2 und 500 µL Isopropanol versetzt und geschüttelt. Die präzipitierte DNA wurde mit einer Pipettenspitze aufgenommen, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem finalen Volumen von 100 µL TE gelöst.

2.2.4.6 Restriktionsverdau von DNA

Plasmid-DNA wurde in einem Volumen von 30 µL verdaut und ein Ansatz setzte sich aus 1-3 µg zu spaltender DNA, 5- 10 U des benötigten Restriktionsenzym, dem vom Hersteller angegebenen Puffer und gegebenenfalls BSA zusammen. Der Ansatz wurde mindestens 60 min, höchstens üN bei der für das Enzym empfohlenen Temperatur inkubiert und anschließend analytisch durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Genomische DNA wurde ebenfalls in einem Volumen von 30 µL verdaut und ein Ansatz bestand aus 26 µL genomischer DNA, 10-100 U des benötigten Restriktionsenzym, dem vom Hersteller empfohlenen Puffer und gegebenenfalls BSA. Der Ansatz wurde üN bei der für das Enzym empfohlenen Temperatur inkubiert, analytisch durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA-Fragmente wurden aus den Agarosegelen mittels Kapillarblot auf Nylonmembranen übertragen.

2.2.4.7 Agarose-Gelelektrophorese

Gespaltene genomische DNA, Plasmid-DNA und PCR-Produkte wurden je nach erwarteter Fragmentgröße in 0.7-2%igen Ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm je nach Fragmentgröße für 20 min bis zu mehreren Stunden. Das Bandenmuster wurde durch Auflegen des Gels auf einen UV-Transilluminator (Biometra, Göttingen) mithilfe von UV-Licht ($\lambda=245$ nm) sichtbar gemacht.

2.2.4.8 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde die entsprechende Bande in der gewünschten Größe mit einem Skalpell unter energiearmem UV-Licht ($\lambda= 365$ nm) ausgeschnitten, gewogen und entsprechend des Protokolls des Qiagen Gelextraction Kits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

2.2.4.9 Southern Blot und Hybridisierung von Nylon-Membranen

DNA, die bereits mit Restriktionsendonukleasen gespalten wurde, wurde nach der Auftrennung über Agarose-Gelelektrophorese mittels Kapillarblistings auf eine Nylonmembran transferiert (Southern et al., 1975). Zunächst wurde das Agarosegel 20 min in Denaturierungslösung geschwenkt und anschließend 20 min neutralisiert. So behandelt wurde das Gel in einem Sandwich-Aufbau zwischen Whatman-Papier und der Nylonmembran arrangiert und der Nukleinsäuretransfer erfolgte üN bei RT in 10x SSC auf die Nylonmembran. Die Membran wurde kurz in 40 mM NaPi geschwenkt, die DNA wurde durch UV-Crosslinking (Funktion „Auto-Crosslink“ 1.2 kJ/cm²; UV Stratalinker 2400; Stratagene, La Jolla, USA) kovalent an die Membran gebunden und weitere 2 Stunden bei 80°C gebacken. Die gecrosslinkten, gebackenen Membranen wurden 60 min bei 65°C in vorgewärmtem Church-Puffer präequilibriert. Die radioaktive Probe wurde bei 95°C für 5 min denaturiert, 1-2 min auf Eis abgekühlt und zu der Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte üN bei 65°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln. Die Membranen wurde 2x jeweils 30 min mit Church-Waschpuffer bei 65°C gewaschen, ehe sie in Frischhaltefolie gewickelt und gegenüber einem Röntgenfilm (BioMax MS-1, Kodak, Stuttgart) exponiert wurden.

2.2.4.10 Radioaktive DNA-Markierung durch Random Primed Labeling

Die Markierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach Feinberg und Vogelstein (1984) unter Verwendung des Rediprime II Labeling Kits: 25 ng DNA wurden in 45 µL TE 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis 1 min abgekühlt und zum lyophilisierten Rediprime II Labeling Mix gegeben. Nach Zugabe von 5 µL α-³²P-dCTP wurde der Reaktionsansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsvolumen wurde auf 200 µL mit TE ergänzt und die nicht eingebauten Nukleotide wurden durch eine mit Sepharose G50-beladene Säule abgetrennt. Die Aktivität von 1 µl des Eluats wurde mit einem Szintillationszähler ermittelt.

2.2.4.11 Auffüllen von 5'-Überhängen

Die große Untereinheit der DNA-Polymerase 1, das Klenow-Fragment, besitzt in Anwesenheit von dNTPs die Eigenschaft einer 5'→3' DNA-Polymerase. Diese Eigenschaft der DNA-Polymerase wird zum Auffüllen von 5'-Überhängen genutzt. Dazu wurden 1-3 µg Plasmid-DNA mit einem geeigneten Enzym geschnitten, aufgereinigt und 0.3-1 µg der gereinigten DNA wurden mit dem geeigneten Puffer, 300 µM dNTPs und 10 U des Klenow-Fragments 30 min bei RT inkubiert.

2.2.4.12 Dephosphorilierung des 5'-Phosphats restriktionsverdauter Vektor-DNA

Die 5'-Phosphat-Enden von Vektor-DNA wurden mithilfe Alkalischer Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase) dephosphoriliert. Dazu wurden 1-3 µg Plasmid-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten, aufgereinigt und 0.3-1 µg der gereinigten DNA wurden mit Dephosphorilierungspuffer und 1 U Alkalischer Phosphatase für 10 (überhängende Enden) bis 60 min (glatte Enden) bei 37°C inkubiert.

2.2.4.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor wird durch die T4 DNA-Ligase katalysiert. Die Ligationsreaktion wurde analog zum Protokoll des Fast-Link™ DNA Ligation Kits (Epicentre, Madison, USA) bei einem molaren Verhältnis von 1 (Vektor) : 3 (Insert) durchgeführt.

2.2.4.14 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Cycle-Sequenzierung (Chadwick et al., 1996) ist eine Kombination zweier Methoden, der Dideoxy-Kettenabbruch-Sequenzierung (Sanger et al., 1977) und der Thermal Cycling-Methode, wie sie bei der PCR-Technik verwendet wird. Die von Sanger 1977 beschriebene Dideoxy-Methode beruht auf dem Einsatz spezifischer Terminatoren der DNA-Kettenverlängerung (dideoxy-Nukleosid-Triphosphate, ddNTPs). Diese ddNTPs sind dNTP-Analoga, denen aber für den Einbau weiterer dNTPs die 3'-Hydroxylgruppe fehlt. Zehn µL einer Sequenzreaktion setzten sich aus 700 ng Plasmid-DNA, 10 pmol Primer und 3 µL des BigDye® Terminator v3.1 Mixes (enthält AmpliTaq® FS DNA Polymerase, dNTPs,

Big-Dye-markierte ddNTPs und Puffer) zusammen. Die PCR-Reaktion wurde mit dem folgenden Programm durchgeführt:

PCR-Programm für
Cycle-Sequencing:

95°C	30 sec	} 24x
50°C	15 sec	
60°C	4 min	

Die anschließende Kapillarelektrophorese erfolgte durch die Firma Medigenomix (Martinsried).

2.2.4.15 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis et al., 1986) dient der spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten. Ein PCR-Ansatz setzte sich aus 200 ng Template-DNA, 200 µM dNTPs, je 100 pmol Primer, 2 mM MgSO₄, 1x Vent-PCR-Puffer und 1 U Vent-Polymerase zusammen. Ebenso wurden die Genotypen der Mäuse mittels PCR bestimmt. Dabei setzte sich ein PCR-Ansatz aus 2 µL genomischer DNA, 200 µM dNTPs, je 10 pmol Primer, 2 mM MgCl₂, 1x PCR-Puffer und 2.5 U Taq-Polymerase zusammen. Die Reaktion erfolgte nach folgendem Programm:

PCR-Programm :

95°C	3 min	}
95°C	30 sec	
63°C	30 sec (-1°C/Zyklus)	} 9x
72°C	30 sec	
95°C	30 sec	} 34x
53°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	

2.2.4.16 Kinasierung von DNA-Fragmenten am 5'-Terminus

Die eingesetzte T4 Polynukleotidkinase transferiert das γ-Phosphat des ATPs auf das 5'-OH-Ende von einzel- oder doppelsträngiger DNA, sodaß diese Reaktion neben der Modifizierung synthetischer Linker auch für die Klonierung von PCR-Produkten in dephosphorierte Vektoren mit glatten Enden benötigt wird. Zum Zweck der Klonierung von synthetischen Linkern wurde 1 µg des Linkers mit 1 mM rATP, 10 U T4 Polynukleotidkinase und dem entsprechenden Puffer für 60 min bei 37°C und darauffolgend für 5 min bei 95°C inkubiert. Das anschließende Abschalten des Heizblocks führte zur Abkühlung des Reaktionsansatzes und ermöglichte so bei einer Temperatur von ca. 55°C die komplementäre Anlagerung zweier Linker-Moleküle über die palindromische Sequenz der einzufügenden Restriktionsschnittstelle („Oligo Annealing“).

2.2.4.17 Isolation von RNA

Adhärente Säugerzellen, die zu 80-90% konfluent sind, wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen, mit einem sterilen Zellschaber (Roth, Karlsruhe) abgeschabt und bei 900 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde in 1 mL gekühltem Trizol/10 cm Petrischale aufgenommen und mehrfach resuspendiert. Gewebe adulter Mäuse oder Embryonen wurden möglichst steril entnommen, wenn nötig kurz in 1x DEPC-PBS gewaschen und auf Trockeneis eingefroren. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerrieben und nach der Ermittlung des Gewichtes wurden 1 mL Trizol/50 mg Gewebe hinzugegeben. Die Trizol-Suspension wurde 10x durch eine sterile 26-gauge Kanüle gezogen. Danach wurden 200 µL Chloroform/mL Trizol hinzugegeben, vermischt und bei 4°C für 15 min bei 12.000 rpm abzentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wurde abgenommen und zur Präzipitation mit 500 µL Isopropanol/mL für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Ansatz erneut bei 4°C für 10 min bei 12.000 rpm pelletiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen und in 50-200 µL DEPC-H₂O aufgenommen. Handelte es sich um Gewebe mit einem Gewicht unter 50 mg, so erfolgten die Aufreinigung und die RNA-Gewinnung mithilfe des RNeasy Kits (Qiagen, Hilden). Die Bestimmung der Konzentration erfolgte gegen DEPC-H₂O, wobei 1 OD, gemessen bei 260 nm einer Konzentration von 40 µg/mL einzelsträngiger RNA entsprechen.

2.2.4.18 RNA-Gelelektrophorese

Da RNA unter physiologischen Salzkonzentrationen starke Sekundärstrukturen aufweist, erfolgt die Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen, um eine genaue Auftrennung nach Größe zu erreichen. Falls die ermittelte RNA-Konzentration unter 1.6 µg/µL lag, wurden 10-15 µg RNA mit 1/10 RNA-Volumen 4 M LiCl und 2.5x RNA-Volumen 100% Ethanol für 60 min bei -20°C gefällt. Die präzipitierte RNA wurde durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm pelletiert, getrocknet und in 6 µL DEPC-H₂O aufgenommen. Der gelösten DNA wurden 1 µL 20x MOPS Laufpuffer, 3.5 µL 37% Formaldehyd und 10 µL Formamid zugesetzt, der Ansatz wurde 10 min bei 70°C inkubiert, kurz auf Eis abgekühlt und mit 2.5 µL Ethidiumbromid-Lösung (0.5 µL Ethidiumbromid, 2 µL 10x RNA-Auftragspuffer) versetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 1.2%igen RNA-Gel mit 6.7% Formamid bei 40 V.

2.2.4.19 Northern Blot

RNA-Gele wurden ohne vorherige Denaturierung für einen Kapillartransfer verwendet. Der Nukleinsäuretransfer erfolgte analog zum Southern Blot $\ddot{U}N$ auf eine Nylonmembran. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran für 2 Stunden bei 80°C gebacken.

2.2.4.20 Reverse Transkription und RT-PCR

Die RT-PCR wird neben dem Northern Blot zur Analyse der Genexpression eines einzelnen Gens auf der Ebene der mRNA verwendet, hat aber gegenüber dem Northern Blot den Vorteil hochsensitiv geringe Mengen mRNA nachweisen zu können. Ausgehend von 500 ng RNA wurde mithilfe des Superscript™ II RNaseH⁻ Reverse Transcriptase Kits in einem ersten Schritt der komplementäre cDNA-Strang synthetisiert. In einem zweiten Schritt erfolgte die PCR, die hochsensitiv und effizient das zuvor generierte cDNA-Template amplifiziert. Die PCR-Reaktion wurde mit 10-25 ng der generierten cDNA, jeweils 100 pmol Primer, 200 µM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 10x PCR-Puffer und 2.5 U Taq-Polymerase durchgeführt (95°C 1 min, 55-67°C 1 min, 72°C 1 min; 25 bis 35 Zyklen). Die Auswertung erfolgte durch gelelektrophoretische Analyse in einem 2%igen Agarosegel.

2.2.4.21 Generierung von radioaktiv- und Digoxigenin-markierten Sonden für in situ Hybridisierungen

Für die Synthese von sense- und antisense-RNA-Proben wurden jeweils 20 µg des cDNA-Konstruktes $\ddot{U}N$ mit 100 U des geeigneten Restriktionsenzym und dem passenden Puffer in 200 µL Gesamtvolumen linearisiert. Um die vollständige Linearisierung des Ansatzes zu überprüfen, wurde 1 µL des Ansatzes durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Der verbleibende Ansatz wurde durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion und eine weitere Chloroform-Extraktion von Proteinen gereinigt. Anschließend wurde die DNA durch die Zugabe von 1/10 DNA-Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.2 und 2.5 DNA-Volumen 100% Ethanol bei -80°C präzipitiert, abzentrifugiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und durch Zugabe von 18 µL DEPC-H₂O auf eine Konzentration von ca. 1 µg/µL eingestellt.

Für die in vitro Transkription mit ³³P-dUTP wurde 1 µg der linearisierten DNA mit Transkriptionspuffer, 40 U RNase Inhibitor, jeweils 1 mM ATP/CTP/GTP, 80 µCi ³³P-dUTP und 40 U der geeigneten RNA-Polymerase versetzt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die in vitro Transkription wurde durch die Zugabe von 2 U RNase-freier DNase I abgestoppt und der Ansatz wurde für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Zwischenzeitlich wurde eine Sepharose-gefüllte Micro Spin G50-Säule mit DEPC-TE äquilibriert. Das Volumen des Transkriptionsansatzes wurde mit H₂O dest. auf 100 µL aufgefüllt, auf die Säule gegeben und abzentrifugiert. Das von freien ³³P-dUTPs gereinigte Transkript wurde 30 min bei -80°C mit 100 µg/mL tRNA, 1/10 Volumen 4 M LiCl und 3 Volumen 100% Ethanol gefällt. Das gefällte Transkript wurde nach einem Zentrifugationsschritt getrocknet und in 21 µL DEPC-TE gelöst. Die Aktivität von 1 µL der Sonde wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt. Die Probe wurde in einer Aktivität von 40.000 cpm im Hybridisierungsmix zur in situ Hybridisierung eingesetzt.

Zur Digoxigenin-Markierung von RNA wurde 1 µg linearisierte DNA mit Transkriptions-Puffer, 20 U RNase Inhibitor, 1x Digoxigenin-NTP-Mix (3.5 mM Digoxigenin-11-dUTP, 6.5 mM dUTP, jeweils 10 mM ATP/CTP/GTP) und 40 U der entsprechenden Polymerase in einem Gesamtvolumen von 20 µL für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Erfolg der in vitro Transkription anhand von 1 µL des Ansatzes durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die DNA-Matrize im

verbleibenden Reaktionsansatz wurde durch die Zugabe von 2 U RNase-freier DNase I bei 37°C für 15 min abgebaut. Der Transkriptionsansatz wurde durch DEPC-H₂O auf 200 µL ergänzt, mit 200 µg/mL tRNA, 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.2 und 3 Volumen 100% Ethanol für 30 min bei -80°C gefällt, nach einem Zentrifugationsschritt getrocknet und in 40 µL DEPC-TE gelöst. Die Digoxigenin-markierte Probe wurde im Hybridisierungs-Mix 1:100 verdünnt zur in situ Hybridisierung eingesetzt.

2.2.4.22 In vitro Translation

Proteine und Protein-Fragmente wurden durch das gekoppelte Transkriptions- und Translationssystem TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Mannheim) in einem Zellfreien System in vitro translatiert. Dazu wurden 1 µg Plasmid-DNA in einem 50 µL umfassenden Reaktionsansatz mit 25 µL Reticulozyten-Lysat, 2 µL Puffer, 1 µL T7 RNA-Polymerase, 20 µM Aminosäure-Lösung ohne Methionin, 20 µCi [³⁵S]-markiertem Methionin für in vitro Translationen (Redivue L-[³⁵S] methionine, in vitro translation grade, 10 mCi/mL) und 40 U RNase Inhibitor für 90 min bei 30°C inkubiert. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis, um die in vitro Translationsreaktion zu stoppen, wurden die Ansätze bei -80°C gelagert.

2.2.5 Das Yeast-Two Hybrid System

2.2.5.1 Grundlagen des Yeast Two-Hybrid Systems

Das Yeast-Two Hybrid System ermöglicht eine in vivo Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen in der Hefezelle mithilfe eines genetischen Assays (Fields und Song, 1989; Fields und Sternglanz, 1994) und ist besonders für den Nachweis transienter und schwacher Wechselwirkungen geeignet. Der entscheidende Vorteil dieser Methode gegenüber in vitro Systemen besteht darin, daß die Proteine in einem eukaryontischen Modellsystem exprimiert und auf ihre Interaktion hin getestet werden. Ein weiterer Vorzug des Yeast-Two Hybrid Systems ist, daß Proteine in Hefe- wie auch in Säugerzellen dieselben posttranslationalen Modifikationen tragen, die das Bindungsverhalten eines Proteins maßgeblich beeinflussen können. Die Entwicklung des Yeast-Two Hybrid Systems basiert auf der Beobachtung, daß viele eukaryontische Transkriptionsfaktoren, wie GAL4, aus zwei funktionell unabhängigen, physikalisch trennbaren Domänen bestehen (Brent und Ptashne, 1985): einer DNA-Bindedomäne (DBD) und einer Transaktivierungsdomäne (TAD). Dabei bindet die DBD spezifisch an die zugehörige upstream activating sequence (UAS; Heslot und Gaillardin, 1992). Vermittelt durch die TAD wird daraufhin die Transkription der unter dem Einfluß dieser UAS stehenden Gene durch den RNA-Polymerase II-Komplex initiiert (Keegan et al., 1986; Ma und Ptashne, 1987) (Abb. 3, a). Werden DBD und TAD physikalisch getrennt in derselben Zelle koexprimiert, bindet die DBD zwar an ihre Zielsequenz, die TAD kann die Genexpression aufgrund fehlender Interaktion zwischen der TAD und der DBD nicht initiieren (Abb. 3, b). Das Prinzip des Yeast-Two Hybrid Systems beruht auf der gleichzeitigen Expression eines zu testenden Hybridproteins fusioniert mit der DNA-Bindedomäne (Köderprotein/bait) und einer cDNA-Bank, die mit der Transaktivierungsdomäne verknüpft wurde (Beuteprotein/prey). Die Interaktion des Köderproteins mit einem cDNA-kodierten Polypeptid bringt die DNA-Bindedomäne in die Nähe der Transaktivierungsdomäne und führt so zur Aktivierung der Reportergene (Abb. 3, c).

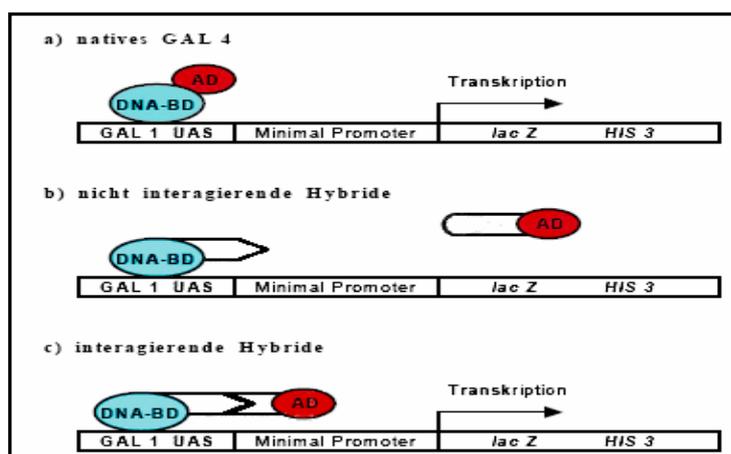


Abb. 4:

Modell der Transkriptions-Aktivierung durch Wiederherstellung der GAL4 Aktivität über interagierende Hybridproteine, bestehend aus der DNA-Bindedomäne fusioniert mit dem Köderprotein (DNA-BD, blau) und der Transaktivierungsdomäne fusioniert mit einem cDNA-Fragment einer Expressions-Bank (AD, rot). Modifiziert nach Fields und Song, 1989

2.2.5.2 Das MatchMaker3 Yeast-Two Hybrid System

Für den Yeast-Two Hybrid Screen wurde das GAL4-basierende System MatchMaker3 der Firma Clontech (Palo Alto, USA) verwendet. Zur Transformation von Hefezellen mit dem Köderprotein (bait, DNA-Bindedomäne fusioniert mit der AP-2 δ Transaktivierungsdomäne in pGBKT7) und der cDNA-Expressionsbibliothek aus adulten Maushirnen (prey in pACT2) wurde der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm AH109 (Clontech, Palo Alto, USA) verwendet, der als ein Derivat des Stammes PJ69-2A (James et al., 1996) neben dem endogenen *mel1* über die drei Reportergene *his3*, *ade2* und *lacZ* verfügt, die jeweils von 3 heterologen, GAL4-responsiven Promotorelementen (GAL1, GAL2 und MEL1) kontrolliert werden. Der Hefestamm AH109 besitzt diverse Gendelektionen, sodaß dieser Stamm Histidin, Tryptophan, Leucin und Adenin nicht de novo synthetisieren kann. Die Gendelektion entsprechender Proteine der Tryptophan- und Leucin-Synthese (*trp1-901*, *leu2-3*) wird durch die beiden Vektoren pGBKT7 (bait-Vektor mit Tryptophan-Synthesegen) und pACT2 (prey-Vektor mit Leucin-Synthesegen) komplementiert. Die zur Adenin- und Histidinsynthese benötigten Reportergene *ade2* und *his3* werden bei Interaktion der GAL4-DBD- und GAL4-TAD-Fusionsproteine exprimiert, sodaß Hefezellen mit interagierenden Fusionsproteinen auf -His/-Ade Mangelmedium wachsen können.

2.2.5.3 Generierung und Transformation kompetenter AH109-Hefezellen

100 mL YPD-Medium wurden mit einer Vorkultur der AH109-Hefezellen inokuliert und üN bei 30°C im Schüttler inkubiert. 500 mL YPD wurden mit der Übernachtskultur beimpft und die Hefesuspension wurde bis zu einer $OD_{600nm} = 0.1-0.2$ bei 30°C im Schüttler inkubiert. Die Hefezellen wurden bei einer $OD_{600nm} = 0.4-0.6$ abzentrifugiert (5 min, 2.500 rpm), zuerst in 20 mL H₂O dest. und nach wiederholter Zentrifugation in 20 mL TLS aufgenommen und resuspendiert. Das finale Hefepellet wurde in 3 mL TLS pro 500 mL YPD aufgenommen.

Die Transformation der kompetenten Hefezellen erfolgte mithilfe der Lithiumacetat-Methode (Ito et al., 1983). Dazu wurden pro Transformationsansatz 1 μ g Plasmid-DNA, 200 μ g Hitze-denaturierter Lachsspermien-DNA, 860 μ L PTL und 140 μ L der kompetenten Zellen für 30 min bei 30°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach Zugabe von 100 μ L DMSO wurde der Ansatz durch luftblasenfreies Resuspendieren gemischt und 8 min bei 42°C inkubiert. Der Ansatz wurde pelletiert und, um DMSO-Reste zu entfernen mehrmals in H₂O dest. resuspendiert, erneut pelletiert und in einem finalen Volumen H₂O dest. aufgenommen. Die Hefezellen wurden auf Agarplatten mit den entsprechenden Selektionsbedingungen ausplattiert und bei 30°C inkubiert.

2.2.5.4 Präparation von Plasmid-DNA aus Hefezellen

Einzelne Hefeklonen wurden von der Platte gepickt und in 5 mL SD-Medium für 1-2 Tage bei 30°C inkubiert. Zwei mL der Hefesuspension wurden 5 min bei 2.500 rpm pelletiert und mit 250 μ L Lyse-Puffer versetzt. Um die Hefezellen aufzubrechen, wurden 250 μ L Glassperlen (212-300 microns; Sigma, Deisenhofen) zugesetzt. Zur Abtrennung der frei werdenden Nukleinsäuren von der umgebenden Protein-haltigen Lösung wurden 300 μ L PCI hinzugegeben und der Ansatz aus Lyse-Puffer, Glasperlen und PCI wurde 2 Stunden bei 4°C stark geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm) wurde die obere, DNA-haltige Phase abgenommen und die DNA wurde durch 1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.2 und 2.5 Volumen 100% Ethanol für 20 min bei -80°C gefällt. Die pelletierte DNA wurde 3x mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μ L TE mit 10 U RNase A aufgenommen. Der Ansatz wurde 10 min bei 68°C inkubiert und die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.5.5 α -Galaktosidase in vivo Assay

Das *mel1* Reportergen kodiert für die sekretierte α -Galaktosidase, die durch die Hydrolyse des X-Gals die charakteristische blaue Färbung positiver Kolonien hervorruft (Liljestrom, 1985; Aho et al., 1997). Daher ist es möglich, die Hefezellen in vivo durch einen X-Gal Overlay Assay auf die Expression der Reportergene zu testen.

Die X-Gal-haltige Agarose wurde wie unter 2.1.8.4 (Hefemedien und Lösungen; Overlay Lösung final) beschrieben, hergestellt. Eine mit Hefekolonien bewachsene Platte wurde mit 8-10 mL der X-Gal-haltigen Agarose überschichtet. Die Platte wurde nach dem Erstarren der Agarose bei 30°C inkubiert. Die Intensität der Blaufärbung der Kolonien korreliert mit der Stärke der Expression der Reportergene

und diente somit als Indikator für die Stärke der ausgebildeten Interaktion zwischen prey und bait. Um daher schwache von starken Interaktionen unterscheiden zu können, wurde die Entwicklung der Blaufärbung in zeitlichen Abständen photographisch festgehalten.

2.2.5.6 β -Galaktosidase filter lift Assay

Die Interaktion des bait- und des prey-Vektors kann in der Hefezelle auch durch einen in vitro β -Galaktosidase filter lift Assay nachgewiesen werden (Breedon und Nasmyth, 1985). Dazu wurden autoklavierte, am Rand markierte Whatman-Rundfilter auf eine mit Hefekolonien bewachsene Platte gelegt. Die Markierung wurde auf den Boden der Platte übertragen, der Rundfilter wurde vorsichtig abgenommen und mit den Kolonien nach oben in eine Aluminiumschale gelegt. Die Hefezellen, die sich als Kopie der Platte nun auf dem Rundfilter befinden, wurden durch das Bad der Aluminiumschale in flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Nach ca. 30 sec wurde die Aluminiumschale dem Stickstoff-Bad entnommen, sodaß die Hefezellen auftauten. Dieser Prozeß wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde der Filter auf einen weiteren autoklavierten Rundfilter gelegt, der zuvor mit 2.5 mL der X-Gal Stock-Lösung getränkt worden war. Der Filter wurde bei RT in einer dunklen Kammer aufbewahrt. Die Blaufärbung der Kolonien wurde mit der Positivkontrolle pCL-1 verglichen und stündlich durch ein Photo der Platte dokumentiert.

2.2.6 Biochemie und Zellbiologie

2.2.6.1 Immunfluoreszenz

NIH 3T3-Zellen wurden am Tag vor dem Experiment in einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro 24 well auf Deckgläschen ausgesät und mit 1-0.1 μ g DNA und 1.25 μ L Lipofectamine in einem Gesamtvolumen von 20 μ L mit Serum-freiem Medium nach Anleitung des Herstellers transfiziert. Zwölf bis 16 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium durch Serum-haltiges Medium ersetzt. Maximal 24 Stunden nach dem Medium-Wechsel wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, in 3% PFA/4% Sucrose für 15 min fixiert, erneut gewaschen und für 10 min in 0.2% TritonX-100 permeabilisiert. Nach wiederholtem Waschen wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine 60-minütige Inkubation in Blockierungslösung (10% Ziegen Serum/3% BSA) abgesättigt und die Zellen wurden μ N bei 4°C mit dem in Blockierungslösung verdünnten Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3% BSA gewaschen, mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (1:10.000 in 3% BSA) für 60 min bei RT inkubiert und abschließend 3x 5 min gewaschen (3% BSA/3% BSA/1x PBS). Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte durch eine 10-minütige DAPI-Färbung (1:10.000 in 1x PBS). Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Deckgläschen mit Evanol eingedeckelt.

2.2.6.2 Präparation von Zell- und Gewebeextrakten

Extrakte wurden zum einen aus HeLa- und aus HepG2-Zellen, sowie aus murinem Gewebe gewonnen. Die Zellen wurden in kaltem PBS gewaschen, abgeschabt und bei 4°C für 5 min bei 3.500 rpm abzentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in einem geeigneten Volumen RIPA-Puffer aufgenommen (500 μ L RIPA-Puffer pro konfluenter 10 cm Zellkulturschale). Von murinem Gewebe wurde zunächst das Gewicht bestimmt, es wurde manuell zerkleinert und mit RIPA-Puffer auf eine Konzentration von 50-100 mg/mL eingestellt. Anschließend wurden die Zellsuspension und das zerkleinerte Gewebe durch eine 26-gauge Nadel aspiriert, um eine nahezu vollständige Lyse der Zellen zu erreichen. Die Zellsuspension wurde bei 4°C für 10 min bei 14.000 rpm sedimentiert, der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C gelagert. Die anschließende Bestimmung des Proteingehalts erfolgte durch den BCA Protein Assay Kit (Smith et al., 1985). Der Assay wurde durch die Messung der Extinktion bei 562 nm gegen einen BSA-Kalibrationsstandard mithilfe eines ELISA-Readers (Dynatech, Guernsey, England) ausgewertet.

2.2.6.3 Präparation von Kernextrakten

Um die im Zellkern vorhandenen DNA-bindenden Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, zu analysieren, wurden die Zellkerne aus den Zellen isoliert (Dignam et al., 1983; Schreiber et al., 1989) und anschließend aufgeschlossen. Dies erfolgte anhand eines Protokolls des Instituts für Molekulare Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg (Prof. Dr. A. Bosserhoff). Dazu wurden HeLa- oder

HepG2-Zellen in kaltem PBS gewaschen, abgeschabt und bei 4°C für 5 min bei 3.500 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 400 µL Kernextrakt-Lysispuffer 1 pro konfluenter T75-Zellkulturschale (75 cm²) aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 25 µL 10% NP-40 wurde der Ansatz kräftig geschüttelt, 2 min bei 4°C und 10.000 rpm abzentrifugiert und das erhaltene Pellet wurde in 50 µL Kernextrakt-Lysispuffer 2 für 15 min kräftig geschüttelt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 10.000 rpm wurde der Überstand mit den enthaltenen Kernproteinen in 25 µL Aliquots bei -80°C eingefroren. Die anschließende Bestimmung des Proteingehalts erfolgte durch den BCA Protein Assay Kit (Smith et al., 1985). Der Assay wurde durch die Messung der Extinktion bei 562 nm gegen einen BSA-Kalibrationsstandard mithilfe eines ELISA-Readers (Dynatech, Guernsey, England) ausgewertet.

2.2.6.4 Expression rekombinanter GST-Fusionsproteine in E.coli BL21

Chemisch kompetente E.coli Bakterien des Stammes BL21 wurden mit einem Konstrukt transformiert, das ein Fusionsprotein aus der N-terminalen Glutathion-S-Transferase und einem C-terminalen, Protein-codierenden DNA-Fragment enthält. Von den transformierten Bakterien wurde ein Abstrich zum Beimpfen einer Übernachtskultur genommen. 100 mL LB-Medium wurden im Verhältnis 1:50 mit der Übernachtskultur inokuliert und anschließend schüttelnd bei 37°C inkubiert, bis die Kultur bei 600 nm eine Dichte von 0.5 bis 0.6 erreicht hatte. Zur Kontrolle wurde ein 100 µL Aliquot der Kultur genommen. Die Expression des GST-Fusionsproteins wurde durch den Zusatz von 1 mM Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktopyranosid (IPTG) induziert. Anschließend wurde die Kultur weiterhin schüttelnd bei 37°C inkubiert, bis die GST-Fusionsproteine geerntet und aufgereinigt wurden. Innerhalb dieses Induktionszeitraums wurde die Proteinexpression stündlich durch ein 100 µL Aliquot der Kultur kontrolliert.

2.2.6.5 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Nach Ablauf der Induktionszeit wurde die Bakteriensuspension bei 4.000 rpm für 10 min bei 5°C in 50 mL-Falconröhrchen abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 20 mL kaltem Puffer A resuspendiert und vereinigt. Um die Zellen aufzubrechen, wurde die Suspension 5 min auf Trockeneis/Methanol eingefroren, bei 37°C aufgetaut und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 mL Puffer A⁺ resuspendiert und 4x 5 min für jeweils ca. 30 sec sonifiziert. Anschließend wurde die Suspension mit 1% TritonX-100 versetzt und 20 min auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach der Zugabe von 10% Glycerol wurde die Suspension auf Reaktionsgefäße verteilt und bei 13.000 rpm für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. 20 µL des Überstands wurden zur Kontrolle der Aufreinigung entnommen. Die verbleibenden Überstände wurden in 500 µL Aliquots zunächst auf Trockeneis eingefroren und später bei -80°C gelagert. Die Effizienz der Expression und der Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurde durch die Auftrennung der gesammelten Kontrollen in einem SDS-Polyacrylamid-Gel überprüft.

2.2.6.6 GST-Pulldown

Für den GST-Pulldown wurden jeweils 40 µL Glutathion Sepharose 4 Fast Flow Suspension pro Ansatz durch ein zweimaliges Waschen mit 5 Volumen HBB-Puffer äquilibriert. Nach einer 2-minütigen Zentrifugation bei 500xg und 4°C wurde der Überstand mit einer 26-gauge Kanüle abgenommen, die Glutathion Sepharose wurde mit 50 µL der aufgereinigten GST-Fusionsproteine, bzw. mit 20 µL unfusionierten GST-Proteinen (Negativkontrolle) versetzt und 20 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit jeweils 500 µL HBB⁺-Puffer wurde die Glutathion Sepharose mit 40 µL HBB-Puffer und 9 µL in vitro Translatat (IVT) versetzt. Zur Bindung der in vitro translatierten Proteine an die bereits immobilisierten GST-Fusionsproteine wurden die Ansätze 2 Stunden bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Glutathion Sepharose 4x mit jeweils 500 µL HBB⁺300-Puffer gewaschen, die Suspension wurde bei 500xg für 2 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand wurde mit einer 26-gauge Kanüle abgenommen. Das Pellet wurde mit 20 µL 2-fach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C erhitzt, kurz abzentrifugiert und der Überstand wurde auf ein 12.5 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

2.2.6.7 SDS-PAGE

Die eindimensionale, diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) dient zur Auftrennung von Proteingemischen. Dabei werden Proteine durch SDS mit einer negativen Nettoladung versehen und wandern in einem elektrischen Feld durch die Gelmatrix und werden im Sinne einer Gelfiltration in Abhängigkeit von ihrer Größe getrennt. Dazu wurden die Proben 5 min bei 95°C in Probenpuffer aufgekocht, kurz auf Eis inkubiert und in die Probentaschen des Sammelgels geladen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA (Schichtdicke des Gels: 0.75 mm) gestartet. Der Lauf des Gels wurde beim Einlaufen der Proben ins Trenngel auf 15 mA erhöht.

2.2.6.8 Coomassie-Färbung

Nach Abschluß des Laufes wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel kurz in einer Methanol-Essigsäure-Lösung (50:10:40, Methanol:Essigsäure:H₂O) fixiert und üN in einer Coomassie-Färbelösung gefärbt. Nach ausreichender Färbung wurde das Gel in einer Entfärber-Lösung (40% Isopropanol, 10% Essigsäure) entfärbt, mehrmals in H₂O dest. gewässert und in H₂O dest. bei RT gelagert.

2.2.6.9 Immunoblotting

Nach erfolgter SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Proben mithilfe des Elektro-Tank-Blottings auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde das Gel 20 min in Transfer-Puffer äquilibriert. Eine PVDF-Membran in der Größe des Trenngels wurde in Methanol geschwenkt und anschließend ebenfalls in Transfer-Puffer äquilibriert. Gel und Membran wurden luftblasenfrei in einem Sandwich-Aufbau arrangiert. Der Transfer erfolgte in Transfer-Puffer bei 25 V üN bei 4°C. Die Membran wurde anschließend mit 1x TBS gespült und der Erfolg des Transfers wurde durch Inkubation der Membran in Ponceau S-Lösung sichtbar. Nachdem die Probentaschen markiert worden waren, wurde die Membran durch Schwenken in H₂O dest. und in TBST wieder entfärbt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 5% Milchpulver in TBST für 60 min bei RT abgesättigt und die Membran wurde üN bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Ungebundener Primärantikörper wurde durch mehrere Waschschriffe mit TBST entfernt, bevor die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 60 min bei RT erfolgte. Nach wiederholten Waschschriffen mit TBST wurde die Membran in 1x TBS geschwenkt und anschließend 1 min in ECL-Lösung (50% Lösung 1, 50% Lösung 2) inkubiert. Die Visualisierung des Signals erfolgte durch Exponierung der Membran gegenüber einem Hyperfilm™ ECL™-Röntgenfilm.

2.2.6.10 „Stripping“ von PVDF-Membranen

Der Vorgang des „Strippings“ dient der kompletten Entfernung des Primär- und des Sekundärantikörpers, um dieselbe Membran erneut mit einem anderen Primärantikörper zu inkubieren. Dazu wurde die bereits verwendete Membran analog zum Protokoll des Herstellers (Hybond-P, PVDF-Membran; Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England) bei 50°C in Stripping-Buffer inkubiert und wie beschrieben, mit dem Primär- und Sekundärantikörper inkubiert.

2.2.6.11 Generation eines polyklonalen AP-2δ spezifischen Antikörpers

Mithilfe verschiedener Algorithmen werden Aussagen über die Eignung bestimmter Sequenzen innerhalb des Proteins als Antigen (Jameson-Wolf-Algorithmus; Jameson and Wolf, 1988), über hydrophobe Bereiche des Proteins (Kyte-Doolittle-Algorithmus; Kyte and Doolittle, 1982), die Lage amphipatischer Regionen (Eisenberg-Algorithmus; Eisenberg et al., 1984), über flexible Regionen innerhalb des Proteins (Karplus-Schulz-Algorithmus; Karplus and Schulz, 1985), sowie über die Wahrscheinlichkeit gemacht, mit der eine bestimmte Proteinsequenz des Proteins nach außen exponiert wird (Emini et al., 1985). Die Anwendung dieser Algorithmen auf die Proteinsequenz des murinen AP-2δ Proteins, sowie ihre anschließende Analyse erfolgte mit dem Programm „Lasergene7“ (DNASTar, Madison, USA).

Die Polypeptide, die aufgrund der Algorithmen-basierten Sequenzanalyse selektiert werden konnten, wurden anschließend in der Abteilung für Bioorganische Chemie des Max-Planck-Institutes für Biochemie (Martinsried) synthetisiert. Da Peptide aufgrund ihrer geringen Größe keine starke Immunantwort auslösen, wurden 2 mg des Peptids mithilfe des „Imject® Maleimide Activated mc KLH“

Kits an ein Trägermolekül gekoppelt. Ein solches Trägermolekül stellt das Sauerstoff-übertragende Protein KLH (keyhole limpet haemocyanin) dar, das aus der Schnecke *Megathura crenulata* gewonnen wird.

Vor der initialen Immunisierung wurde den Kaninchen Blut abgenommen, aus dem Präimmenserum gewonnen wurde. Dieses Serum wurde im Immunoblot auf seine Reaktivität gegenüber murinen Antigenen getestet. Zur initialen Immunisierung wurden 500 µL des KLH-gekoppelten Peptids mit 500 µL des Adjuvans Titer Max (Sigma, Deisenhofen) versetzt und beide Phasen wurden wiederholt zwischen zwei mit einem Dreiwegehahn verbundenen 5 ml-Spritzen hin- und hergedrückt, bis eine stabile Wasser-in-Öl Emulsion entstanden war. Die Emulsion wurde im unmittelbaren Anschluß subkutan in ein Kaninchen injiziert. Die entstehende Immunantwort wurde durch wiederholte Injektionen in Abständen von 4 Wochen verstärkt (boost). Dabei wurde als Adjuvans nun Freund's Incomplete Adjuvans (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Zwei Wochen nach den jeweiligen boosts wurde den Kaninchen Testblut für ELISA und Immunoblot Analysen abgenommen. Zwei Wochen nach dem dritten boost wurden die Kaninchen ausgeblutet. Das final erhaltene Serum wurde mithilfe des SulfoLink® Kits affinitätsgereinigt. Dazu wurde 1 mg des jeweiligen Peptids durch Reaktion seiner Sulfhydrylgruppe mit den Iodacetylgruppen des SulfoLink® Coupling Gels durch Bildung einer Thioesterbindung kovalent an die Gelmatrix gebunden. Nachdem unspezifische Bindungsstellen der Gelmatrix durch 50 mM L-Cystein-HCl abgesättigt worden waren, wurde das in 1.5 mL 1x PBS 1:6 verdünnte Antiserum auf die Säule gegeben. Nach der sauren Elution durch 8 mL 100 mM Glycin pH 3.0 wurde der affinitätsgereinigte Antikörper in 250 µL Aliquots portioniert. Die Effizienz der Elution wurde durch die Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt und die Fraktionen mit dem effizientesten Elutionsprofil wurden bei -80°C gelagert.

2.2.6.12 ELISA Assay

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA Assay) diente während der gesamten Immunisierung als Indikator für die Antikörperantwort. Zum anderen diente der ELISA-Assay dem Nachweis, daß das gewonnene Antiserum spezifisch an die AP-2δ Peptide binden kann, mit denen die Kaninchen immunisiert wurden. Zusätzlich wurden neben den zu analysierenden Serumproben auch Kontrollen, wie zum einen mit Präimmenserum, mit dem Sekundärantikörper und nur mit dem Peptid in denselben Verdünnungen durchgeführt.

Dazu wurde eine 96-well-Platte mit dem jeweiligen Peptid (1µg Peptid/well in 1% BSA in PBS) üN bei 4°C beschichtet. Ungebundenes Peptid wurde durch Waschen mit PBST (0.05% Tween-20 in 1x PBS) entfernt und unspezifische Bindungen wurden durch 1% BSA in 1x PBS blockiert (60 min, RT). Die Platte wurde 3x mit PBST gewaschen, das AP-2δ-spezifische Antiserum wurde in verschiedenen Konzentrationen (1:100.000 – 1:10) in Blockierungslösung appliziert und 60 min inkubiert. Die Platte wurde erneut 3x 10 min mit PBST gewaschen, 60 min bei RT mit dem Sekundärantikörper Ziege anti Kaninchen~HRP inkubiert und 3x 10 min mit PBST gewaschen. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µL 5-Aminosalicyl-Säure pro well (Ellens and Gielkens, 1980). Die Reaktion wurde nach Ablauf von 10 min durch die Zugabe von 100 µL 1 N NaOH gestoppt. Der Assay wurde durch die Messung der Extinktion bei 490 nm mithilfe eines ELISA-Readers (Dynatech, Guernsey, England) ausgewertet.

2.2.7 Histologische Untersuchungsmethoden

2.2.7.1 Nachweis des LacZ-Reportergens in situ

Frisch präparierte Organe oder Embryonen wurden kurz in 100 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7.3 geschwenkt und danach für 15-30 min je nach Größe des Präparates in Fixierungslösung inkubiert. Das Gewebe wurde 3x für 5 min mit Wasch-Puffer gewaschen und anschließend in frischer, gefilterter X-Gal Färbelösung für 4 Stunden bis üN bei 37°C in einem dunklen Gefäß inkubiert. In Abhängigkeit von der Stärke des LacZ-Signals wurde die Färbereaktion durch Wasch-Puffer abgestoppt, das Gewebe wurde durch 4% PFA nachfixiert und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2.7.2 Histologische Nachweismethoden an Paraffinschnitten

I Vorbereitung von murinem Gewebe für Paraffinschnitte

Gewebe und komplette Embryonen wurden nach der Entnahme kurz in 1x PBS gespült, in 4% PFA üN bei 4°C fixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (üN 4°C 70%, 4 Stunden 4°C 80%, 2 Stunden RT 90%, 60 min RT 100%, 3x 20 min RT Xylol) dehydriert. Die einzelnen Inkubationszeiten wurden je nach Größe des Präparates variiert. Abschließend wurden die Präparate in Einbettkassetten überführt, im ersten Paraffin-Bad üN und in zwei weiteren Paraffin-Bädern jeweils 1-2 Stunden inkubiert, bevor sie in Metallformen eingebettet wurden. Die Paraffinschnitte wurden auf einem Mikrotom HM 355 S der Firma Microm (Walldorf) mit einer Schnittdicke von 6-7 µm angefertigt (verwendete Messer: Mikrotom-Messer Sec35, Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, USA) und üN bei 37°C getrocknet.

II Hämalaun-Eosin-Färbung (H&E-Färbung)

Nach erfolgter Deparaffinierung in Xylol und absteigender Alkoholreihe wurden die Schnitte zunächst in Mayer's Hämalaun (1:5 mit H₂O dest. verdünnt) gefärbt und anschließend in Leitungswasser fließend gebläut. Die Gegenfärbung erfolgte in einer 0.1%igen Eosinlösung. An ein erneutes Bläuen in Leitungswasser schlossen sich eine aufsteigende Alkoholreihe, sowie zwei Inkubationen der Objekte in Xylol an. Die Schnitte wurden mit Entellan beschichtet und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt.

2.2.7.3 Immunhistologische Färbungen an Paraffinschnitten

Paraffinschnitte von Geweben oder murinen Embryonen wurden mittels Xylol (2x 5 min) und absteigender Ethanolreihe (2x 100%, 96%, 80%, 70%, jeweils 3 min) vom Paraffin befreit und rehydriert. Zwischen den Inkubationen in 100% und 96% Ethanol wurde die Aktivität endogener Peroxidasen durch eine 15-minütige Inkubation in 1% (v/v) H₂O₂ in Methanol inhibiert. Nach Waschen in 1x PBS erfolgte je nach Antikörper und Epitopzugänglichkeit eine entsprechende Vorbehandlung.

Nachweis von ...	Verdünnung	Vorbehandlung
hAP-2α	1:200	5x 5 min 10 mM Citratpuffer pH 6.0 (Mikrowelle), Blockieren: 6 Stunden in 10% Ziegen Serum/1%BSA/ 0.1% TritonX-100
mAP-2β	1:2.500	“
mAP-2γ	1:2.500	“
mAP-2δ	1:2.500	“
mNeuN	1:500	“
hGFAP	1:50	5x 5 min 10 mM Citratpuffer pH 6.0 (Mikrowelle), Blockieren: 6 Stunden in 10% Ziegen Serum/1%BSA/ 0.1% TritonX-100
rLH	1:500	Blockieren: 10% Ziegen Serum/1% BSA/0.1%TritonX-100
rFSH	1:500	“
β-TSH	1:1000	“
ACTH	1:1000	“
GH	1:1000	“
LHRH	1:1000	“
BrdU~POD	1:30	20 min 12.3% HCl, 20 min 0.1% Trypsin/0.1% CaCl ₂ , 3x 5 min blockieren in 0.5% BSA/0.1% Tween-20

Nachweis von ...	Verdünnung	Vorbehandlung
human Cleaved Caspase3	1:200	10 min 0.2% TritonX-100, 3x 5 min 10 mM Citratpuffer pH 6.0 (Mikrowelle), Blockieren: 60 min in 5% Ziegen Serum/ 0.1% Tween-20

Diaminobenzidin-Färbung		Immunfluoreszenz	
Nachweis von ...	Sekundärantikörper (1:200 in Blockierungslösung)	Nachweis von ...	Sekundärantikörper (1:500 in Blockierungslösung)
hAP-2 α	anti Kaninchen~Biotin	hAP-2 α	anti Kaninchen~Alexa Fluor 488 oder 568
mAP-2 β	“	mAP-2 β	“
mAP-2 γ	“	mAP-2 γ	“
mAP-2 δ	“	mAP-2 δ	“
mAP-2 ϵ	“	mAP-2 ϵ	“
ratLH	“	ratLH	“
ratFSH	“	ratFSH	“
β -TSH	“	β -TSH	“
ACTH	“	ACTH	“
GH	“	GH	“
LHRH	“	LHRH	“
human Cleaved Caspase3	“	human Cleaved Caspase3	“
mNeuN	anti Maus~Biotin	mNeuN	anti Maus~Alexa Fluor 568
hGFAP	“	hGFAP	“

I Diaminobenzidin- (DAB) Färbung an Paraffinschnitten

Nach erfolgter Inkubation mit dem Antigen-spezifischen Primärantikörper ÜN in einer feuchten Kammer bei 4°C wurden die Schnitte mit 1x PBS gewaschen und 60 min mit einem biotinylierten Sekundärantikörper des Vectastain ABC Kits (Vector Laboratories, Burlingame, USA) 1:200 in Blockierungslösung inkubiert. Die Färbung erfolgte durch die Umsetzung des Diaminobenzidins auf dem Schnitt. Anschließend wurden die Schnitte gewässert und mit einer 10%igen Methylgrün-Lösung gefärbt, in 100% Ethanol und in Xylol dehydriert und mit Entellan eingedeckelt.

II Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten

Nach erfolgter Inkubation mit dem Antigen-spezifischen Primärantikörper ÜN in einer feuchten Kammer bei 4°C wurden die Schnitte mit 1x PBS gewaschen und 60 min mit einem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper 1:500 in Blockierungslösung bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in 1x PBS gespült, 10 min mit DAPI (1:10.000 in 1x PBS) inkubiert, erneut mit 1x PBS gespült und in Eviolin eingedeckelt.

2.2.7.4 Analyse der Zellproliferation durch BrdU-Inkorporation

Mithilfe eines immunhistochemischen Nachweises ist es möglich, sich replizierende DNA in einzelnen mitotisch aktiven Zellen sichtbar zu machen (Gratzner, 1982; Gonchoroff et al., 1986). Dieser

Nachweis basiert auf dem Einbau des Basenanalogs BrdU in die DNA von Zellen in der S-Phase an Stelle der Base Thymidin (Gonchoroff et al., 1986).

Dazu wurde Mäusen zwei Stunden vor dem Experiment BrdU (BD Biosciences, Heidelberg) in einer Konzentration von 50 µg/g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach Ablauf der Inkorporationszeit wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, die benötigten Gewebe wurden präpariert und üN in 4% PFA in 1x PBS fixiert. Beginnend mit dem nächsten Tag wurden die Gewebe in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und so für die Anfertigung von Paraffinschnitten vorbereitet. Die Paraffinschnitte wurden wie beschrieben deparaffiniert, rehydriert und vorbehandelt. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Peroxidase-gekoppelten BrdU-Antikörper (1:30 in BSA-Tween) bei 4°C üN in einer feuchten Kammer inkubiert, mit 1x PBS gewaschen und der Antikörper-Nachweis erfolgte durch eine DAB-Färbung. Das Gewebe wurde durch Mayer's Hämalaun (1:5 in Leitungswasser verdünnt) gegengefärbt, unter Leitungswasser fließend gebläut, über eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert und mit Entellan eingedeckelt. Zellen, die sich während der zweistündigen BrdU-Inkorporation geteilt haben, zeigten eine braune Kernfärbung.

2.2.7.5 Analyse apoptotischer Prozesse

I Färbung aktivierter Caspase3

Apoptose wird von einer Kaskade von Enzymen schrittweise initiiert. Die wichtigsten dieser Enzyme sind Caspasen, die als Proteasen in ihrem aktiven Zentrum Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat spalten (Cysteiny-Aspartasen). Extrazelluläre Signale leiten die Aktivierung der Caspasen ein, die eine zum Zelltod führende Signalkaskade auslösen.

Paraffinschnitte wurden wie beschrieben über Xylol und eine absteigende Ethanolreihe deparaffiniert und rehydriert. Anschließend wurden die Präparate in 0.2% TritonX-100 in 1x PBS permeabilisiert, in 10 mM Citratpuffer pH 6.0 gekocht, abgekühlt und 5 min in 1x PBS inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine 60-minütige Inkubation in 5% Ziegerserum und 0.1% Tween-20 in 1x PBS abgesättigt. Die Bindung des Primärantikörpers human Cleaved Caspase3 erfolgte im Verhältnis 1:200, verdünnt in 0.1% Tween-20 in 1x PBS üN bei 4°C in einer feuchten Kammer. Es folgten mehrere Waschschrte (2x 10 min 1x PBS, 2x 10 min 0.1% Tween-20 in 1x PBS, 2x 10 min 1x PBS), an die sich die Inkubation des Sekundärantikörpers analog zur DAB-Färbung anschloß.

II TUNEL-Assay

Um Zelltod im Gewebe nachzuweisen, wurde neben der Färbung der aktivierten Caspase-3 der TUNEL-Assay (TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit; Oncogene, Boston, USA) verwendet. Der Zelltod aufgrund von Apoptose löst eine Vielzahl zellulärer Prozesse aus, so auch die Fragmentierung der DNA durch Endonucleasen. Der TUNEL-Assay basiert auf der Bindung der Terminalen deoxynuceotidyl-Transferase (TdT) an die freien 3'-Hydroxylgruppen fragmentierter DNA. In einer Cobalt-abhängigen Reaktion katalysiert die TdT nun die Anlagerung Biotin-markierter dNTPs an die doppelsträngige DNA (Roychoudhury et al., 1976). Die so markierten dNTPs wurden durch ein Peroxidase-Streptavidin-Konjugat detektiert und mittels DAB-Färbung nachgewiesen.

2.2.7.6 In situ Hybridisierungen

I Whole mount in situ Hybridisierungen an Embryonen

Embryonen bis zum Tag 12 der Embryogenese wurden nach der Entnahme kurz in 1x PBS gespült, in 4% PFA üN bei 4°C fixiert, 2x 5 min in PBT (0.1% Tween-20 in 1x PBS) gewaschen und durch eine aufsteigende Methanolreihe dehydriert (25%, 50%, 75% Methanol in PBT, je 5 min). Die Embryonen wurden in 100% Methanol bei -20°C gelagert. Für die whole mount in situ Hybridisierung wurden die gelagerten Embryonen durch eine absteigende Methanolreihe rehydriert (75%, 50%, 25% Methanol in PBT, je 5 min), 2x 15 min in PBT inkubiert und mit Proteinase K (10µg/mL in PBT) angedaut. Dabei ist die Inkubationsdauer abhängig vom Alter der Embryonen:

Alter der Embryonen	Inkubationszeit [min]	Temperatur
E 7.5	3	RT
E 8.5	5	RT
E 9.5	10 – 12	37°C
E 10.5	13 – 15	37°C
E 11.5	13 – 15	37°C
E 12.5	15	37°C
E 14.5	15 – 17	37°C
E 17.5	20	37°C

Anschließend wurde die Proteinase K-Behandlung durch eine 10-minütige Inkubation in einer Glycin-Lösung (2 mg/mL Glycin in PBT) abgestoppt, die Embryonen wurden 2x in PBT gewaschen und 20 min in 0.2% Glutaraldehyd/4% PFA nachfixiert, erneut zweimal gewaschen und in 500 µL vorgewärmter Hybridisierungslösung für 60 min prähybridisiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde wurde 2 min bei 80°C inkubiert, in 1 mL frischer Hybridisierungslösung verdünnt und die Embryonen wurden üN bei 70°C in jeweils 500 µL der Probe-enthaltenden Hybridisierungslösung inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Embryonen 2x für 30 min bei 70°C mit Lösung 1 gewaschen, 10 min bei 70°C in einem 1:1-Gemisch aus Wasch-Lösung 1 und Wasch-Lösung 2 inkubiert, gefolgt von 3 Waschschritten á 5 min in Wasch-Lösung 2 bei RT. Anschließend wurden die nicht-hybridisierten RNA-Moleküle durch eine RNase-Behandlung (100 µg/mL in Wasch-Lösung 2) für 30 min bei 37°C abgebaut. Danach erfolgten mehrere Waschschriffe: Wasch-Lösung 2 (5 min, RT), Wasch-Lösung 3 (5 min, RT), Wasch-Lösung 3 (2x 30 min, 65°C) und MAB (3x 5 min, RT). Die Embryonen wurden 3 Stunden in MAB mit 2% Blocking-Reagenz und 10% normalem Schaf-Serum inkubiert. 60 min vor Ablauf der Inkubationszeit wurden 2 µL des Alkalische Phosphatase-gekoppelten Digoxigenin-Antikörpers in 500 µL MAB, 2% Blocking Reagenz und 5 µL normalem Schaf-Serum bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Der Ansatz wurde abzentrifugiert, der Überstand wurde mit 6 mL MAB, 2% Blocking-Reagenz und 1% normalem Schaf-Serum versetzt und die Embryonen wurden üN bei 4°C in 1 mL der Antikörperlösung inkubiert. Am dritten Tag wurden die Embryonen in 15 mL Falcon-Röhrchen überführt und stündlich mit MAB-Puffer gewaschen. Am vierten Tag erfolgte die Färbung der Embryonen nach 3 Waschschriffen in NTMT á 10 min bei RT. Dazu wurden die Embryonen in 12- bis 24-well-Platten überführt und in 1 mL Färbelösung (0.5 mg Levamisole/1ml BM Purple (Roche, Penzberg)) für 4 bis 24 Stunden bei RT oder zur Inkubation üN bei 4°C inkubiert. Die Embryonen wurden 3x in PBT gewaschen, üN in 4% PFA fixiert, erneut in PBT gewaschen und in PBT bei 4°C gelagert. Die Auswertung und Dokumentation der in situ Hybridisierung erfolgte in einer Agarose-beschichteten Petrischale mithilfe eines Binokulars.

III Radioaktive in situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden in Xylol deparaffiniert, durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und 2x in H₂O dest. gewässert. Die Objekte wurden durch eine Proteinase K-Behandlung (10 µg/mL Proteinase K in 100 mM Tris-Cl/50 mM EDTA pH 8.0) für 30 min bei 37°C angedaut, 5 min mit 4% PFA auf Eis nachfixiert und 2x in H₂O dest. gewässert. Um eine unspezifische Hybridisierung der Sonde mit geladenen Gruppen auf dem Schnitt zu vermeiden, wurden diese 5 min in 100 mM Triethanolamin pH 8.0 und anschließend 10 min 0.25% Essigsäureanhydrid in 100 mM Triethanolamin pH 8.0 acetyliert. Die Schnitte wurden gewässert und infolge einer aufsteigenden Alkoholreihe getrocknet. Die ³³P-markierte Probe wurde 5 min bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und auf 40.000 Zerfälle mit vorgewärmtem Hybridisierungs-Mix verdünnt. Anschließend wurde die Probe auf den Schnitt pipettiert, die Schnitte wurden mit Parafilm luftblasenfrei abgedeckt und üN bei 52°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Infolge mehrmaligen Waschens (5 min 5x SSC, 2x 30 min Wasch-Puffer bei 52°C, 2x 5 min 2x SSC-Puffer bei RT) wurden RNA-Moleküle, die nicht als RNA-RNA-Hybrid vorliegen, durch eine 30-minütige RNase A-Behandlung bei 37°C abgebaut. Nach wiederholt stringenten Waschschriffen (2x 30 min Wasch-Puffer bei 52°C, 2x 5 min 2x SSC-Puffer bei RT) wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert und getrocknet. Zunächst wurden die Schnitte üN einem Röntgenfilm gegenüber exponiert, um in etwa die Expositionszeit abzuschätzen. Schließlich wurden die Schnitte in eine Fotoemulsion (Kodak NTB2) getaucht und in Abhängigkeit von der Signalstärke für 3-20 Tage bei 4°C in einer lichtdichten Kammer exponiert und

mit Kodak D19-Entwickler und Fixierer entwickelt. Die Schnitte wurden danach mit Hämalaun gegengefärbt (1 min Mayer's Hämalaun 1:5), durch die aufsteigende Ethanolreihe dehydriert und mit Entellan eingedeckelt. Die durch die radioaktive Strahlung zum metallischen Silber reduzierten Silberionen wurden im Dunkelfeld als weiße Punkte erkannt.

IV Digoxigenin in situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden durch Xylol von Paraffin befreit, durch eine absteigende Alkoholreihe (2x 100%, 96%, 80%, 70%) rehydriert und 20 min mit 4% PFA in 1x PBS pH 9.5 nachfixiert. Anschließend wurden die Schnitte 10 min in 200 mM HCl inkubiert, in 1x TBS gewaschen und 20 bis 30 min mit Proteinase K (10 µg/mL Proteinase K/2 mM CaCl₂) angedaut und erneut in 1x TBS inkubiert, davon zuletzt 5 min auf Eis. Die Vorbereitung der Schnitte zur in situ Hybridisierung wurde durch Ethanol-Bäder und anschließendes Trocknen der Schnitte abgeschlossen. 1 µL der vorbereiteten Probe wurde zu 100 µL des vorgewärmten Hybridisierungs-Mix gegeben, 5 min bei 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Nachdem 10 bis 20 µL der verdünnten Probe auf die Schnitte gegeben worden waren, wurden die Schnitte mit Parafilm abgedeckt und üN bei 55°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend in 2x SSC inkubiert, 3x 20 min bei 55°C in Waschpuffer (50% Formamid/1x SSC) und 3x 20 min bei RT in 1x SSC gewaschen. Nach kurzem Schwenken der Schnitte in 1x TBS wurden die Schnitte 15 min in Blockierungslösung inkubiert. Daran schloß sich die Inkubation der Präparate mit dem Alkalische Phosphatase-gekoppelten Digoxigenin-Antikörper (1:500 in Blockierungslösung) für 60 min bei RT an. Die Schnitte wurden in 1x TBS gewaschen und mit NBT/BCIP-Lösung (Roche, Penzberg) mehrere Stunden bis üN bei 4°C inkubiert. Die Färbung wurde durch die Zugabe von TE gestoppt und die Schnitte wurden in Aquatex (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalysen von AP-2 δ

Vorraussetzung für eine gezielte und effiziente Analyse der AP-2 δ Mausmutanten ist eine detaillierte Analyse des Expressionsmusters während der Embryonalentwicklung und in adulten Geweben. Dies wurde auf RNA-Ebene zum einen mit der Methode der RT-PCR untersucht. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus Mausembryonen unterschiedlicher Embryonalstadien von Tag E8.5 bis Tag E17.5 bzw. aus verschiedenen adulten Geweben isoliert. Für die RT-PCR wurde die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben ehe ein AP-2 δ -spezifisches Produkt durch PCR mit AP-2 δ -spezifischen Primern amplifiziert wurde. Das AP-2 δ -spezifische Produkt umfaßte einen Bereich von 505 bp, der das erste Exon und 14 bp der angrenzenden 5'-UTR, sowie das zweite Exon einschloß und später ebenfalls als AP-2 δ -spezifische Sonde für in situ Hybridisierungen verwendet wurde. Nach erfolgter Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung konnte bereits am Tag E9.5 ein sehr schwaches Produkt im UV-Licht detektiert werden (Abb. 5).

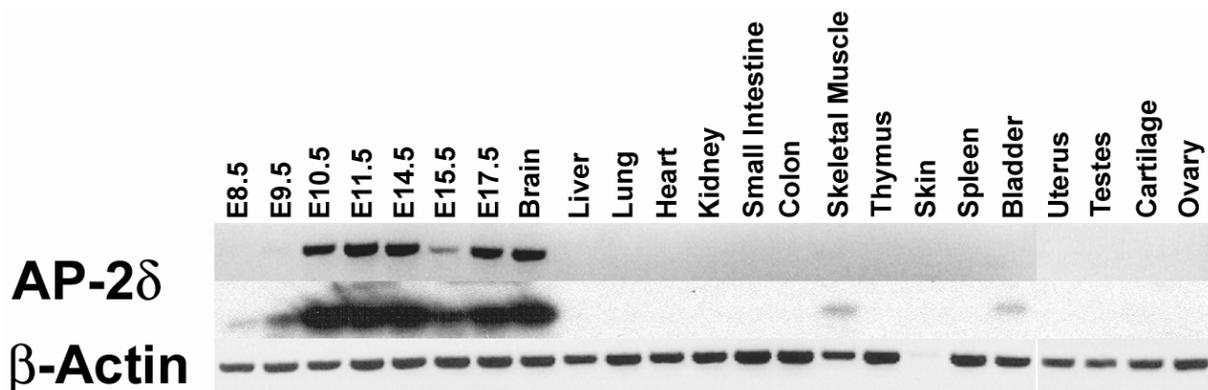


Abb. 5: Nachweis der AP-2 δ Expression während der murinen Embryonalentwicklung, sowie im Gewebe adulter Mäuse durch RT-PCR mit AP-2 δ -spezifischen Primern (oben) und nach Southern Hybridisierung mit einer AP-2 δ -spezifischen Sonde (Mitte). Die Normalisierung jeder cDNA erfolgte durch eine RT-PCR mit β -Actin-spezifischen Primern (unten).

Anschließendes Blotting des Gels und Hybridisierung der Nylonmembran mit der gesamten AP-2 δ cDNA zeigte, daß AP-2 δ bereits am Tag E8.5 in embryonalem Geweben exprimiert wird. Insgesamt erstreckt sich die Expression der AP-2 δ Isoform über den untersuchten Zeitrahmen der murinen Embryogenese und erreicht ein Maximum zwischen E11.5 und E14.5. In adultem Gewebe konnte mit dieser Methode ein starkes Signal im Gehirn, sowie schwache Signale AP-2 δ -spezifischer Produkte im Skelettmuskel und in der Blase detektiert werden. In allen anderen untersuchten Organen konnte dagegen keine AP-2 δ Expression nachgewiesen werden.

Da die Methode der RT-PCR nur grobe Informationen hinsichtlich der Expressionsverteilung eines Gens liefert und keine Aussagen über die spezifischen Zelltypen und Areale macht, in denen AP-2 δ exprimiert wird, wurden whole mount in situ Hybridisierungen an Embryonen mit einer Digoxigenin-markierten AP-2 δ -spezifischen Probe, sowie in situ Hybridisierungen auf Paraffin-Schnitten mit einer

radioaktiv-markierten AP-2 δ -spezifischen Sonde durchgeführt. Als AP-2 δ -spezifische Sonde wurde das 505 bp umfassende Produkt der RT-PCR verwendet.

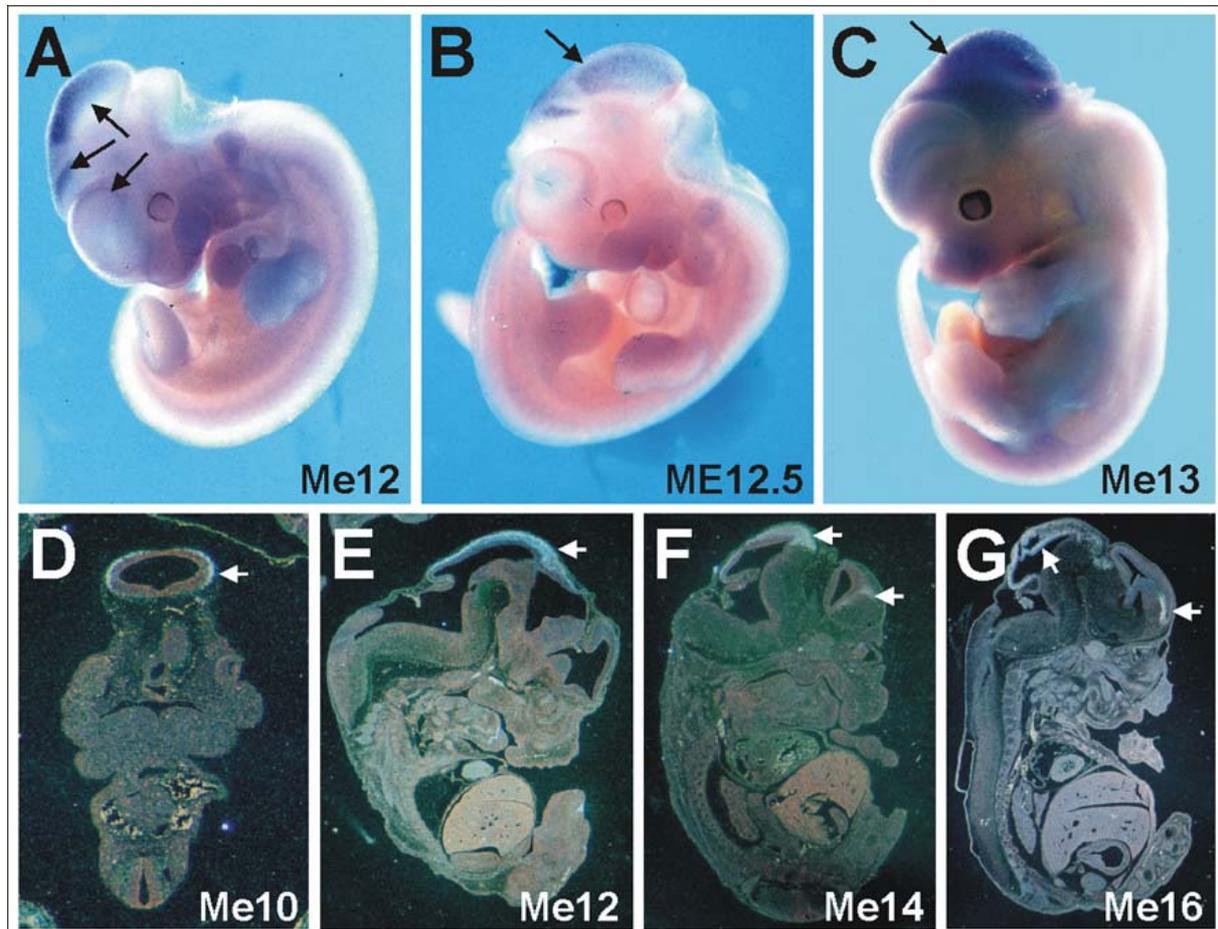


Abb. 6: Nachweis der AP-2 δ -Expression im Dach des Mesencephalons (A-G), im dorsalen Thalamus (A-B) sowie im Vorderhirn (F, G) während der murinen Embryonalentwicklung durch whole mount in situ Hybridisierungen an 12-13 Tage alten Embryonen mit einer Digoxigenin-markierten AP-2 δ -spezifischen Probe (Me12-Me13; A-C) und auf Paraffinschnitten mit einer radioaktiv-markierten AP-2 δ -spezifischen Probe (D transversal; E-G sagittal).

Whole mount in situ Hybridisierungen mit einer Digoxigenin-markierten AP-2 δ -spezifischen Sonde zeigten, daß AP-2 δ bereits im embryonalen Gehirn exprimiert wird und ergänzen somit die Ergebnisse der RT-PCR. Die Expression von AP-2 δ wurde zwischen dem 12. und dem 13. Tag der Embryogenese spezifisch im Mittelhirn und im Zwischenhirn nachgewiesen (Abb. 6, A-C). In situ Hybridisierungen mit einer radioaktiv-markierten AP-2 δ -spezifischen Probe an transversalen und sagittalen Schnitten von Mausembryonen bestätigen die spezifische Expression von AP-2 δ im Gehirn und lokalisieren AP-2 δ zwischen E10 Bis E16 im Mittelhirndach und im dorsalen Zwischenhirn (Abb. 6, D-G). Ab dem Tag E14 der Embryonalentwicklung kann AP-2 δ -spezifisches Transkript zusätzlich im neopallialen Cortex nachgewiesen werden (Abb. 6, F, G).

Im Folgenden wurde die Expression von AP-2 δ im Gehirn mithilfe radioaktiver in situ Hybridisierungen an sagittalen Schnitten von Mausembryonen und isolierten Gehirnen neugeborener und 3 Monate alter Mäuse genauer untersucht. Sagittale Schnitte 12, 14 und 16 Tage alter Mausembryonen zeigten

eine Verschiebung des Expressionsmusters von AP-2 δ im Laufe der Embryonalentwicklung in Richtung des posterioren Mittelhirns. Demgegenüber wird die Expression von AP-2 δ zum Ende der Embryogenese im anterioren Mittelhirn immer schwächer (Abb. 7, C, D). Schließlich konzentriert sich die Expression von AP-2 δ zum Ende der Embryonalentwicklung in der Grenzregion zum Hinterhirn (Abb. 7, C, D). Sagittale Schnitte adulter Gehirne weisen AP-2 δ vor allem im posterioren Part des Mittelhirns, dem Colliculus Inferior nach (Abb. 7; E, F). Zusätzlich zur Expression im posterioren Mittelhirn wird AP-2 δ sowohl während der Embryogenese, als auch im adulten Gehirn sehr schwach im anterioren Mittelhirn und im Zwischenhirn - dort besonders im dorsalen Thalamus -, exprimiert (Abb. 6; Abb. 7 weiße Pfeile).

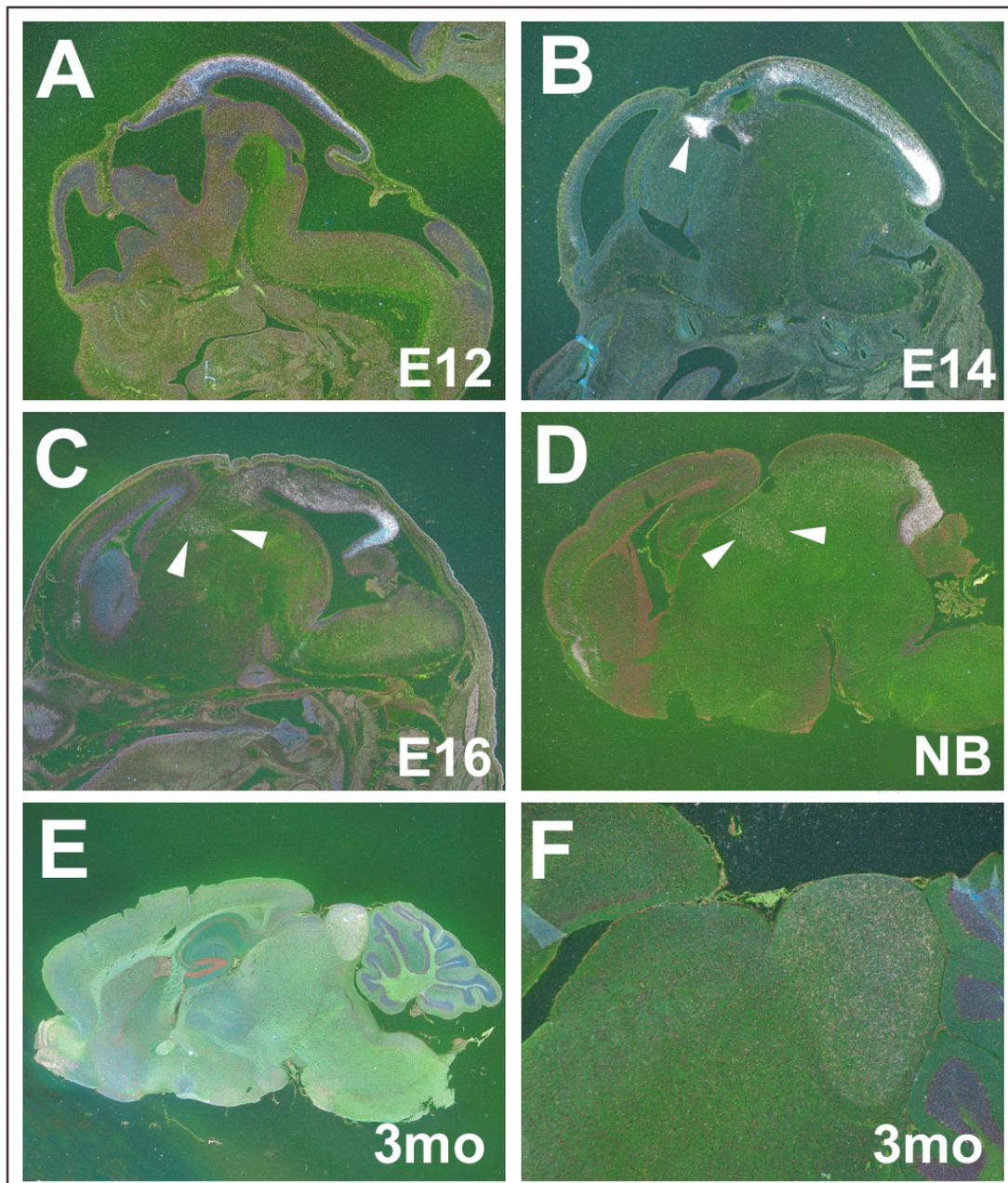


Abb. 7: Radioaktive in situ Hybridisierungen an sagittalen Paraffinschnitten ganzer Embryonen (E12-E16, A-C) und isolierter Hirne (D-F) neugeborener (NB; D) und 3 Monate alter Mäuse (3 mo; E, F) mit einer AP-2 δ spezifischen Probe. Konzentration der AP-2 δ Expression im posterioren Mesencephalon (A-F), Expression von AP-2 δ im dorsalen Thalamus (A-D; weiße Pfeile in B-D).

3.2 Expression von AP-2 δ in Neuronen des Mittelhirns

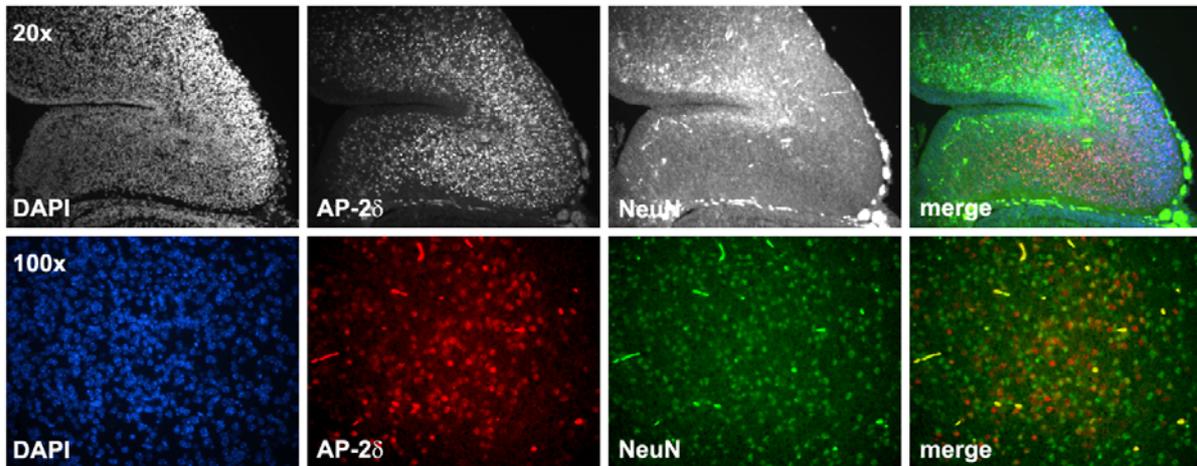


Abb. 8: Doppel-Immunfluoreszenzen an sagittalen Paraffinschnitten von 15 Tage alten Maushirnen mit AP-2 δ und NeuN.

Erste Hinweise auf eine mögliche Expression von AP-2 Proteinen in differenzierten Neuronen lieferten die immunhistologischen Untersuchungen von Coelho und Kollegen, die AP-2 α in NeuN-positiven, differenzierten Neuronen in verschiedenen Gehirnarealen detektierten (Coelho et al., 2005). NeuN (neuron-specific nuclear protein) wird vorwiegend in den Zellkernen postmitotischer Neurone des zentralen und des peripheren Nervensystems exprimiert (Mullen et al., 1992). Um AP-2 δ -exprimierende Zellen im posterioren Mittelhirn zu identifizieren, wurden Doppel-Immunfluoreszenzen mit AP-2 δ und NeuN auf sagittalen Paraffinschnitten von 15 Tagen alten Mausembryonen angefertigt. Die Doppel-Immunfluoreszenz zeigte, daß AP-2 δ überwiegend in nicht differenzierten Neuroblasten exprimiert wird. Jedoch exprimieren einige differenzierte, NeuN-positive Neurone ebenfalls AP-2 δ (Abb. 8).

3.3 Zellkultur-basierte neuronale Modelle zur Analyse der AP-2 δ Expression

Da AP-2 δ nahezu ausschließlich in neuronalen Geweben exprimiert wird, wurde die Funktion von AP-2 δ in neuronalen Zellen untersucht. Dazu wurde eine neuronale Zelllinie gesucht, die AP-2 δ entweder endogen exprimiert oder in der die Expression von AP-2 δ durch geeignete Stimulation induziert werden kann.

AP-2 Proteine werden während der Embryonalentwicklung in einigen Retinsäure-sensitiven Geweben wie der Haut und den Neuralleistenzellen exprimiert und die Induktion von AP-2 Proteinen durch das Morphogen Retinsäure war bereits durch einige Gruppen beschrieben worden (Williams et al., 1988; Lüscher et al., 1989; Mitchell et al., 1991; Oulad-Abdelghani et al., 1996). Nach der Induktion der P19-Zellen mit Retinsäure, wurde die gesamte RNA der Zellen präpariert und anschließend in cDNA

umgeschrieben. Die so erhaltene cDNA wurde in einer RT-PCR eingesetzt, die zur Amplifikation eines AP-2 γ - (439 bp), bzw. eines AP-2 δ -spezifischen Produkts (505 bp) mithilfe von spezifischen Primern für AP-2 γ und AP-2 δ führte. Da die Retinsäure-vermittelte Induktion von AP-2 γ bereits beschrieben werden konnte, diente AP-2 γ in diesem Experiment als Positivkontrolle. So zeigte sich, daß die Expression von AP-2 γ durch Retinsäure in den P19-Zellen induziert werden konnte, was anhand der stärkeren Bande in den jeweils mit Retinsäure behandelten Proben ersichtlich ist. Demgegenüber wird AP-2 δ nicht in P19-Zellen exprimiert und eine AP-2 δ -spezifische Expression konnte in P19-Zellen nicht durch Retinsäure induziert werden.

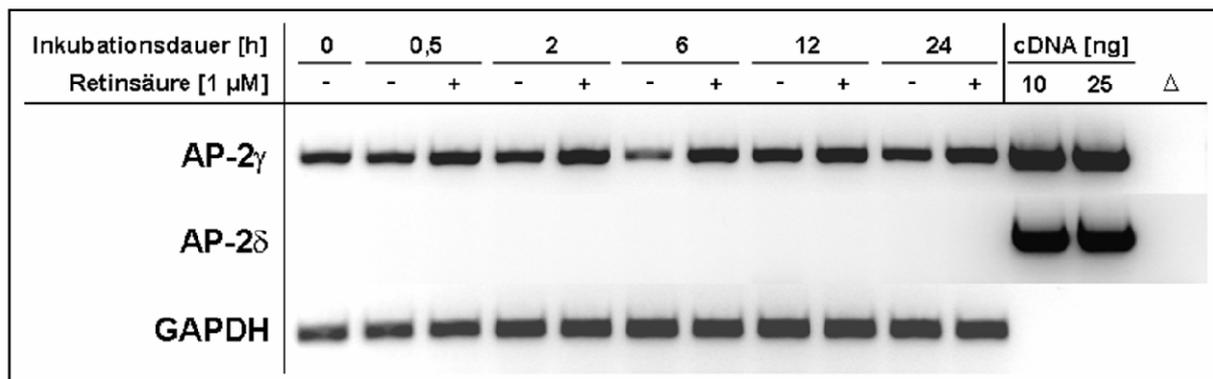


Abb. 9: Induktion der AP-2 γ und AP-2 δ Expression durch Stimulation von P19-Teratocarcinomazellen durch Retinsäure (RA) in einem Zeitraum von 24 Stunden. RT-PCR mit AP-2 γ - und AP-2 δ -spezifischen Primern (oben). Die RT-PCR mit GAPDH-spezifischen Primern diente als Referenz und dem Abgleich der aufgetragenen Probenmengen (unten).

Als zweites Zellsystem wurden PC12-Zellen verwendet, die infolge der Stimulation der Zellen mit NGF (nerve growth factor) neuronal differenzieren und die Genexpression verschiedener Gene induzieren (Vaudry et al., 2002; Marek et al., 2004; Suzuki et al., 2004). Um den Effekt der Stimulation der PC12-Zellen mit NGF auf die Expression von AP-2 δ zu untersuchen, wurden PC12-Zellen bis zu 8 Tagen mit NGF stimuliert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationsdauer wurde die gesamte RNA der PC12-Zellen analog zu den P19-Zellen präpariert und in cDNA umgeschrieben. Ein AP-2 δ -spezifisches Produkt (505 bp) wurde durch RT-PCR mit AP-2 δ -spezifischen Primern amplifiziert, konnte aber nur für die Positivkontrolle (AP-2 δ cDNA) nachgewiesen werden. Dieses Experiment zeigt, daß AP-2 δ nicht in PC12-Zellen exprimiert wird und die Expression von AP-2 δ in PC12-Zellen nicht durch NGF induziert werden kann.

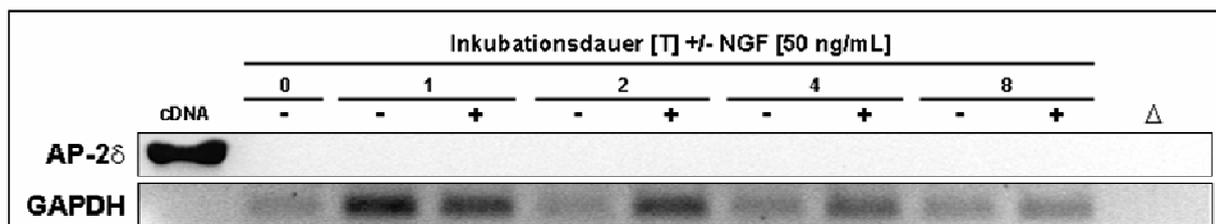


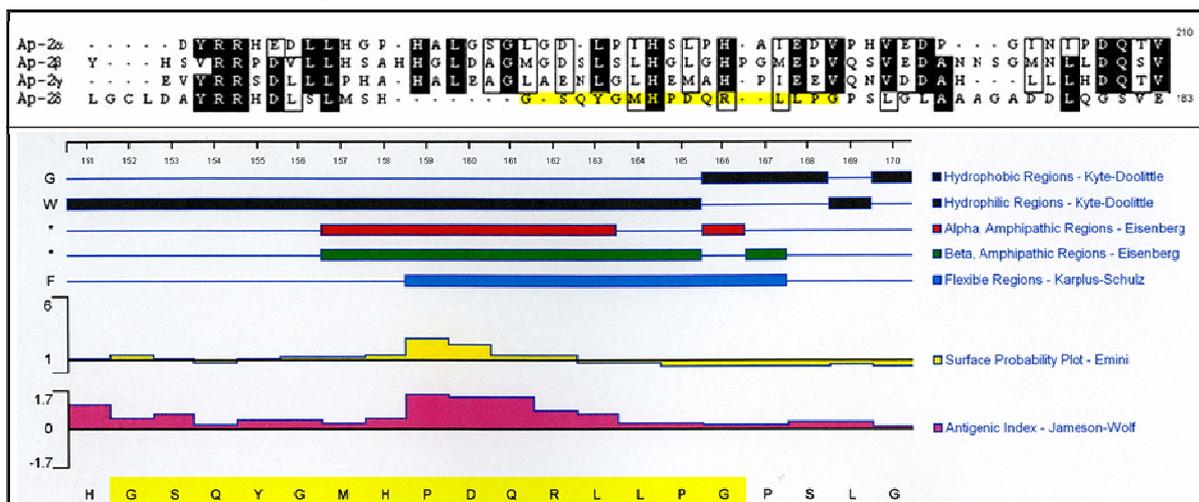
Abb. 10: Induktion der AP-2 δ Expression durch Stimulation von PC12-Zellen mit NGF in einem Zeitraum von 8 Tagen. RT-PCR mit AP-2 δ -spezifischen Primern (oben). Die RT-PCR mit GAPDH-spezifischen Primern diente als Referenz und dem Abgleich der aufgetragenen Probenmengen (unten).

3.4 Generierung eines AP-2δ-spezifischen, polyklonalen Antikörpers

Um die Expression und Funktion von AP-2δ nicht nur auf der Ebene der mRNA mittels in situ Hybridisierungen, sondern zusätzlich auf Proteinebene analysieren zu können, wurde ein polyklonaler AP-2δ-spezifischer Antikörper in Kaninchen generiert.

Die Proteinsequenz des AP-2δ Proteins (Genbank NP_694794) wurde mithilfe verschiedener Algorithmen untersucht, die Aussagen über die Eignung bestimmter Sequenzen innerhalb des Proteins als Antigen (Jameson-Wolf-Algorithmus; Jameson and Wolf, 1988), über hydrophobe Bereiche des Proteins (Kyte-Doolittle-Algorithmus; Kyte and Doolittle, 1982), die Lage amphipatischer Regionen (Eisenberg-Algorithmus; Eisenberg et al., 1984), über flexible Regionen innerhalb des Proteins (Karplus-Schulz-Algorithmus; Karplus and Schulz, 1985), sowie über die Wahrscheinlichkeit machen, mit der eine bestimmte Region des Proteins nach außen exponiert wird (Emini et al., 1985). Weiterhin sollten Peptide ausgewählt werden, die möglichst geringe Homologien zu anderen AP-2 Isoformen aufwiesen. Dazu wurde die Proteinsequenz der murinen AP-2δ Isoform mit den Proteinsequenzen der anderen murinen AP-2 Isoformen in einem multiplen Alignment verglichen (siehe Einleitung, Abb. 2). Nach Analyse der Daten erwiesen sich hauptsächlich zwei Regionen der murinen AP-2δ Proteinsequenz aufgrund ihres antigenen Potentials als besonders geeignet, um deren Peptidsequenzen als Antigene zur Synthese eines AP-2δ-spezifischen polyklonalen Antikörpers in Kaninchen zu nutzen.

AP-2δ N-Term, Peptid P-1191



AP-2δ C-Term, Peptid P-1184

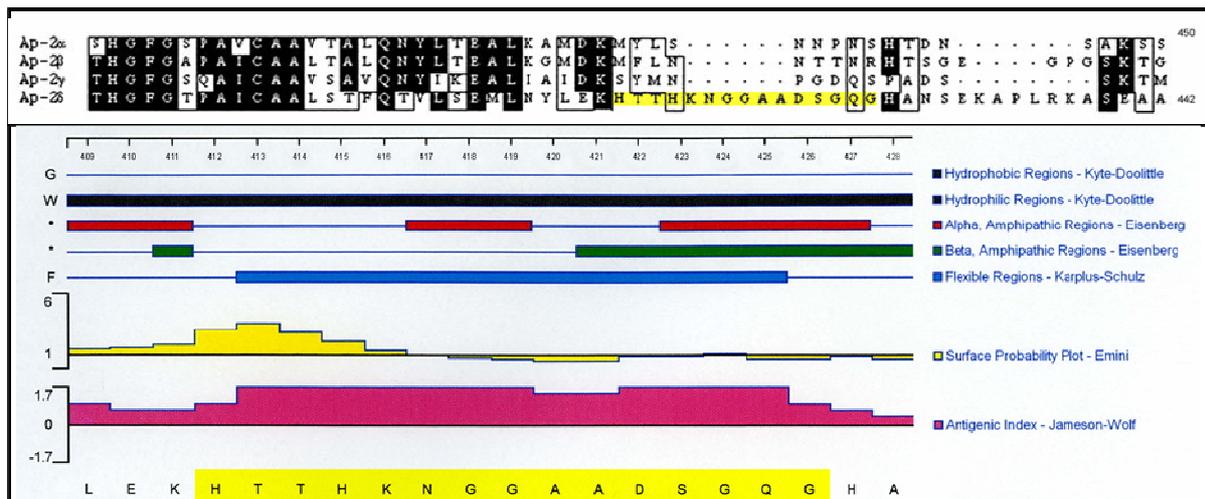


Abb. 11: Bestimmung geeigneter Peptide des AP-2δ Proteins zur Generierung eines polyklonalen Antikörpers. Oben: N-terminales Peptid P-1191 (Aminosäuren 151 bis 165), unten: C-terminales Peptid P-1184 (Aminosäuren 412 bis 426). Dargestellt ist jeweils der Sequenzkontext des jeweiligen Peptids (oben) und die Analyse der Aminosäuresequenz hinsichtlich möglicher Sekundärstrukturen, hydrophober oder hydrophiler Regionen, der Oberflächenwahrscheinlichkeit und des antigenen Index (unten, ermittelt mit der Sequenzanalyse Software Lasergene™ (DNASTar, Madison, USA)). Die beiden ausgewählten Peptide sind in beiden Darstellungen jeweils gelb hinterlegt.

Diese jeweils 15 Aminosäuren langen Peptide wurden nach ihrer Synthese an das Trägermolekül KLH gekoppelt. Zur initialen Immunisierung wurde das KLH-gekoppelte Peptids mit dem Adjuvans Titer Max zu einer Emulsion verbunden und subkutan in ein Kaninchen injiziert.

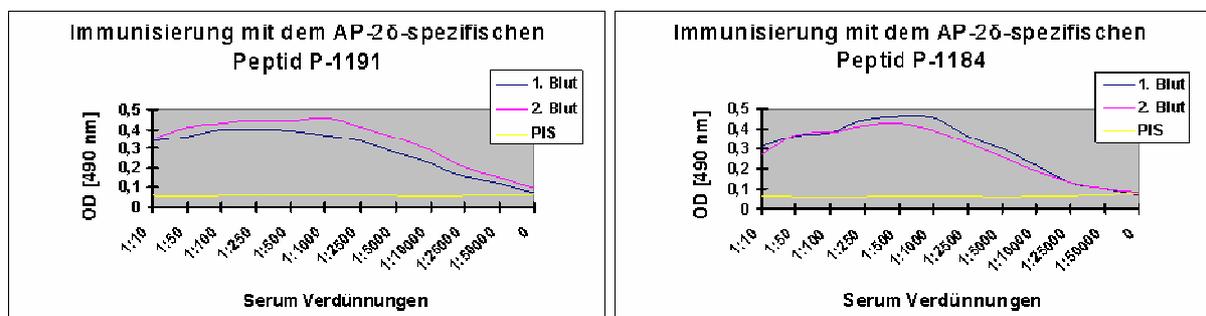


Abb. 12: Ermittlung der Immunantwort nach der Immunisierung mit den beiden AP-2δ-spezifischen Peptiden. PIS Präimmunserum

Die entstandene Immunantwort wurde durch wiederholte Injektionen mit einer Emulsion aus KLH-gekoppeltem Peptid und Freund's Incomplete Adjuvans in Abständen von 4 Wochen verstärkt (Boost). Zwei Wochen nach den jeweiligen Boosts wurde den Kaninchen Testblut für ELISA und Immunoblot Analysen abgenommen. Die Auswertung des ELISA-Assays zeigte, daß nach der ersten Auffrischung keine Steigerung der Immunantwort durch eine zweite Immunisierung eintrat (Abb. 12). Zwei Wochen nach dem dritten Boost wurden die Kaninchen ausgeblutet.

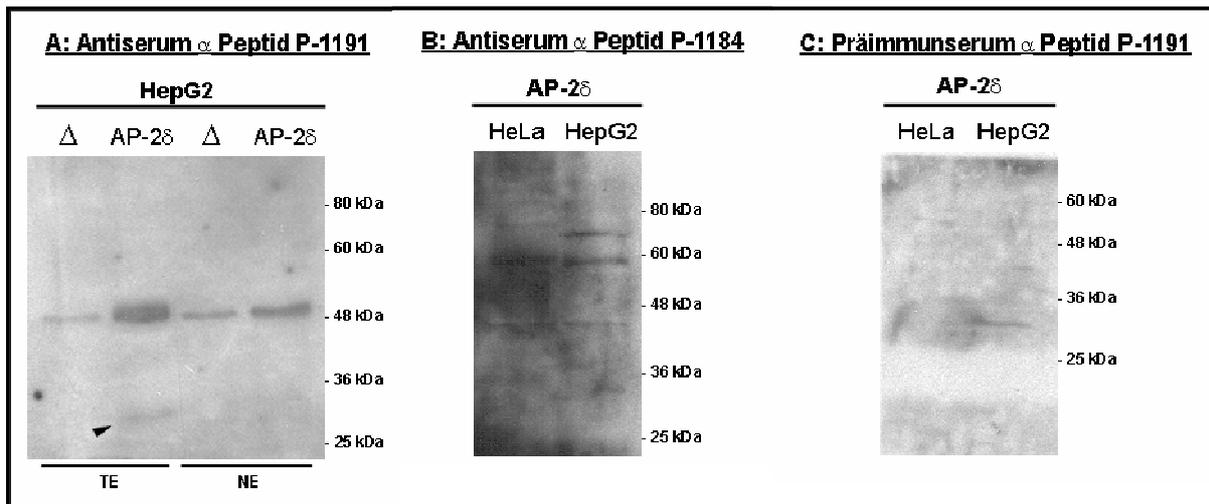


Abb. 13: Analyse der Antiseren durch Immunoblotting. In 10% (A, B) bzw. 12.5% (C) SDS-Gelen wurden jeweils 20 µg Totale (A,B,C) und 10 µg Nukleäre (A) Extrakte gelelektrophoretisch aufgetrennt, die aus HeLa- oder HepG2-Zellen nach der Transfektion mit dem „leeren“ pCMX-PL1 Vektor (Δ) oder AP-2 δ in pCMX-PL1 (AP-2 δ) gewonnen wurden. Nach anschließendem Transfer wurden die Membranen mit Antiseren gegen die jeweiligen Peptide (A, B) oder mit Präimmunserum (C) inkubiert. Der Pfeil in (A) verweist auf ein AP-2 δ -spezifisches Degradationsprodukt (siehe auch Abb. 12). NE Nukleärer Extrakt, TE Totaler Extrakt.

Das Antiserum der Kaninchen wurde mithilfe des Immunoblottings analysiert. Dazu wurde die cDNA, die das gesamte AP-2 δ Protein enthält, in den Vektor pCMX-PL1 kloniert, der AP-2 δ unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. Mit diesem Konstrukt, sowie dem leeren Vektor als Negativkontrolle wurden HeLa- und HepG2-Zellen transfiziert. Ein Teil der Zellen diente zur Präparation Totaler Extrakte (TE), während aus dem verbliebenen Anteil Kern- oder Nukleäre Extrakte (NE) gewonnen wurden. 20 µg der Totalen Extrakte, bzw. 10 µg der Kernextrakte wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen und mit den entsprechenden Seren (Antiserum oder Präimmunserum) inkubiert. Dabei zeigte sich, daß lediglich das Antiserum gegen das Peptid P-1191 ein Protein in einer Größe von ca. 50 kDa erkennen konnte, bei dem es sich vermutlich um AP-2 δ handelt (Abb. 13, A). Da die Membran mit Extrakten der Negativkontrolle bei 48 kDa ebenfalls eine Bande aufweist, läßt sich vermuten, daß das Antiserum neben AP-2 δ ein weiteres Protein ähnlicher Größe erkennt, da in HeLa- wie auch HepG2-Zellen keine AP-2 δ Expression nachzuweisen ist. Im Gegensatz dazu erkennt das Antiserum, das gegen das C-terminale AP-2 δ Peptid (P-1184) gerichtet ist, in AP-2 δ -transfizierten HepG2- wie auch in AP-2 δ -transfizierten HeLa-Zellen kein Protein von ca. 50 kDa (Abb. 13, B). Um auszuschließen, daß das Blut der Kaninchen vor der Immunisierung bereits eine Kreuzreaktion mit anderen Proteinen aufweist, wurde aus dem Blut der Kaninchen vor der Immunisierung Präimmunserum gewonnen. Dieses Präimmunserum, das aus dem Kaninchen gewonnen wurde, das später mit dem Peptid P-1191 immunisiert wurde, detektierte im Immunoblot von Totalen Extrakten transfizierter HeLa und HepG2-Zellen kein Protein mit der Größe von ca. 50 kDa (Abb. 13, C).

Um die Spezifität des Antikörpers zu erhöhen, wurde eine Affinitätsreinigung des Kaninchensersums gegen das gekoppelte Peptid P-1191 mithilfe des Sulfo Link[®] Kits durchgeführt. Die Affinitätsreinigung ergab einen hochspezifischen Antikörper gegen AP-2 δ (Abb. 14).

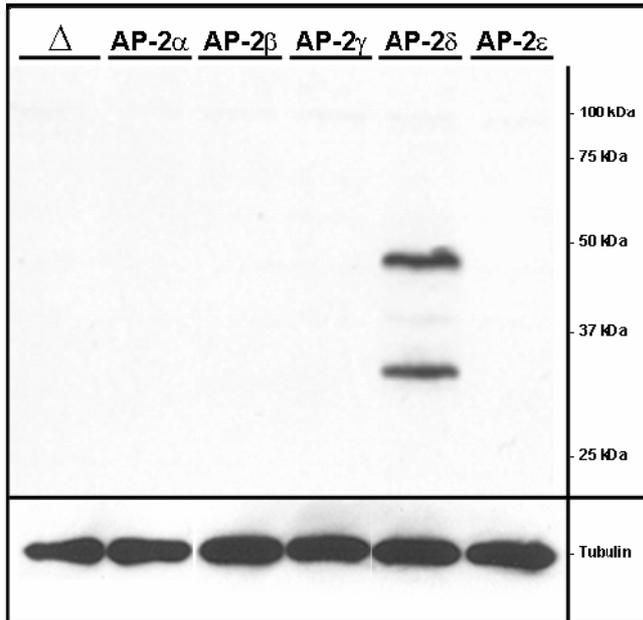


Abb. 14 :

10% SDS-Gel mit jeweils 20µg Totalem Extrakt aus transfizierten HepG2-Zellen und anschließendes Immunoblotting mit dem affinitätsgereinigten AP-2δ-spezifischen Antiserum gegen das N-terminale Peptid P-1191. Die HepG2-Zellen wurden mit Konstrukten transfiziert, die die kompletten cDNAs der murinen AP-2 Proteine enthalten. Der Vektor pCMX-PL1 diente als Negativkontrolle (Δ). Ein anschließender Immunoblot mit Tubulin als Referenzprotein diente dem Abgleich der aufgetragenen Proteinmengen.

Lediglich die Bande zwischen 37 und 25 kDa, die bereits mit dem ungereinigten Antiserum detektiert wurde (siehe Abb. 13, Pfeil), blieb erhalten und läßt vermuten, daß es sich hierbei um ein Degradationsprodukt von AP-2δ handelt. Desweiteren ist keine Kreuzreaktion des Antikörpers mit den anderen AP-2 Isoformen festzustellen. Darüberhinaus hatte die Affinitätsreinigung zur Folge, daß das Protein, welches mit ca. 48 kDa eine ähnliche molekulare Masse wie AP-2δ aufweist, nicht mehr detektiert wurde.

Die Spezifität des AP-2δ Antiserums wurde ebenfalls durch einen Elektromobility Shift Assay (EMSA) bestätigt, der im Institut für Molekulare Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg (Prof. Dr. Bosserhoff) durchgeführt wurde.

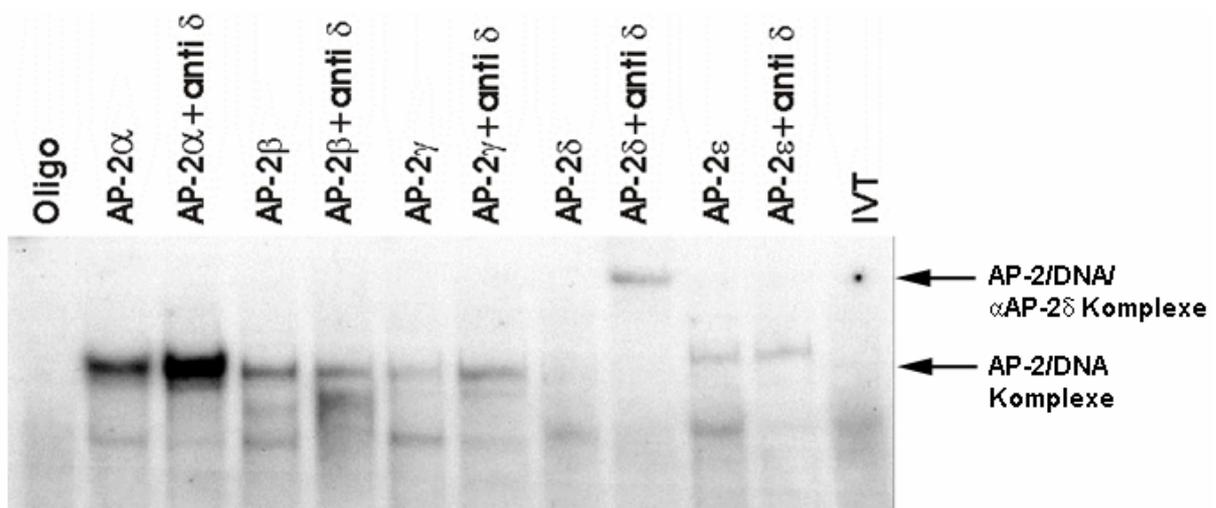


Abb.15: EMSA (electromobility shift assay) mit Protein-DNA-Komplexen aus in vitro translatierten AP-2 Proteinen, die an das radioaktiv markierte, optimierte AP-2δ Bindemotiv gebunden haben.

Dazu wurden die vollständigen cDNAs der 5 AP-2 Proteine in vitro translatiert und mit einem kurzen, doppelsträngigen ³²P-markierten synthetischen Oligonukleotid inkubiert, das die optimierte AP-2δ Bindungsstelle (5'-GCCTGAGGC-3') enthält. DNA-Protein-Komplexe laufen im Gel langsamer als freie Oligos, sodaß es zu einem „Mobilitäts-“ oder „Gel-Shift“ kommt. Die anschließende Inkubation der DNA-Protein-Komplexe mit dem AP-2δ-spezifischen Antikörper führte lediglich im Falle des AP-2δ-DNA-Komplexes zu einer weiteren Retardation des Komplexes im Gel (super-shift), was die spezifische Interaktion des AP-2δ-Antiserums mit der AP-2δ Isoform beweist.

Eine Identifikation von AP-2δ war darüberhinaus auch auf subzellulärer Ebene mithilfe von Immunfluoreszenzen möglich. Dazu wurden NIH-3T3-Zellen parallel mit einem AP-2δ Expressionsplasmid und einem EGFP-Vektor (pEGFP-N1) kotransfiziert, der eine Identifizierung transfizierter Zellen ermöglichte. EGFP-positive Zellen zeigten nach der Analyse der Immunfluoreszenz mit dem AP-2δ-spezifischen Antikörper eine nukleäre Färbung (Abb. 16).

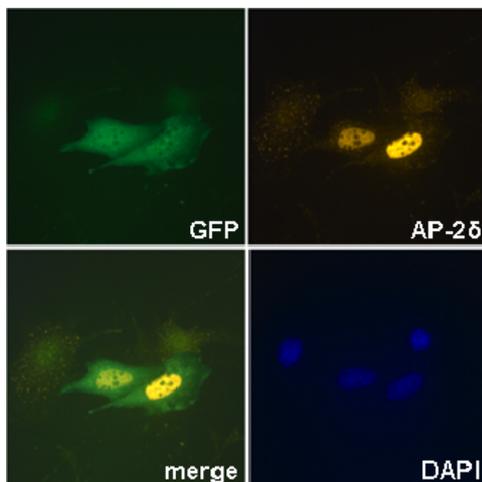


Abb. 16:

Doppel-Immunfluoreszenz an NIH-3T3-Zellen, kotransfiziert mit pEGFP-N1 (GFP) und AP-2δ

Um zu überprüfen, ob das affinitätsgereinigte Antiserum gegen AP-2δ auch in immunhistologischen Färbungen einsetzbar ist, wurde das Antiserum auch an Paraffinschnitten von Mausembryonen getestet. Eine immunhistologische Färbung an sagittalen Paraffinschnitten von Embryonen am Tag E12.5 zeigte, daß der Antikörper dasselbe Expressionsmuster für AP-2δ im Dach des Mittelhirns und im dorsalen Thalamus auf Paraffinschnitten nachweist wie eine AP-2δ-spezifische Sonde in einer whole mount in situ Hybridisierung am Tag E12.5 der Embryonalentwicklung (Abb. 17, B).

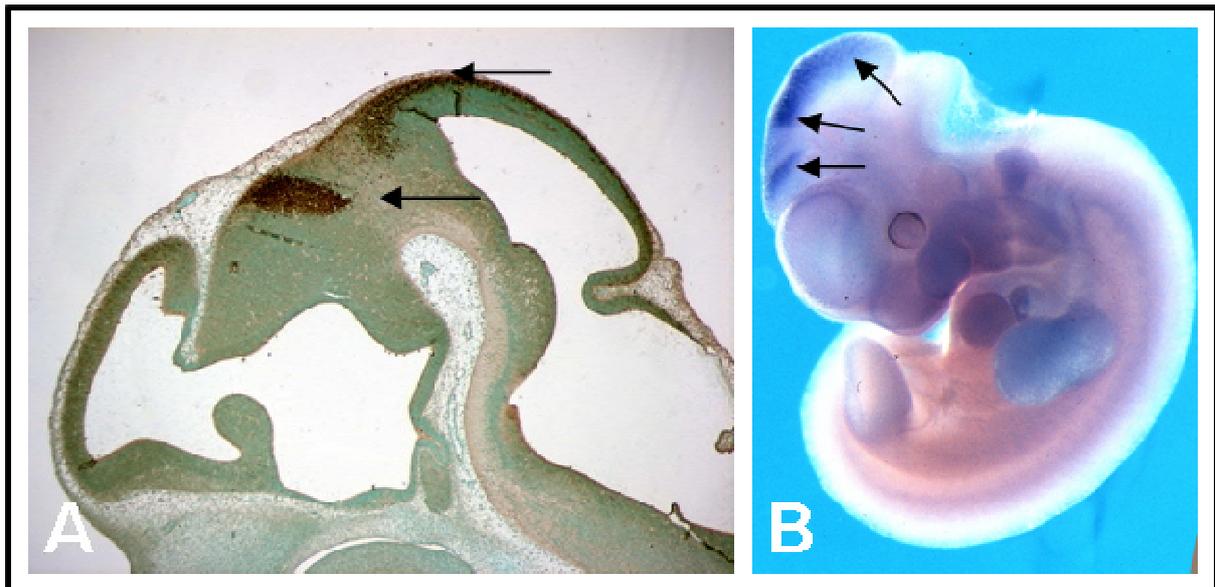


Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis von AP-2 δ durch DAB-Färbung an Paraffinschnitten (A) und Digoxigenin-whole mount in situ Hybridisierung (B) an E12.5 Embryonen

3.5 Generierung AP-2 δ -defizienter Mäuse

Zur Generierung AP-2 δ -defizienter Mäuse wurde die Strategie eines konventionellen oder konstitutiven knockout's gewählt, da aufgrund des Hirn-spezifischen und somit eingeschränkten Expressionsspektrums der AP-2 δ Isoform keine frühe embryonale Letalität AP-2 δ -defizienter Mäuse zu erwarten ist, was eine phänotypische Analyse des Mausmodells deutlich erschweren könnte.

Das gene targeting stellt eine Form einer in vivo Mutagenese dar, mit deren Hilfe Gene gezielt verändert werden können. Um die Funktion eines Gens zu zerstören, ist es zum einen möglich, das gesamte Gen oder die vollständige Protein-kodierende Sequenz zu deletieren. Ebenso können genregulatorische Bereiche wie z.B. der Promotorbereich oder der Translationsstart, sowie einzelne Exons deletiert werden. Auch die Insertion eines Stop-Codons oder die Insertion von DNA-Sequenzen in funktional wichtige Bereiche können zur Inaktivierung eines Gens führen. So wurde die Expression des murinen AP-2 δ Gens blockiert, indem eine NTR- β -Gal-polyA-neo Kasette (PD Dr. M. Moser, unveröffentlicht) im ersten Exon 22 bp C-terminal des Translationsstarts inseriert wurde. Diese Strategie sollte zur vollständigen Inaktivierung des AP-2 δ Gens führen, da für das murine AP-2 δ Gen keine alternative mRNA als Spleißprodukt beschrieben wurde und ebenfalls kein zusätzlicher Transkriptionsstart bekannt ist (Abb. 18). Diese Mutation wurde durch homologe Rekombination in ES-Zellen eingeführt (Thomas and Capecchi, 1986; Galli-Taliadoros, et al., 1995).

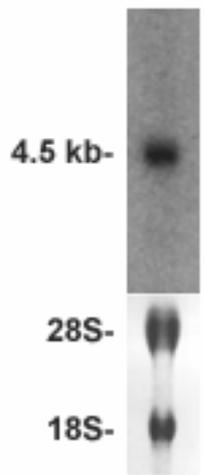


Abb. 18:

Northern-blot Analyse von RNA aus dem Gehirn 17 Tage alter Embryonen. Die Hybridisierung mit einer AP-2 δ spezifischen Sonde ergab ein einzelnes ca. 4.5 kb großes AP-2 δ -spezifisches Transkript (oben). Agarosegel mit 18- und 28S rRNA zur Kontrolle der RNA-Qualität (unten).

3.5.1 Klonierungsstrategie

Da die ES-Zellen, die zur homologen Rekombination mit dem AP-2 δ „Targeting Vector“ verwendet wurden, aus dem Mausstamm SV129 isoliert wurden, mußte die genomische DNA des „Targeting Vectors“ Teile des genomischen AP-2 δ -Lokus aus einer SV129-Bank enthalten. Zu diesem Zweck wurde eine SV129-PAC-Bank (RPC121 PAC-Bank, MRC Gene Service) mit der kompletten AP-2 δ mRNA (1788 bp, Genbank NM_153154) gescreent. Mehrere positive PAC-Klone konnten identifiziert werden und wurden zur Isolierung der PAC-DNA vermehrt. Ein 10.2 kb großes genomisches Fragment des PAC-Klons RP21-587B18 wurde nach einem Restriktionsverdau mit EcoRV in den Vektor pBSIISK subkloniert (Abb. 19, B). Der Vektor pBSIISK diente als Grundgerüst für den AP-2 δ „Targeting Vector“ und wurde bereits so präpariert, daß die Schnittstellen XhoI, XbaI und SpeI in der multiple cloning site fehlen (pBSIISK SpeI \emptyset /XbaI \emptyset /XhoI \emptyset , Abb. 19, A). Aus diesem subklonierten 10.2 kb EcoRV-Fragment konnte nach einem Restriktionsverdau mit StuI ein 7.3 kb umfassendes Fragment gewonnen werden, was ebenfalls in die EcoRV-Schnittstelle des Vektors pBSIISK SpeI \emptyset /XbaI \emptyset /XhoI \emptyset subkloniert wurde (Abb. 19, C). In die SpeI-Schnittstelle, die sich 22 bp hinter dem Translationsstart befindet, wurde mithilfe eines „XhoI in SpeI-Linkers“ eine XhoI-Schnittstelle eingefügt (Abb. 19, C). Diese neue Schnittstelle trennt nun einen Bereich von 3.0 bzw. 4.3 kb genomischer DNA voneinander, die die homologe Rekombination vermitteln. Zudem diente diese neue XhoI-Schnittstelle als Insertionspunkt für die NTR- β -Gal-polyA-neo Kassetten (Abb. 19, D), die durch einen XhoI/SalI-Restriktionsverdau aus dem Vektor pWH9 (PD Dr. M. Moser, unveröffentlicht) isoliert wurde. Die Insertion der NTR- β -Gal-polyA-neo Kassetten führte zur Unterbrechung des offenen Leserahmens des AP-2 δ Gens und sollte eine vollständige Inaktivierung des AP-2 δ Gens zur Folge haben. Die NTR-Sequenz enthält eine IRES-Sequenz, die die Initiation der Translation des nachgeschalteten LacZ Gens am Ribosom gewährleistet. Die Expression des LacZ Gens wird nach der Insertion der NTR- β -Gal-polyA-neo Kassetten durch den endogenen AP-2 δ Promotor kontrolliert. Die Aktivität des AP-2 δ Promotors führt zu Expression der LacZ-kodierten β -Galaktosidase, die nach der Umsetzung des X-Gals das umgebende Gewebe blau anfärbt. Somit weist das LacZ Gen als Reporter die Aktivität des AP-2 δ Promotors nach. Das Neomycin-Gen dient der Selektion von ES-Zellen, die den „Targeting Vector“ aufgenommen und in ihr Genom integriert haben. Die korrekte

Orientierung der Selektionskassette wurde mithilfe verschiedener Restriktionsverdau (XhoI/NotI, XhoI/Sall), sowie durch Sequenzierung überprüft.

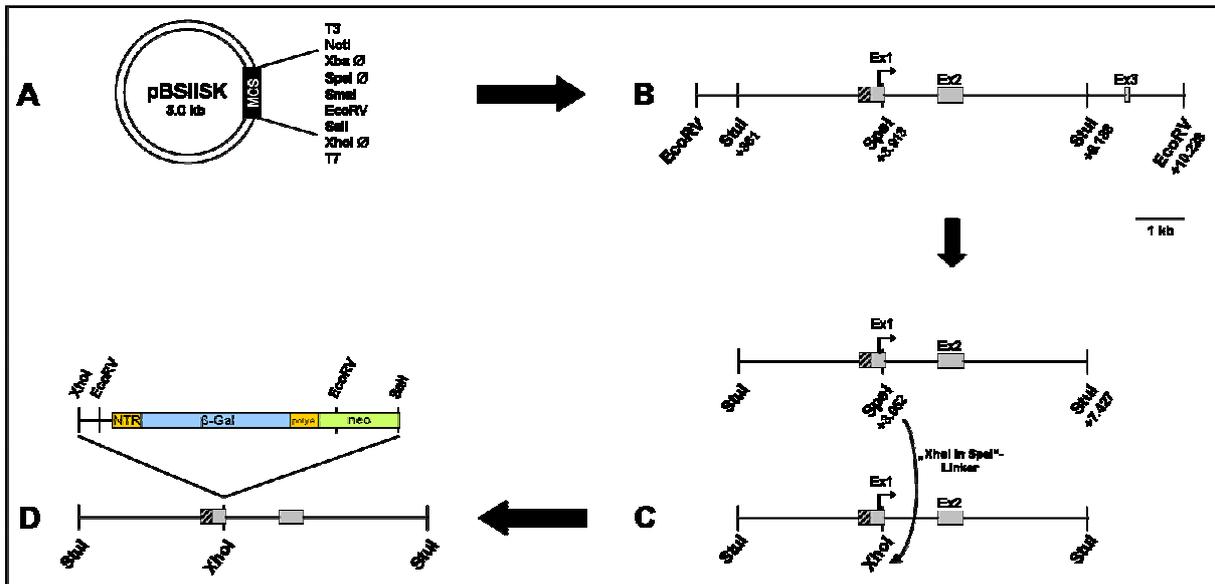


Abb. 19: Klonierungsstrategie des AP-25 „Targeting Vectors“. Der Pfeil vor der NTR-β-Gal-polyA-neo Kasse zeigt den Translationsstart an. Ex1-3 Exons 1-3, kb kilo Basenpaare, MCS multiple cloning site, neo Neomycin-Resistenzgen, NTR non-translated region.

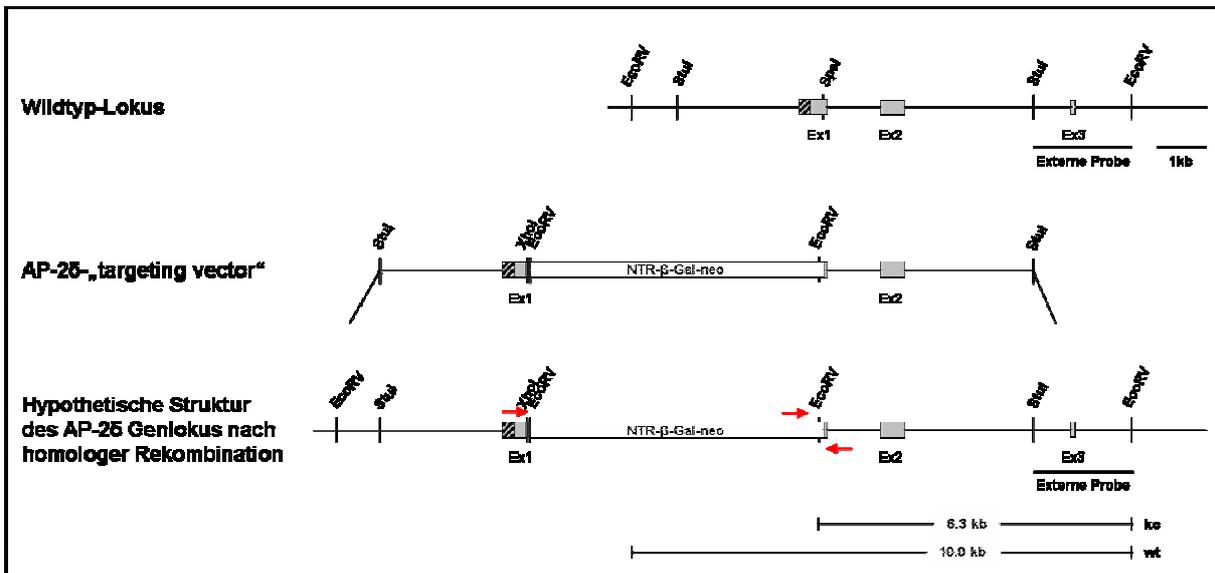


Abb. 20: Partielle Struktur des AP-25 Genlokus. Der AP-25 „Targeting Vector“ enthält die NTR-β-Gal-neo-Kasse im 1. Exon, 22 bp C-terminal des Translationsstarts. Die genomische Sonde (externe Probe) zur Identifizierung homolog rekombinierter Klone umfaßt einen Bereich von 2 kb, der das 3. Exon enthält und ist als schwarzer Balken dargestellt. Nach erfolgter homologer Rekombination und Restriktionsverdau der ES-Zell-DNA mit EcoRV detektiert die externe Probe das 10.0 kb Fragment des wildtyp-Allels (wt), sowie das rekombinante ko-Allel (6.3 kb). Die roten Pfeile markieren die Bindungsstellen der Genotypisierungsprimer.

3.5.2 Generierung der externen Probe

Um homolog rekombinierte ES-Zell-Klone zu identifizieren, wurde die ES-Zell-DNA für eine Southern Blot Analyse mit einem Restriktionsenzym geschnitten, dessen Anordnung der Restriktionsschnittstellen sich infolge der homologen Rekombination im AP-2 δ Genlokus verändert hat. Dazu wurde die ES-Zell-DNA mit dem Enzym EcoRV geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die durch die homologe Rekombination veränderten Fragmentgrößen waren durch Southern Hybridisierung mit der externen Probe nachweisbar. Zur Generierung der externen Probe wurde der bereits präparierte Vektor pBSIISK SpeI/XbaI/XhoI verwendet, in den das 10.2 kb große genomische Fragment (Abb. 19, B) des PAC-Klons RP21-587B18 nach einem Restriktionsverdau mit EcoRV subkloniert worden war. Dieser Vektor wurde mit SmaI und StuI geschnitten und religiert. Das enthaltene 2 kb große genomische StuI/EcoRV-Fragment wurde durch einen SmaI/EcoRV-Doppelverdau aus dem Vektor isoliert und diente als externe Probe. Um auszuschließen, daß das als externe Probe verwendete genomische Fragment repetitive Sequenzen enthält, wurde die Probe in einem Southern Blot mit EcoRV-geschnittener SV129-DNA getestet (Abb. 21, A).

3.5.3 Homologe Rekombination des „Targeting Vectors“ in embryonale Stammzellen

Der „Targeting Vector“ wurde durch einen Restriktionsverdau mit NotI linearisiert und wie beschrieben in ES-Zellen der Linie R1, die aus Sv129-Blastozysten isoliert wurden, elektroporiert und anschließend für 7 Tage mit Neomycin auf die Integration des „Targeting Constructs“ selektioniert. 360 Neomycin-resistente ES-Zell-Klone wurden nach einwöchiger Selektion gepickt und vereinzelt. Nach einer mehrtägigen Kultivierung wurden die Zellen nach einer Trypsinierung zum Teil weggefroren. Nach einer weiteren Kultivierung wurde der verbleibende Rest der ES-Zell-Klone zur Präparation genomischer DNA verwendet. Die genomische DNA wurde nach einem Restriktionsverdau mit EcoRV gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Kapillarblotting auf eine Nylonmembran transferiert. Nach der Southern Hybridisierung der genomischen DNA mit der externen Probe wiesen 18 der 360 ES-Zell-Klone das rekombinante Allel von 6.3 kb neben dem Wildtyp-Allel auf, was einer Effizienz der homologen Rekombination von 5% entspricht.

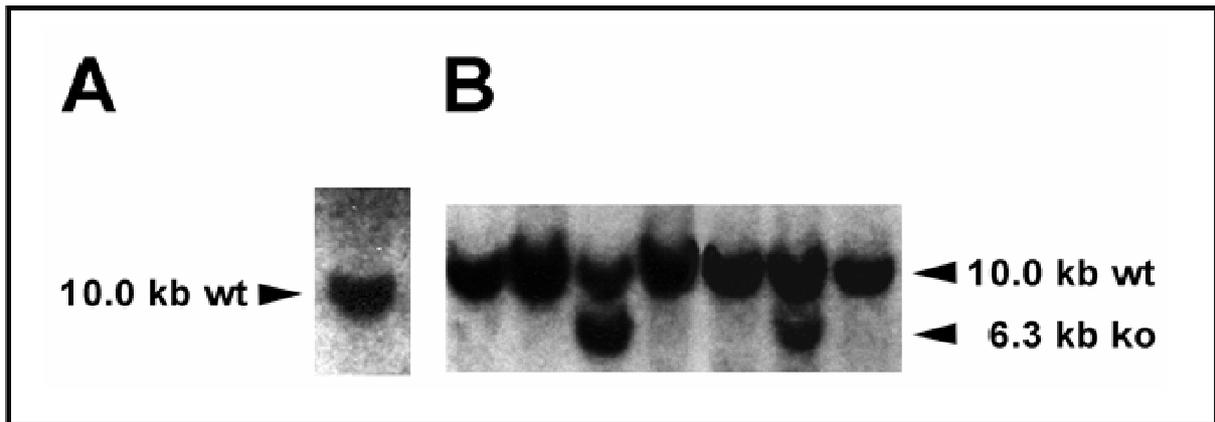


Abb. 21: (A) Test der externen Probe im Southern Blot mit SV129 genomischer DNA nach EcoRV-Verdau; (B) Southern Blot Neomycin-resistenter ES-Zell-Klone nach EcoRV-Verdau und Hybridisierung mit der externen Probe. 10 kb markieren das wildtyp (wt)-Allel und 6.3 kb markieren das rekombinante (ko)-Allel

3.5.4 Injektion und Transfer der homolog rekombinierten ES-Zellen in Blastozysten

Drei der 18 homolog rekombinierten Stammzellklone wurden in Kultur genommen und in das Blastozoen von C57Bl/6-Blastozysten injiziert. Die chimären Blastozysten wurden einige Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend in den Uterus scheinträchtiger CD-1 Weibchen implantiert. Nach zweieinhalb Wochen wurden die chimären Mäusen geboren, deren Grad an Chimarismus von nahezu vollständig agouti bis schwarz variierte. Im geschlechtsreifen Alter von 8 Wochen wurden je zwei hoch-chimäre Männchen pro Klon mit jeweils zwei C57BL/6-Weibchen verpaart. Nur die chimären Männchen des Klons #249 konnten das rekombinante Allel über die Keimbahn weitergeben und erzeugten braune Nachkommen (F1 Generation). Braune Nachkommen wurden mittels Southern Hybridisierung und PCR genotypisiert. Dazu waren zuvor geeignete Primer auf ES-Zell-DNA von rekombinierten und wildtyp- und ES-Zell-Klonen etabliert worden. Zwei Primer flankieren in sense- und antisense-Orientierung die Insertionsstelle der NTR- β -Gal-polyA-neo Kasette. Ist keine homologe Rekombination erfolgt, so wird lediglich das wildtyp-Allel von 290 bp amplifiziert. Zusätzlich zu diesem Primerpaar wird ein dritter Primer eingesetzt, der ebenfalls in sense-Orientierung im polyA Signal des Neomycin-Resistenzgens bindet. Nach erfolgter homologer Rekombination und ortsspezifischer Integration der NTR- β -Gal-polyA-neo Kasette wird neben dem PCR-Produkt des wildtyp-Allels ebenfalls das PCR-Produkt des rekombinanten Allels (500 bp) gebildet (Abb. 20, 22).

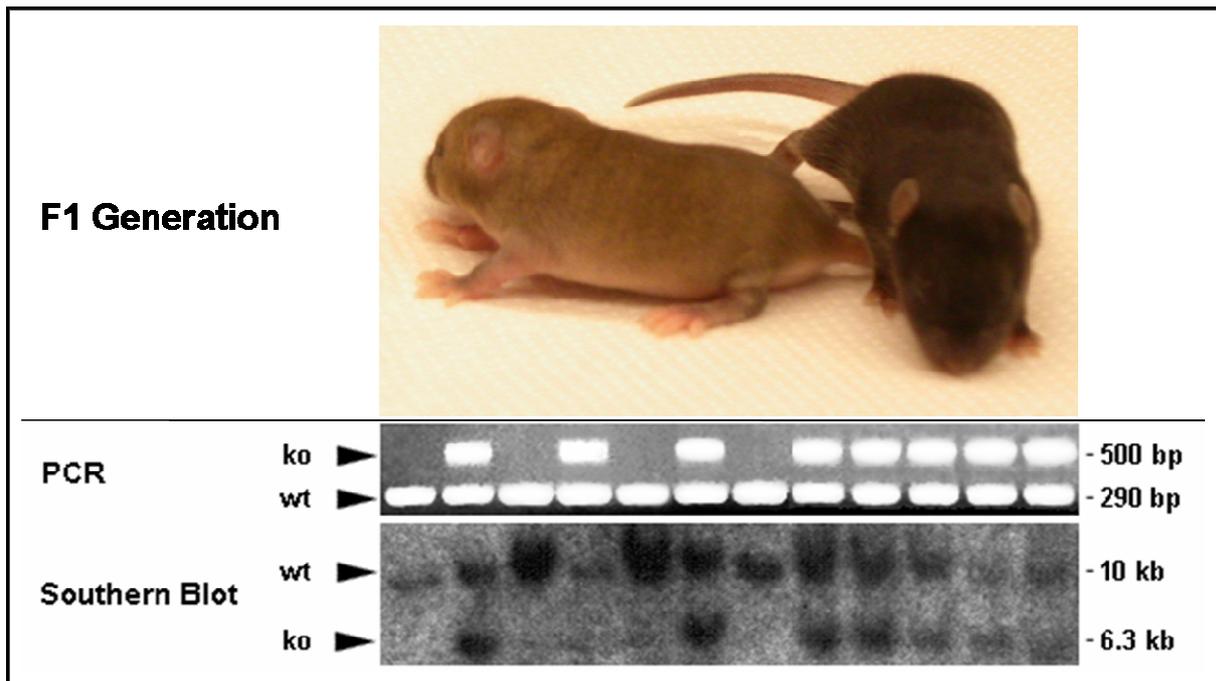


Abb. 22: Nachkommen aus der Verpaarung chimärer Männchen mit C57Bl/6-Weibchen (F1-Generation) ergaben neben schwarzen Tieren auch agouti-farbige Nachkommen. Genotypisierung von agouti-farbigen Nachkommen zum einen durch PCR mit speziellen Genotypisierungsprimern (Lokalisation der Primer: Abb. 20) als auch durch Southern Hybridisierung mit der externen Probe.

3.5.5 Generierung homozygot defizienter AP-2 δ Mäuse

Heterozygote Mäuse der F1-Generation, die im Southern Blot und in der Genotypisierungs-PCR neben dem wildtyp-Allel auch über das rekombinante Allel verfügen, wurden im geschlechtsreifen Alter miteinander verpaart. Die Nachkommen dieser Inzuchtverpaarung (F2-Generation) wurden ebenfalls mittels Southern Blot wie auch durch PCR genotypisiert.

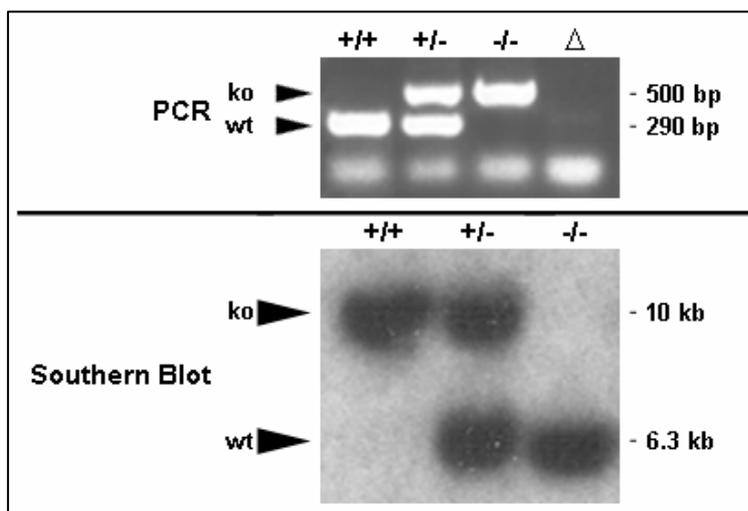


Abb. 23:

Genotypisierung der F2-Generation aus Verpaarungen heterozygoter Individuen der F1-Generation durch genomische PCR (oben) und Southern Hybridisierung mit der externen Probe (unten).

3.6 Analyse AP-2δ-defizienter Mäuse

3.6.1 Nachweis der Defizienz des AP-2δ Gens

Die vollständige Deletion des AP-2δ Gens wurde zum einen durch eine RT-PCR Analyse mit RNA überprüft, die aus dem Gewebe des posterioren Mittelhirnbereichs 17 Tage alter Embryonen (E17) extrahiert wurde. Nach der reversen Transkription der gewonnenen RNA in cDNA wurde ein 505 bp umfassendes Fragment mit AP-2δ-spezifischen Primern amplifiziert. Die fehlende Bande zeigt, daß in den Mittelhirnen AP-2δ-defizienter Embryonen kein AP-2δ-spezifisches Transkript gebildet wird (Abb. 24).

Weiterhin wurde die Deletion des AP-2δ Gens mithilfe einer LacZ-Färbung an Gehirnen neugeborener Mäuse nachgewiesen. Dazu wurden die Gehirne nach einer kurzen Fixierung mehrere Stunden mit X-Gal-Lösung gefärbt. Durch die Expression der β-Galaktosidase als dem Genprodukt des LacZ Reportergens wird das Substrat umgesetzt und die Aktivität des endogenen AP-2δ Promotors ist anhand der blauen Färbung zu beobachten. So kann die Aktivität des AP-2δ Promotors in heterozygoten Tieren, die neben dem funktionalen AP-2δ Gen lediglich eine Kopie des LacZ Gens in der NTR-β-Gal-polyA-neo Kasette besitzen, im posterioren Mittelhirn angrenzend an das Cerebellum beobachtet werden. Zudem ist eine schwache β-Galaktosidase Färbung im Zwischenhirn zu detektieren (Abb. 20; Pfeilspitzen). Demgegenüber ist die Aktivität des AP-2δ Promotors in den Mittelhirnen AP-2δ-defizienter Tiere, die das LacZ Gen auf beiden Chromosomen im AP-2δ Genlokus integriert haben, jedoch nicht mehr lokal begrenzt. Statt dessen ist eine diffuse Verteilung der blauen LacZ Färbung über den gesamten Bereich des Mittelhirns zu beobachten.

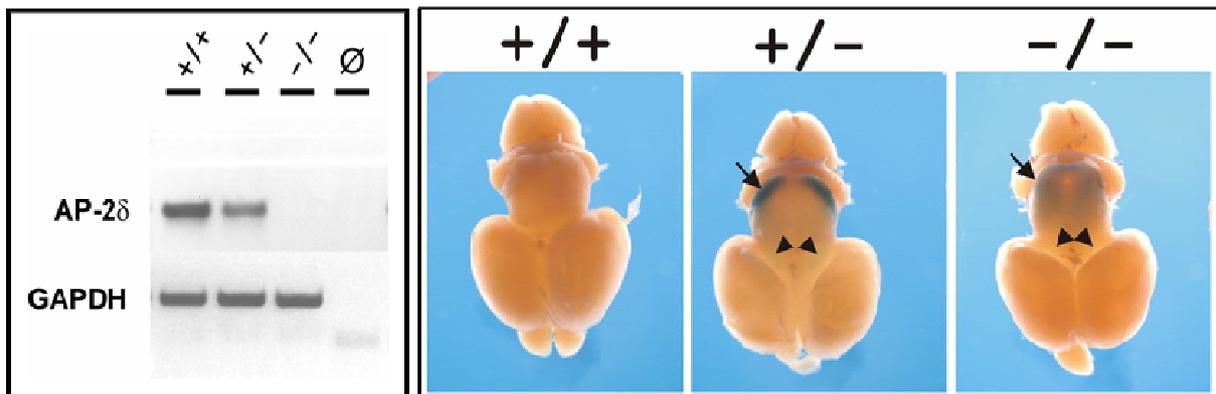


Abb. 24: Nachweis der Deletion des AP-2δ Gens durch RT-PCR mit AP-2δ-spezifischen Primern auf cDNA der posterioren Mittelhirne 17 Tage alter Mäuse (links) und X-Gal-Färbung an Gehirnen Neugeborener (rechts). Die Pfeilspitzen markieren eine schwache Expression im Zwischenhirn.

3.6.2 AP-2 δ -defiziente Mäuse vollenden die Embryogenese

Die Nachkommen der F2-Generation aus der Verpaarung heterozygoter Tiere der F1-Generation sind alle lebensfähig. Die Analyse der Genotypen mehrerer Würfe mit insgesamt 354 Tieren zeigte, daß die Verteilung der Genotypen mit 25.1% wildtyp-Tieren, 50.6% heterozygoten Tieren und 24.3% homozygoten Mutanten dem Verhältnis 1 (wildtyp-Tiere) : 2 (heterozygote Tiere) : 1 (homozygote Mutanten) entspricht und deutet daraufhin, daß alle Mutanten die Embryonalentwicklung vollenden (Tab. 1). Somit zeigen AP-2 δ -defiziente Mäuse im Gegensatz zu den bisher etablierten AP-2 Mausmutanten AP-2 α , AP-2 β und AP-2 γ keinen letalen Phänotyp.

Genotypen	Anzahl genotypisierter AP-2 δ -Mäuse (N=354)	Prozentuales Verhältnis
+/+	89	25.1%
+/-	179	50.6%
-/-	86	24.3%

Tab. 1: Verteilung der Genotypen innerhalb von Würfen aus der Verpaarung heterozygoter Tiere der F1-Generation. Die Genotypen wurden nach dem Absetzen der Mäuse im Alter von 3-4 Wochen ermittelt.

3.6.3 Gewichts- und Wachstumsanalysen AP-2 δ -defizienter Mäuse

Kurz nach der Geburt der ersten AP-2 δ -defizienten Tiere fiel auf, daß die AP-2 δ Mutanten gegenüber den wildtyp-Tieren kleiner und auch im Gewicht reduziert waren. Um diesen ersten Eindruck durch eine statistische Analyse zu untermauern und, um zu klären, ob der Verlust von AP-2 δ die postnatale Entwicklung AP-2 δ -defizienter Mäuse beeinflußt, wurde das Gewicht von Nachkommen aus heterozygoten Verpaarungen bis zum Alter von 4-5 Wochen untersucht. In den ersten zwei Wochen nach der Geburt wurde das Gewicht jeden zweiten Tag, später nur noch einmal in der Woche bestimmt. Die Auswertung der Statistik ergab, daß die AP-2 δ -defizienten Mäuse besonders in den ersten drei Lebenswochen gegenüber ihren heterozygoten und wildtyp-Geschwistern stark im Gewicht reduziert waren.

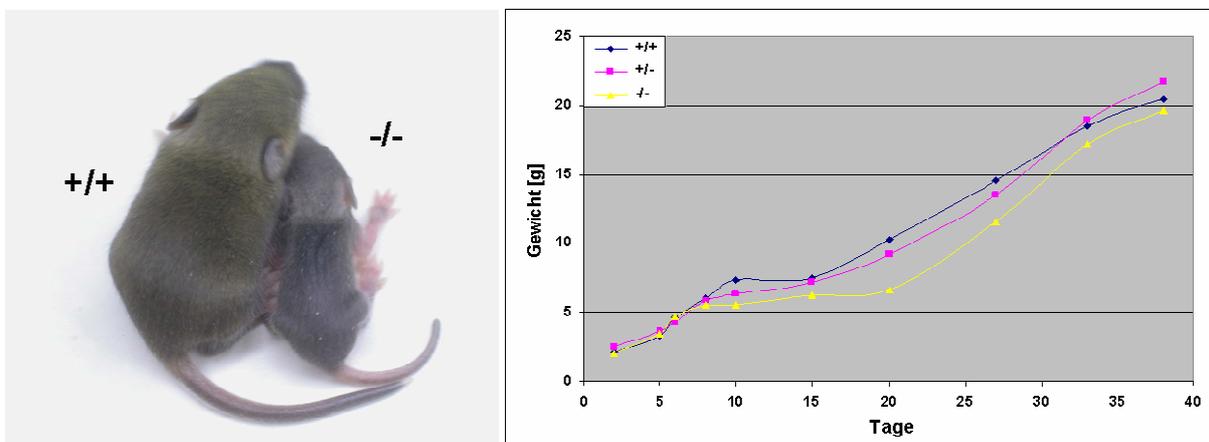


Abb. 25: Zwei Wochen alte AP-2 δ Mäuse (links), Genotypen-abhängige Gewichtsanalyse (rechts)

Da die AP-2 δ -defizienten neugeborenen Tiere ebenso wie ihre Geschwister von den Muttertieren angenommen und gesäugt wurden, schien die Brutpflege durch die Muttertiere nicht ursächlich für die Gewichtsreduktion zu sein. Da die AP-2 δ Neugeborenen auch im Wachstum retardiert waren, wurde zunächst die Proliferation der Extremitätenknochen wie Tibia und Femur untersucht. Dazu wurde neugeborenen sowie 5 Tage alten Mäusen zwei Stunden vor dem Experiment BrdU intraperitoneal injiziert. Anschließend wurden die Hinterläufe der Mäuse extrahiert und für Paraffinschnitte vorbereitet. Sagittale Paraffinschnitte der Hinterläufe wurden zunächst für eine BrdU-Färbung genutzt und anschließend mit Hämalaun-Eosin gefärbt.

Die distalen Enden der Röhrenknochen (Epiphysen), zu denen auch die Extremitätenknochen gehören, bestehen aus 4 Zonen von Knorpelzellen (Chondrozyten) (Abb. 26). Die flachen, säulenförmig angeordneten Zellen der proliferativen Zone können aufgrund ihrer Morphologie von den eher runden Zellen der umgebenden Schichten der hypertrophen und der ruhenden Zone unterschieden werden. Darüberhinaus zeichnen sich die Chondrozyten der proliferativen Zone durch eine hohe mitotische Aktivität aus. Diese hohe Proliferationsrate in der Wachstumszone des Knochens trägt maßgeblich zum Längenwachstum der Knochen bei. Zellen, die sich innerhalb der proliferativen Zone während der zweistündigen BrdU-Inkorporation geteilt haben, zeigen eine braune Kernfärbung und werden als BrdU-positive Zellen mit der Gesamtzellzahl der proliferativen Zone verglichen (Abb. 26).

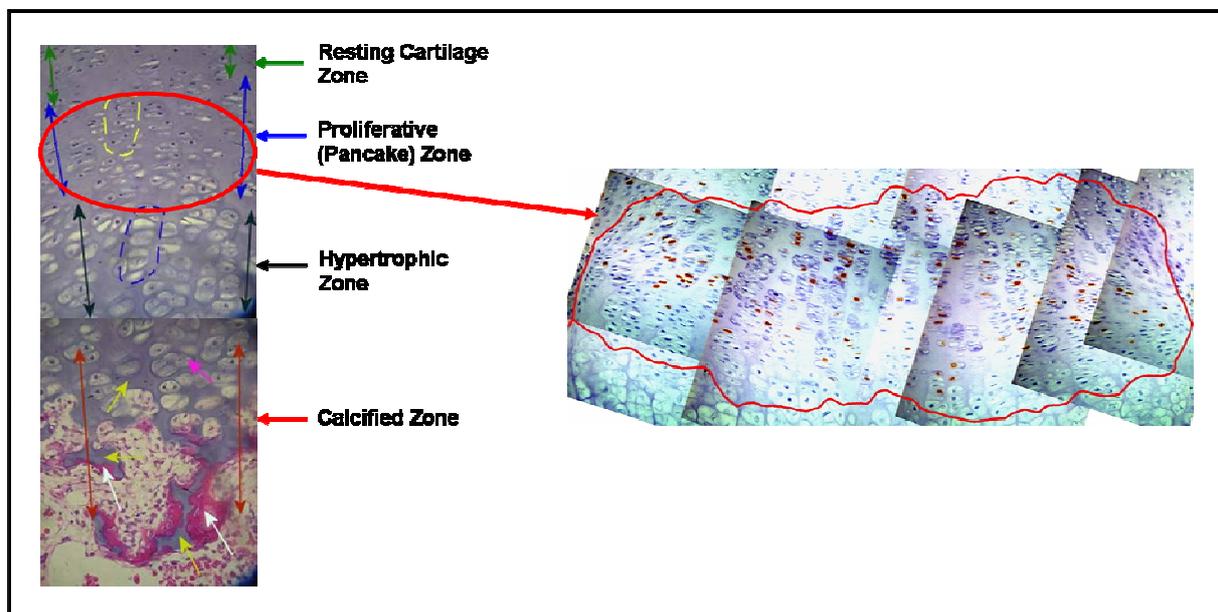


Abb. 26: Zonierung der Epiphyse des Röhrenknochens (links) und proliferative Zone mit braunen, BrdU-positiven Zellen (rechts).

Die BrdU-positiven Knorpelzellen in jeweils einer proliferativen Zone der hinteren Extremitätenknochen von jeweils 4 neugeborenen und jeweils 8 fünf Tage alten wildtyp- und AP-2 δ -defizienten Mäusen wurden gezählt und das prozentuale Verhältnis der BrdU-positiven Zellen zur Gesamtzellzahl wurde ermittelt. Im Vergleich mit den wildtyp-Mäusen konnten in den proliferativen Zonen der AP-2 δ -defizienten Mäuse signifikant weniger teilungsaktive Chondrozyten identifiziert

werden. Ebenso verfügten 5 Tage alte AP-2 δ -defiziente Mäuse über eine reduzierte Anzahl proliferierender Chondrozyten in den hinteren Extremitätenknochen (Abb. 27).

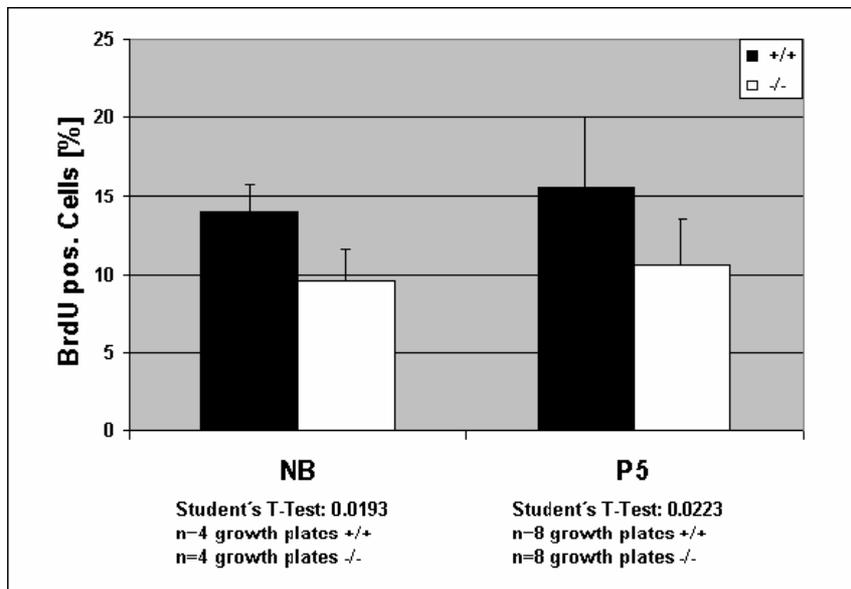


Abb. 27: Anteil BrdU-positiver Chondrozyten in der proliferativen Zone der hinteren Extremitätenknochen in neugeborenen und 5 Tage alten wildtyp- und AP-2 δ -defizienten Mäusen. Die Signifikanz wurde durch einen ungepaarten, zweiseitigen Student's T-Test mit einem Signifikanzlevel von 5% ($P > 0.05$) ermittelt.

Um zu klären, ob die verringerte Proliferation der Chondrozyten einen unmittelbar durch AP-2 δ -vermittelten Effekt darstellt, wurden die Epiphysen der hinteren Extremitätenknochen von zwei 5 Tage alten C57Bl/6 Mäusen präpariert. Die daraus gewonnene RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zur Amplifikation von AP-2 α -, AP-2 β - und AP-2 δ -spezifischen Produkten mithilfe spezifischer Primer in einer RT-PCR eingesetzt (Abb. 28). Da alle AP-2 Proteine im Gehirn exprimiert werden, diente eine aus dem Gehirn gewonnene cDNA als Positivkontrolle der Expression.

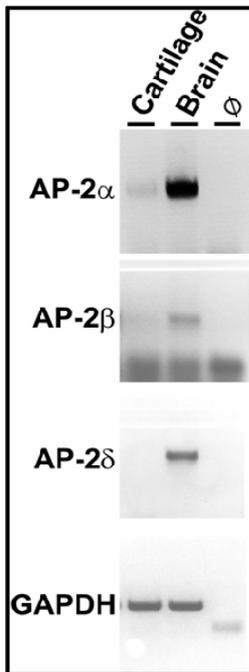


Abb. 28:

Expression der AP-2 Isoformen AP-2 α , AP-2 β und AP-2 δ in Knorpelzellen 5 Tage alter Mäuse. RT-PCR mit cDNA, die aus Knorpelzellen der Epiphysen der hinteren Extremitätenknochen und aus dem Gehirn 5 Tage alter Mäuse gewonnen wurde.

Die Analyse der RT-PCR ergab eine schwache Expression für AP-2 α und AP-2 β in den Chondrozyten, während AP-2 δ nicht in Knorpelzellen 5 Tage alter Mäuse gebildet wird. Somit scheint das beobachtete Wachstumsdefizit keine direkte Folge der AP-2 δ Deletion in Chondrozyten zu sein, sondern vielmehr ein sekundärer Effekt.

Das Wachstumshormon, welches vom Hypophysen-Vorderlappen sezerniert wird, hat entscheidenden Einfluß auf das Knochenwachstum während der Entwicklung (Ohlsson et al., 1998). Courtois und Kollegen konnten in einem HeLa-basierten Assay zeigen, daß das humane Wachstumshormon-Gen durch AP-2 α reguliert wird (Courtois et al., 1990). Um den Einfluß von AP-2 δ auf das Wachstumshormon und das Knochenwachstum zu analysieren, wurden immunhistologische Untersuchungen an Paraffinschnitten neugeborener Mäuse durchgeführt. Dazu wurde der Kopf neugeborener Mäuse präpariert und der Unterkiefer wurde entfernt. Nach einer zweitägigen Fixierung in Paraformaldehyd wurden sagittale Paraffinschnitte durch die Hypophyse angefertigt und mit einem Wachstumshormon-spezifischen Antikörper inkubiert (Abb. 40). Da keine offensichtliche Veränderung in der Expression des Wachstumshormons zwischen wildtyp- und AP-2 δ -defizienten Hypophysen detektiert werden konnte, scheinen die beobachteten Wachstumsdefekte der AP-2 δ -defizienten Mäuse nicht auf einer Fehlregulation der Expression des Wachstumshormons zu basieren.

3.6.4 Hirnspezifische Analysen AP-2 δ -defizienter Mäuse

Immunhistochemische Analysen an Paraffinschnitten mit AP-2 α - und AP-2 δ -spezifischen Antikörpern zeigten, daß AP-2 δ hauptsächlich im posterioren Teil des Mittelhirns, dem Colliculus inferior exprimiert wird. Eine schwächere AP-2 δ -spezifische Expression ist zusätzlich im dorsalen Thalamus und im anterioren Mittelhirn, dem Colliculus superior zu beobachten, während AP-2 α dagegen stark im anterioren Colliculus superior und im Cerebellum detektiert werden kann. Morphologische

Untersuchungen an Hirnschnitten von AP-2 δ Mutanten und ein Vergleich mit Hirnschnitten von wildtyp-Tieren zeigten, daß den Hirnen AP-2 δ -defizienter Mäuse offensichtlich der Colliculus inferior fehlt. Dies wurde durch die immunhistochemischen Färbungen mit dem AP-2 α Antikörper bestätigt, dessen Färbung sich im Wildtypschnitt auf den Bereich des Colliculus superior beschränkte, sich aber im Hirnschnitt des AP-2 δ -defizienten Hirns auf den gesamten Bereich des Mittelhirns erstreckte.

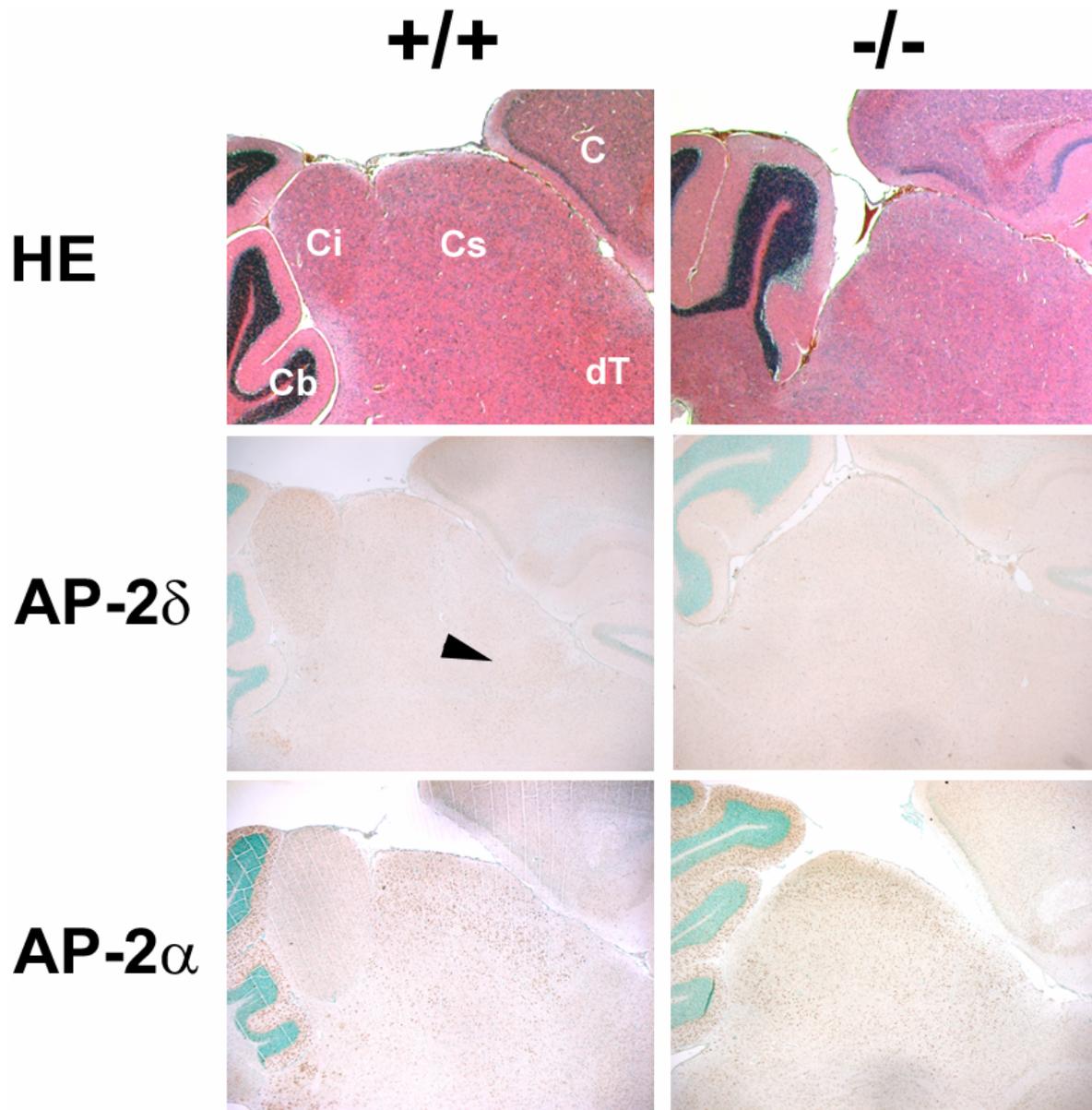


Abb. 29: Histologische Analysen des Mittelhirns durch Hämalaun-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten 1.5 Monate alter Mäuse (oben). Immunhistologische Untersuchungen an Paraffinschnitten mit AP-2 α und AP-2 δ -spezifischen Antikörpern 3 Wochen alter Mäuse (Mitten und unten). Der Pfeil markiert eine schwache AP-2 δ Expression im dorsalen Thalamus. C Cortex, Cb Cerebellum, Ci Colliculus inferior, Colliculus superior, dT dorsaler Thalamus

Aus diesen Beobachtungen ergaben sich zwingend folgende Fragestellungen:

1. Wird das posteriore Mittelhirn während der Embryogenese AP-2 δ -defizienter Mäuse angelegt?
ODER
2. Führt der Verlust von AP-2 δ im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung zur Degradation dieser Hirnregion?

3.6.4.1 Das posteriore Mittelhirn wird während der Embryogenese angelegt

Das Mittelhirn wird unter dem Einfluß eines genetischen Netzwerkes des Mittel-Hinterhirn-Organisators (MHO) während der Embryogenese angelegt. Zu diesen Markergenen zählen Transkriptionsfaktoren der Paired Box-Familie (Pax2 und Pax5) und der Engrailed-Familie (En1 und En2), sowie sekretierte Signalmoleküle wie Fgf8 und Wnt1. Zur Analyse des posterioren Mittelhirns wurden whole mount in situ Hybridisierungen an 10 Tage alten wildtyp- und AP-2 δ -defizienten Embryonen (E10) mit Digoxigenin-markierten Sonden dieser Markergene durchgeführt. Da sich in den AP-2 δ -defizienten Embryonen kein abweichendes Expressionsmuster dieser Markergene beobachten ließ, kann angenommen werden, daß kein Defekt in der frühen Anlage des Mittel-/Hinterhirn Bereichs vorliegt.

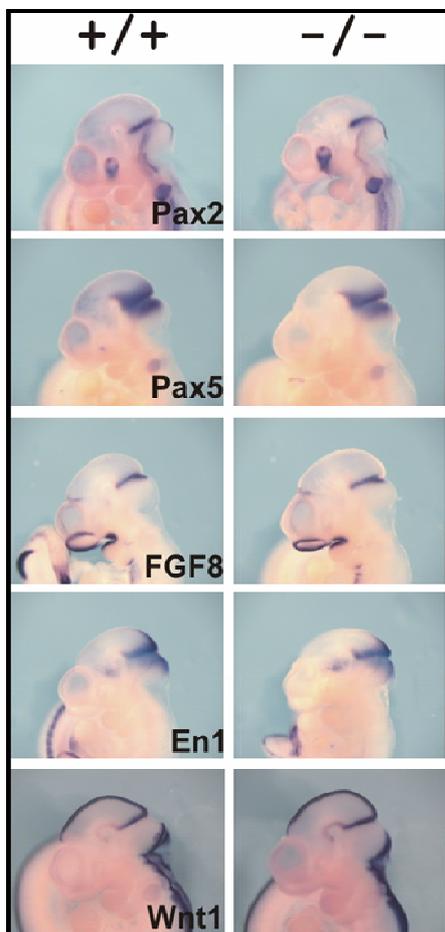


Abb. 30:

Whole mount in situ Hybridisierungen an 10 Tage alten wildtyp- und AP-2 δ -defizienten Embryonen mit spezifischen Digoxigenin-markierten Sonden von Markergenen des MHOs.

3.6.4.2 Zelltodanalysen im Gehirn AP-2 δ -defizienter Mäuse

Andere AP-2 Mausmodelle, wie die der AP-2 α , AP-2 β und AP-2 γ Deletionsmutanten, wiesen in dem Gewebe, das die jeweilige AP-2 Isoform maßgeblich exprimiert, massiv apoptotische Prozesse auf. Da angenommen wird, daß eine wesentliche Funktion von AP-2 Transkriptionsfaktoren in der Unterdrückung apoptotischer Prozesse während der Embryogenese besteht, wurde Apoptose als eine mögliche Ursache für das Fehlen des posterioren Mittelhirns an coronalen Hirnschnitten verschiedener Embryonalstadien angenommen.

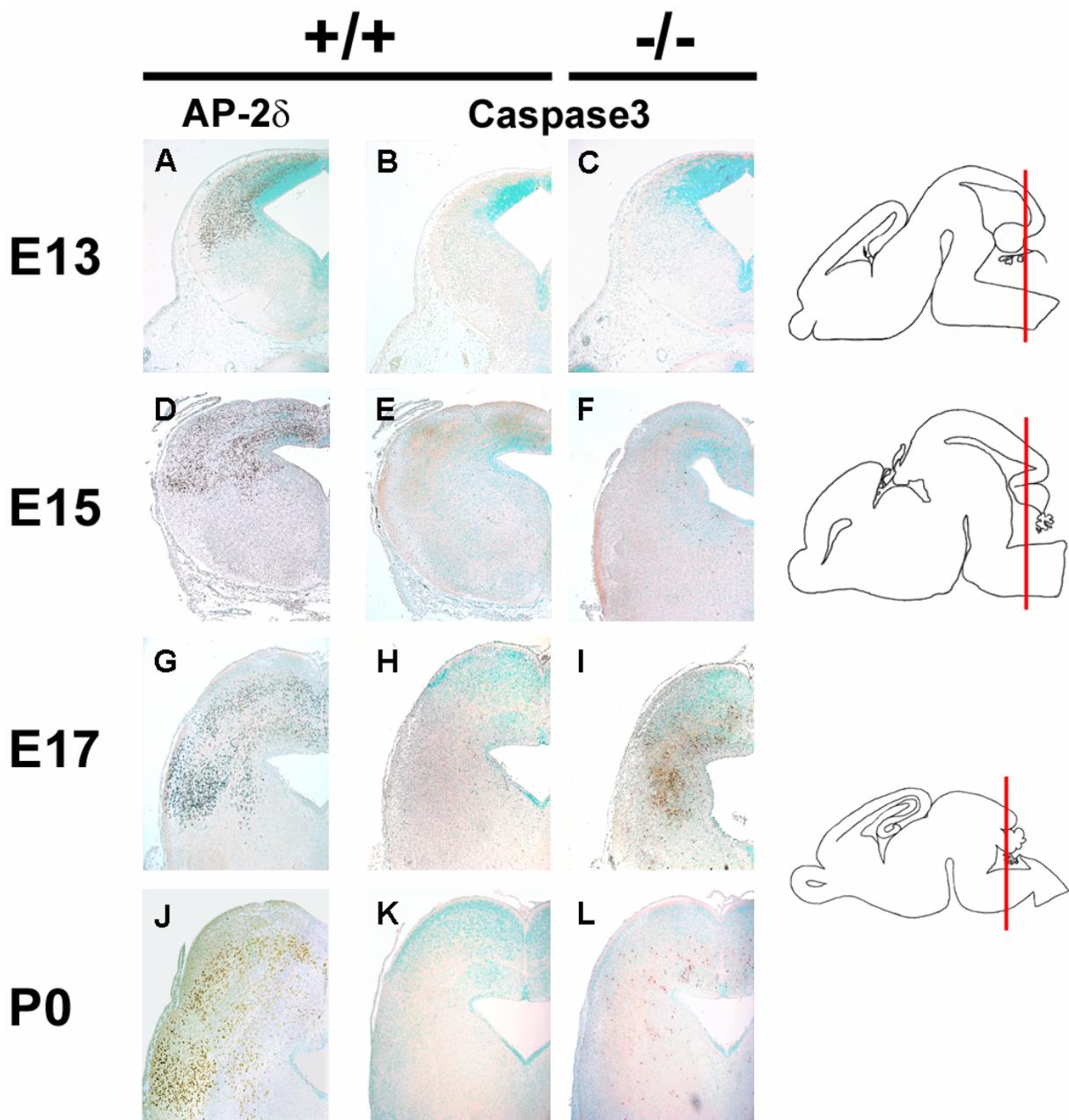


Abb. 31: Immunhistologischer Nachweis apoptotischer Prozesse durch eine Färbung mit einem Antikörper gegen die aktivierte Form der Caspase3 an coronalen Paraffinschnitten von embryonalen Hirnen verschiedener Stadien (E13 bis E17) und an den Hirnen neugeborener Mäuse (P0) (B, C, E, F, H, I, K, L). Immunhistologische Analyse der AP-2 δ Expression an coronalen Paraffinschnitten embryonaler Hirne verschiedener Stadien (E13 bis E17) und an Hirnschnitten neugeborener Mäuse (P0) (A, D, G, J). Rechts: Markierung der Schnittebene durch das Gehirn (roter Balken).

Daher wurden im Folgenden Zelltodanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryogenese an Hirnschnitten durchgeführt. Immunhistologische Analysen an Hirnschnitten AP-2 δ -defizienter Mäuse zeigten nach der Inkubation mit einem Antikörper gegen die aktivierte Form der Caspase3 bereits am Tag E15 der Embryonalentwicklung vereinzelt apoptotische Zellen (Abb. 31, F). Zwei Tage später haben sich die apoptotischen Prozesse ausgeweitet und verstärkt (Abb. 31, I), sodaß am Tag E17 ein massiver Zelltod im posterioren Mittelhirn beobachtet werden konnte. Der Vergleich der Caspase3 Immunfärbung (Abb. 31, I) mit dem AP-2 δ Expressionsmuster (Abb. 31, G) zeigte, daß die Region des apoptotischen Zelltods mit der Expression von AP-2 δ im posterioren Mittelhirn überlappt. Somit zeigt dieses Ergebnis, daß AP-2 δ offensichtlich eine essentielle Rolle für das Überleben der Zellen im posterioren Mittelhirn spielt.

Auch in den Hirnen neugeborener Mäuse konnten noch apoptotische Prozesse mithilfe der aktivierten Caspase3 und eines TUNEL Assays nachgewiesen werden (Abb. 31, 32). Dieser enzymatische Assay dient dem Nachweis fragmentierter DNA und bestätigte die Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen mit dem Caspase3-Antikörper.

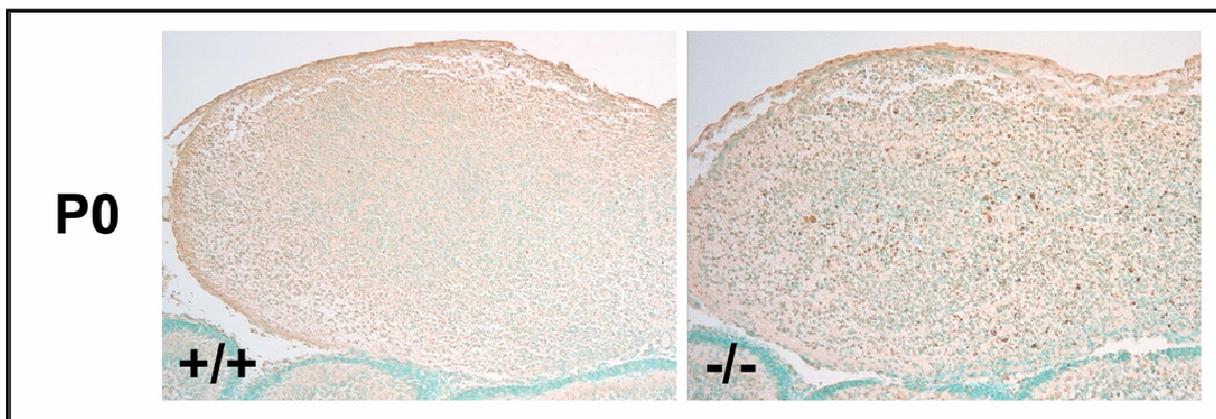


Abb. 32: TUNEL Assay an coronalen Hirnschnitten neugeborener wildtyp- und AP-2 δ -defizienter Mäuse zum Nachweis apoptotischer Zellen im posterioren Mittelhirn

An diese Ergebnisse schloß sich die Frage an, ob die im posterioren Mittelhirn am Tag E17 beobachteten apoptotischen Prozesse in demselben Entwicklungsstadium ebenfalls in anderen, AP-2 δ -exprimierenden Hirnregionen wie dem dorsalen Thalamus und dem Cortex nachgewiesen werden können. Dies könnte darauf hindeuten, daß AP-2 δ nicht nur im posterioren Mittelhirn, sondern auch in anderen Hirnbereichen eine ähnliche Überlebens-Funktion ausübt. Dazu wurden coronale Paraffinschnitte dieser Hirnregionen ebenfalls mit einem Antikörper gegen die aktivierte Caspase3 inkubiert.

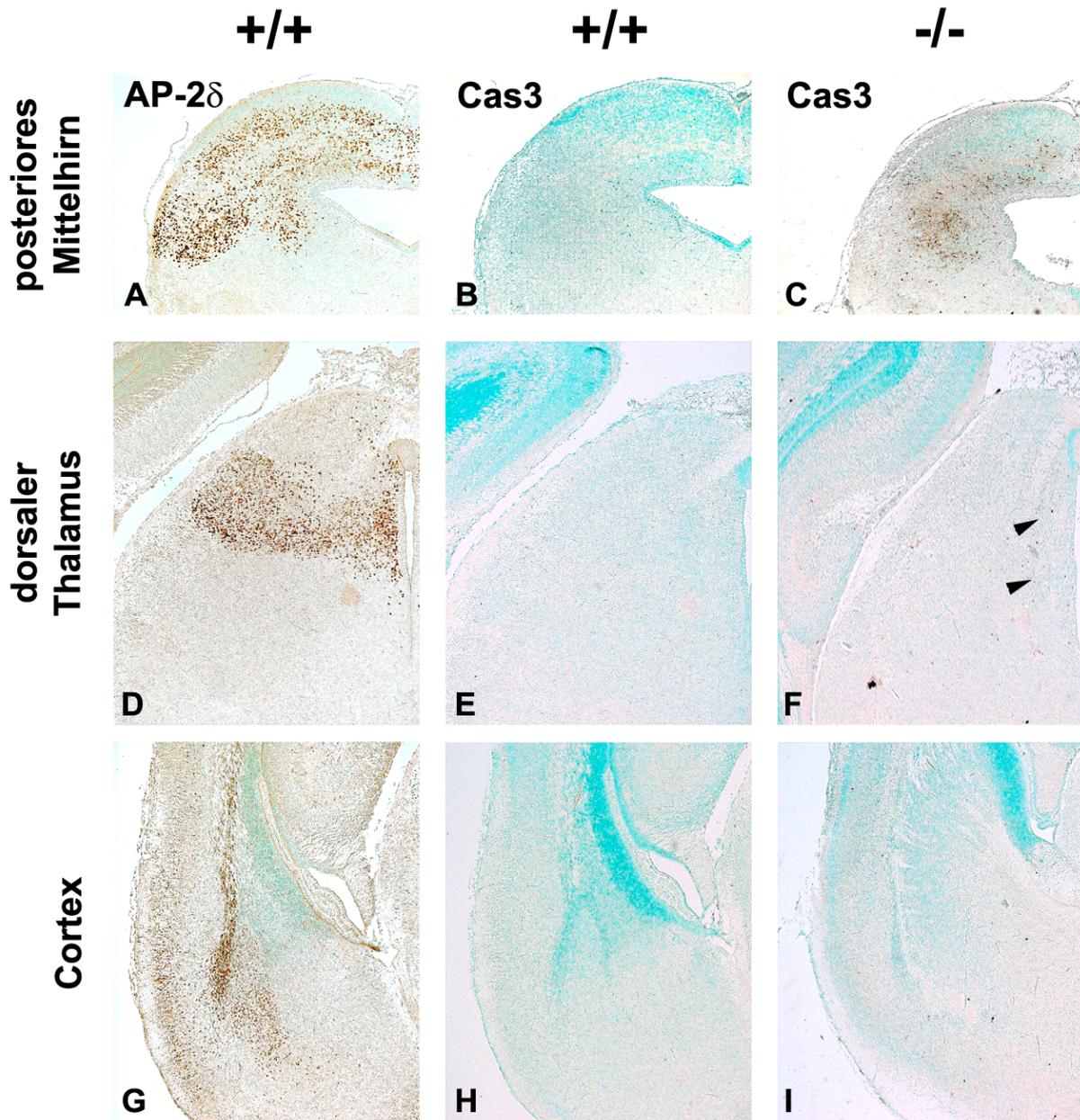


Abb. 33: Immunhistologischer Nachweis apoptotischer Prozesse in verschiedenen Hirnregionen durch eine Färbung mit einem Antikörper gegen die aktivierte Caspase3 (Cas3) an coronalen Paraffinschnitten von 17 Tage alten embryonalen Hirnen (B, C, E, F, H, I). Immunhistologische Analyse der AP-2 δ Expression in verschiedenen Hirnregionen an coronalen Paraffinschnitten 17 Tage alter embryonaler Hirne (A, D, G).

Die Inkubation mit einem Antikörper gegen die aktivierte Caspase3 zeigte, daß apoptotische Prozesse nahezu ausschließlich im posterioren Mittelhirn AP-2 δ -defizienter Mäuse nachgewiesen werden konnten (Abb. 33, C). Im dorsalen Thalamus (Epithalamus) können nur wenige positive Zellkerne identifiziert werden (Abb. 33, F; Pfeilspitzen). Im Cortex kann AP-2 δ ebenfalls detektiert werden (Abb. 33, G), jedoch sind im Cortex AP-2 δ -defizienter Mäuse keine apoptotischen, Caspase3-positiven Zellen nachweisbar (Abb. 33, I).

3.6.4.3 Expression anderer AP-2 Proteine im posterioren Mittelhirn, im dorsalen Thalamus und im Cortex

Für die weitere Analyse war es zwingend erforderlich, die Expressionsmuster anderer AP-2 Proteine zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung im dorsalen Thalamus und im Cortex zu untersuchen, um eventuelle Koexpressionen mit AP-2 δ zu identifizieren. Die daraus resultierenden Kompensationen durch andere AP-2 Isoformen könnten den ausbleibenden Zelltod in diesen Hirnregionen erklären.

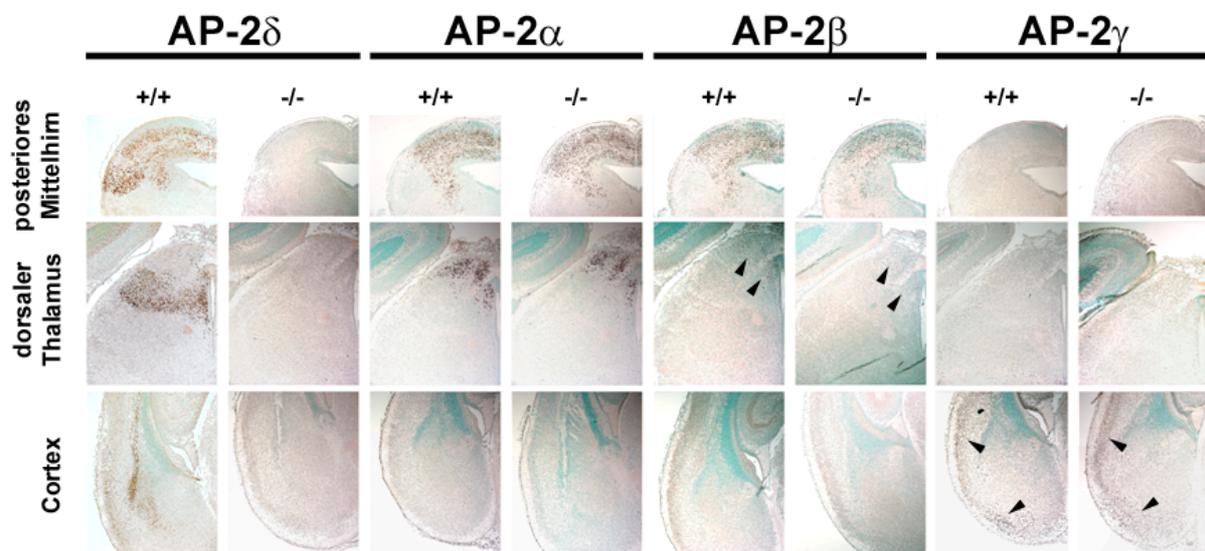


Abb. 34: Nachweis der Expression anderer AP-2 Proteine im posterioren Mittelhirn, im dorsalen Thalamus und im Cortex durch immunhistologische Analysen mithilfe von AP-2 α -, AP-2 β -, AP-2 γ - und AP-2 δ -spezifischen Antikörpern auf coronalen Paraffinschnitten 17 Tage alter Embryonen.

Posteriores Mittelhirn:

Immunhistologische Analysen mit AP-2-spezifischen Antikörpern zeigten, daß AP-2 α , AP-2 β und AP-2 δ im Mittelhirn 17 Tage alter Embryonen koexprimiert werden. Diese Färbungen zeigten jedoch auch, daß AP-2 α und AP-2 β im Gegensatz zu AP-2 δ nicht im Colliculus inferior, sondern dorsaler im Tectum exprimiert werden. Somit ist AP-2 δ die einzige AP-2 Isoform, die am Tag E17 im Colliculus inferior exprimiert wird.

Dorsaler Thalamus:

Parallel zu AP-2 δ wird ebenfalls AP-2 α am Tag E17 im Thalamus exprimiert, aber dorsaler als AP-2 δ in einem als Habenula bezeichneten Bereich des Epithalamus. Auch AP-2 β wird ähnlich wie AP-2 α in der Habenula exprimiert, wenn auch deutlich schwächer. Da im dorsalen Thalamus AP-2 δ -defizienter Hirne nur einzelne apoptotische Zellen nachgewiesen werden konnten (Abb. 33, F), scheint AP-2 δ in dieser Hirnregion nicht für das Überleben von Zellen verantwortlich zu sein.

Cortex:

Die AP-2 γ Isoform, die weder im posterioren Mittelhirn, noch im dorsalen Thalamus exprimiert wird, konnte dagegen im Cortex nachgewiesen werden. Im Cortex werden AP-2 γ und AP-2 δ koexprimiert, was eine mögliche Erklärung für ausbleibende Defekte der AP-2 δ -defizienten Mäuse im Cortex sein könnte.

3.6.5 Fertilitätsstudien an AP-2 δ -defizienten Weibchen

Bei ersten Verpaarungen geschlechtsreifer, AP-2 δ -defizienter Weibchen mit geschlechtsreifen, heterozygoten AP-2 δ - oder wildtyp-Männchen fiel auf, daß aus diesen Verpaarungen keine Nachkommen hervorgingen. Demgegenüber konnten AP-2 δ -defiziente Männchen, die mit heterozygoten Weibchen verpaart wurden, Nachwuchs erzeugen.

Diese ersten Hinweise wurden durch gezielte Verpaarungen von 8 Wochen alten wildtyp- und AP-2 δ -defizienten Weibchen mit wildtyp- oder AP-2 δ -heterozygoten Männchen untermauert. Die Verpaarungen wurden am Abend im Verhältnis 1:1 angesetzt und der Erfolg der Verpaarung wurde am Morgen des nächsten Tages anhand des Vaginalpfropfs (plug) überprüft. Die Weibchen, die am nächsten Morgen einen Vaginalpropf aufwiesen, wurden von den übrigen Weibchen getrennt gehalten. 54.4% der 57 „geplugten“ Kontroll-Weibchen waren trächtig, während keins der 16 AP-2 δ -defizienten, „geplugten“ Weibchen trächtig wurde (Tab. 2).

Genotyp	+/+	-/-
„Plugs“	57	16
Trächtigkeit	31/57 (54,4%)	0/16 (0%)

Tab. 2: Trächtigkeitsraten nach gezielter Verpaarung von wildtyp- und AP-2 δ -defizienten Weibchen.

Anschließend wurde ermittelt, ob die Akzeptanz der AP-2 δ -defizienten Weibchen gegenüber den Wildtyp-Weibchen als Sexualpartnerinnen abwich. Dazu wurde die Anzahl der verpaarten Weibchen mit der Anzahl der „Plugs“ verglichen.

Genotyp	+/+	-/-
Verpaarungen	46	36
„Plugs“	25	25
	54,3%	69,4%

Tab. 3: Vergleich der „Plug“-Raten von wildtyp- und AP-2 δ -defizienten Mäusen.

Da diese Untersuchungen sogar eine etwas höhere „Plugrate“ bei AP-2 δ -defiziente Weibchen nachwies, konnte angenommen werden, daß AP-2 δ -defiziente Weibchen von geschlechtsreifen Männchen offensichtlich als paarungsbereit erkannt wurden. Dies setzt einen Hormonzyklus voraus, der geschlechtsreifen Männchen in einer bestimmten Zyklus-Phase die Paarungsbereitschaft der

Weibchen signalisiert. Innerhalb eines 5-6 tägigen Zyklus können 4 Zyklus-Phasen, die Proestrus-, die Estrus-, die Metestrus- und die Diestrus-Phase unterschieden werden. In Abhängigkeit von der jeweiligen Zyklus-Phase verändern sich die Uterusschleimhaut, die Zusammensetzung der Follikelstadien im Ovar, sowie die Zusammensetzung des Vaginalsekrets (Champlin et al., 1973;

3.6.5.1 Analysen des Hormonzyklus AP-2o-defizienter Weibchen

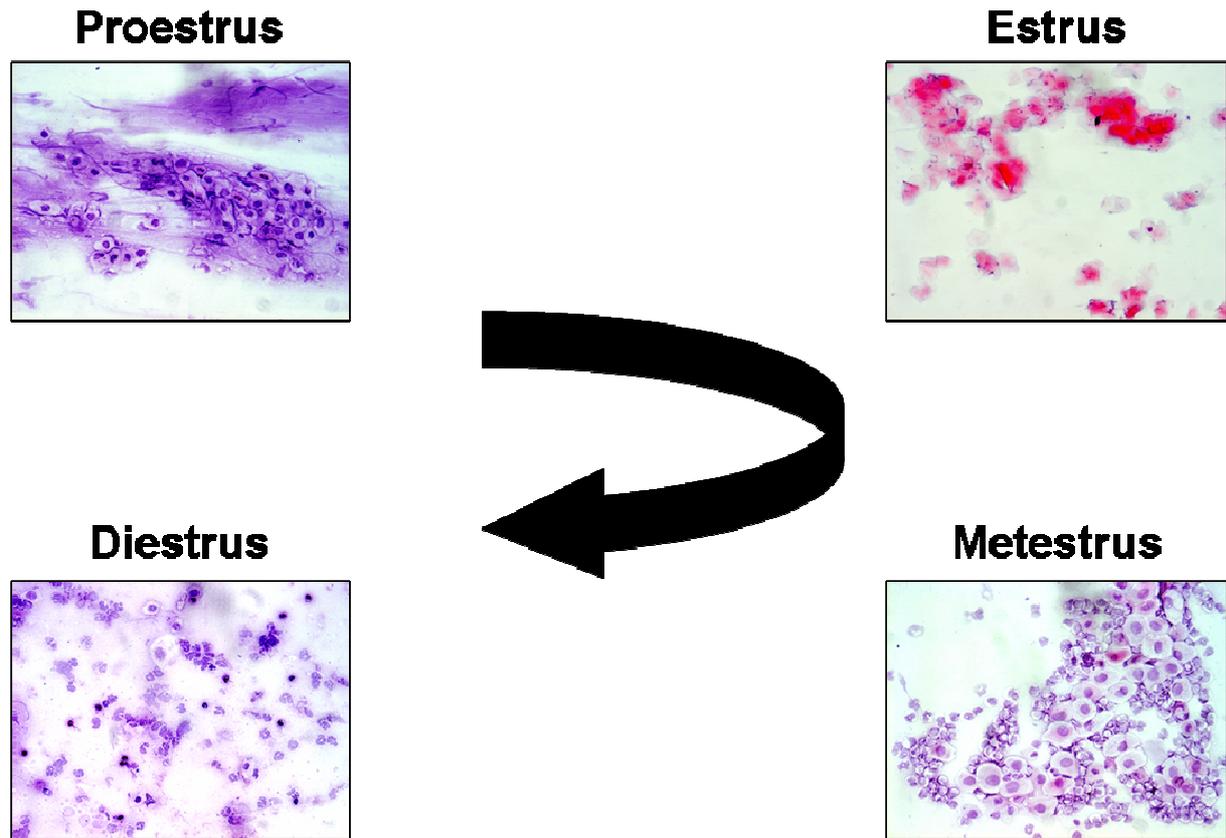


Abb. 35: Die 4 Zyklus-Phasen des weiblichen Zyklus

In der **Proestrus-Phase** sind im Abstrich runde nukleäre Epithelzellen entweder vereinzelt oder in Zellverbänden, jedoch keine Leukozyten zu finden. Diese Phase ist durch eine hohe mitotische Aktivität in den inneren Zellschichten des Epithels gekennzeichnet. Dadurch verdickt sich das Epithel, sodaß Leukozyten nicht mehr hindurch wandern können. Zellen der äußeren Epithelschicht lösen sich ab. In den Ovarien setzt ein verstärktes Follikelwachstum ein. Zudem werden Weibchen in der späten Proestrus-Phase bis zur fruhlen Estrus-Phase begattet, falls eine Verpaarung schon über einen längeren Zeitraum besteht.

Die äußere Epithelschicht der Vagina verhornt zunehmend und löst sich vermehrt ab, sodaß der Abstrich der **Estrus-Phase** verhornte, schuppenartige Zellen mit degenerierten Zellkernen aufweist. Das Ende der Estrus-Phase ist am schleimigen Sekret aufgrund der Ablösung der Zellen und am völligen Fehlen der Zellkerne erkennbar. In den Ovarien setzt der Eisprung ein.

Nachdem sich die äußeren Epithelschichten abgelöst haben und sich die mitotische Aktivität in den inneren Schichten reduziert hat, können Leukozyten wieder durch das Epithel wandern, sodaß im Abstrich der **Metestrus-Phase** neben restlichen verhornten Zellen auch Leukozyten nachgewiesen werden können. Nach dem Eisprung sekretieren die Restfollikel (Corpora lutea) für eine kurze Zeit Progesteron und in den Ovarien bilden sich kleine Primärfollikel. Die Metestrus-Phase stellt zudem den Wendepunkt im Zyklus dar: bei erfolgter Befruchtung wird die Metestrus-Phase fortgesetzt. Ist jedoch keine Befruchtung erfolgt, setzt die Diestrus-Phase ein.

Aufgrund der dünnen Epithelschicht sind vermehrt Leukozyten im Abstrich der **Diestrus-Phase** nachweisbar. Da die Proliferation im Epithel wieder einsetzt, befinden sich zusätzlich auch runde nukleäre Epithelzellen im Vaginalsekret.

Täglich wurden Abstriche des Vaginalsekrets von geschlechtsreifen wildtyp- und AP-2δ-defizienten Mäusen genommen und die Zyklus-Phase wurde anhand der Zellmorphologie nach einer Hämalaun-Eosin Färbung bestimmt.

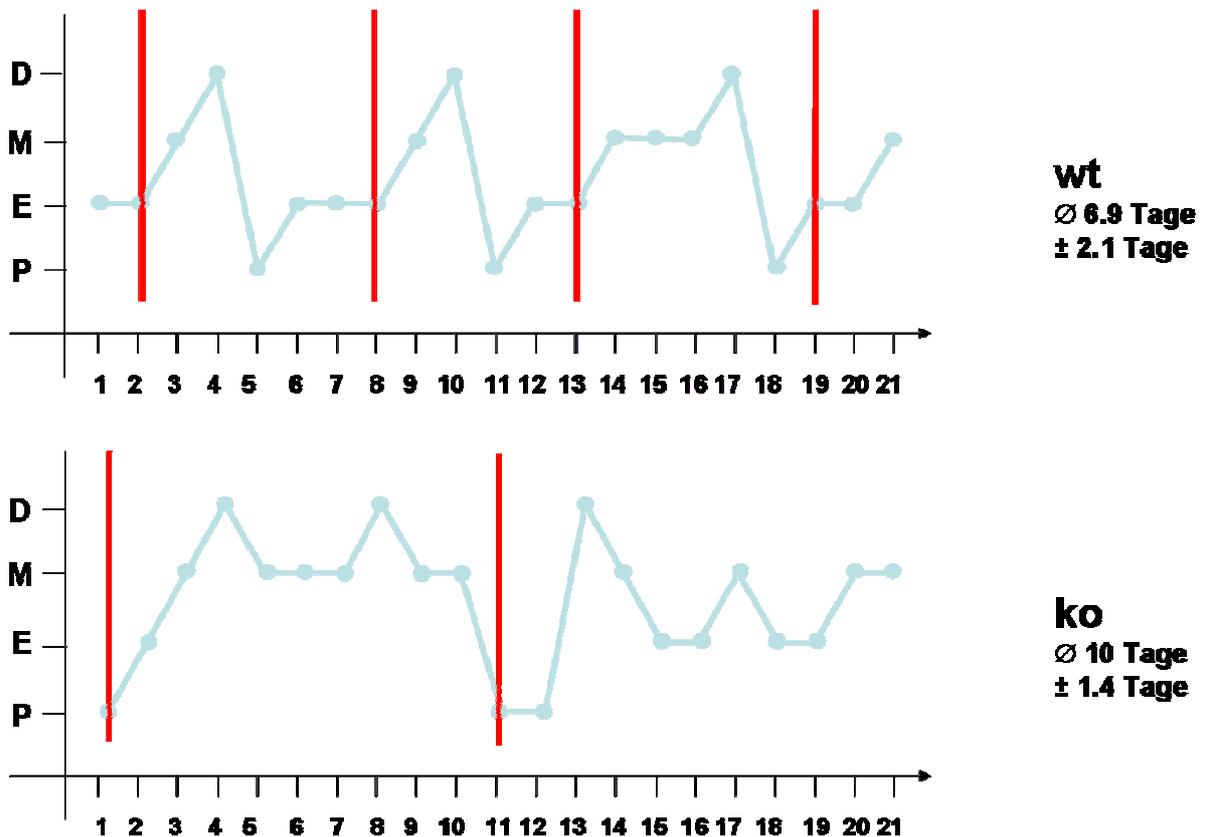


Abb. 36: Beispiele zweier Hormonzyklen von wildtyp (wt)- und AP-2δ-defizienten (ko). Die Zyklus-Phasen von jeweils 6 Kontroll- und AP-2δ-defizienten Weibchen wurden in einem Zeitrahmen von 3 Wochen täglich ermittelt. D Diestrus, M Metestrus, E Estrus, P Proestrus

Bei der Analyse der ermittelten Zyklus-Phasen AP-2δ-defizienter Mäuse fielen bei allen untersuchten Mäusen Abweichungen vom normalen Zyklus auf. Einige der untersuchten Weibchen zeigten keinen Phasenwechsel und blieben über die gesamte Untersuchungsperiode in einer Phase. Bei den meisten untersuchten Mäusen konnte eine verzögerte Progression des Zyklus und damit eine

verlängerte Zyklusdauer von durchschnittlich 10 Tagen, sowie Rückfälle in vorherige Phasen beobachtet werden (Abb. 36).

3.6.5.2 Analysen der Blastozysten und der Ovarien AP-2δ-defizienter Weibchen

Da AP-2δ-defiziente Weibchen über einen – wenn auch unregelmäßigen – Hormonzyklus verfügen, der alle Zyklusphasen, besonders die Ovulationsphase aufweist, sollten Oocyten gebildet werden, die die Eierstöcke verlassen und in den Uterus übertreten. Zudem werden die AP-2δ-defizienten Weibchen zwar gepluggt, eine Trächtigkeit konnte bisher aber nicht beobachtet werden. Aus diesen Gründen wurde zum einen untersucht, ob AP-2δ-defiziente Weibchen ovulieren und, ob diese Ovulation durch einen externen Hormonstimulus ausgelöst werden kann. Zum anderen sollte beobachtet werden, ob aus befruchteten Oocyten Blastozysten entstehen.

Dazu wurden zum einen wildtyp- und AP-2δ-defiziente Weibchen im Alter von 4 Wochen durch Stimulation mit PMSG und hCG im Abstand von 48 Stunden superovuliert und am Abend der hCG-Injektion mit fertilen Männchen im Verhältnis 1:1 verpaart. Als Kontrollen dienten Verpaarungen geschlechtsreifer wildtyp- und AP-2δ-defizienter Weibchen mit fertilen Männchen im Verhältnis 1:1. Erfolgreich „gepluggten“ Weibchen wurde nach 3.5 Tagen der Uterus entnommen und die enthaltenen Blastozysten wurden gesammelt.

	<u>flush nach der Superovulation</u>		<u>flush ohne Superovulation</u>	
	durchschnittliche Blastozystenanzahl	„trächtige“ Tiere/ Gesamttierzahl	durchschnittliche Blastozystenanzahl	„trächtige“ Tiere/ Gesamttierzahl
+/+	15,43	6/7	6,6	5/6
-/-	30,67	6/6	6,75	4/13

Tab. 3: Gezählte Blastozysten nach Spülung der Uteri (flush) von AP-2δ-defizienten und wildtyp-Mäusen ohne (flush ohne Superovulation, rechts) und mit vorangegangener hormoneller Stimulation (flush nach der Superovulation, links). Der Begriff „trächtig“ bezeichnet jene Tiere, bei denen Blastozysten im Uterus nachgewiesen werden konnten.

Die Analyse der Blastozysten zeigte, daß auch AP-2δ-defiziente Weibchen befruchtungsfähige Oocyten bilden, die nach der Befruchtung zu Blastozysten heranreifen. Zudem scheinen AP-2δ-defiziente Weibchen ähnlich wie wildtyp-Weibchen auf einen externen hormonellen Stimulus zu reagieren. Auffällig war jedoch, daß nur in 4 von 13 nicht-hormonell stimulierten Tieren Blastozysten nachgewiesen werden konnten. Da die Verpaarung in diesem Experiment nur über eine kurze Zeit bestand, erfolgte eine Begattung durch fertile Männchen spontan, daher unabhängig vom befruchtungsfähigen Zeitraum zwischen später Proestrus- und früher Estrus-Phase und unabhängig von der Ovulation. Somit scheint nur bei 4 der 13 AP-2δ-defizienten, „gepluggten“ Weibchen auch eine Ovulation erfolgt zu sein, die zur Freisetzung von Oocyten führte und eine spätere Befruchtung ermöglichte. Die Zyklus-Störungen AP-2δ-defizienter Weibchen wie ein verlängerter Zyklus oder einen längeren Verbleib in einer bestimmten Zyklus-Phase führten dazu, daß die befruchtungsfähige Phase AP-2δ-defizienter Weibchen seltener erreicht wurde und AP-2δ-defiziente Weibchen somit seltener

befruchtungsfähige Oocyten ausbildeten. Interessanterweise konnten bei allen „gepluggten“, AP-2 δ -defizienten Weibchen, die zuvor hormonell stimuliert wurden, Blastozysten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auf einen fehlregulierten Hormonspiegel hin, der eventuell durch eine zu niedrige Expression oder Sekretion regulierender Hormone verursacht wird, aber durch eine externe Hormonzufuhr wieder ausbalanciert werden kann.

Parallel zu diesen Untersuchungen wurden die Ovarien 4, 8 und 12 Wochen alter wildtyp- und AP-2 δ -defizienter Weibchen histologisch untersucht, um mögliche Defekte, die die Folliculogenese beeinträchtigen könnten, zu analysieren.

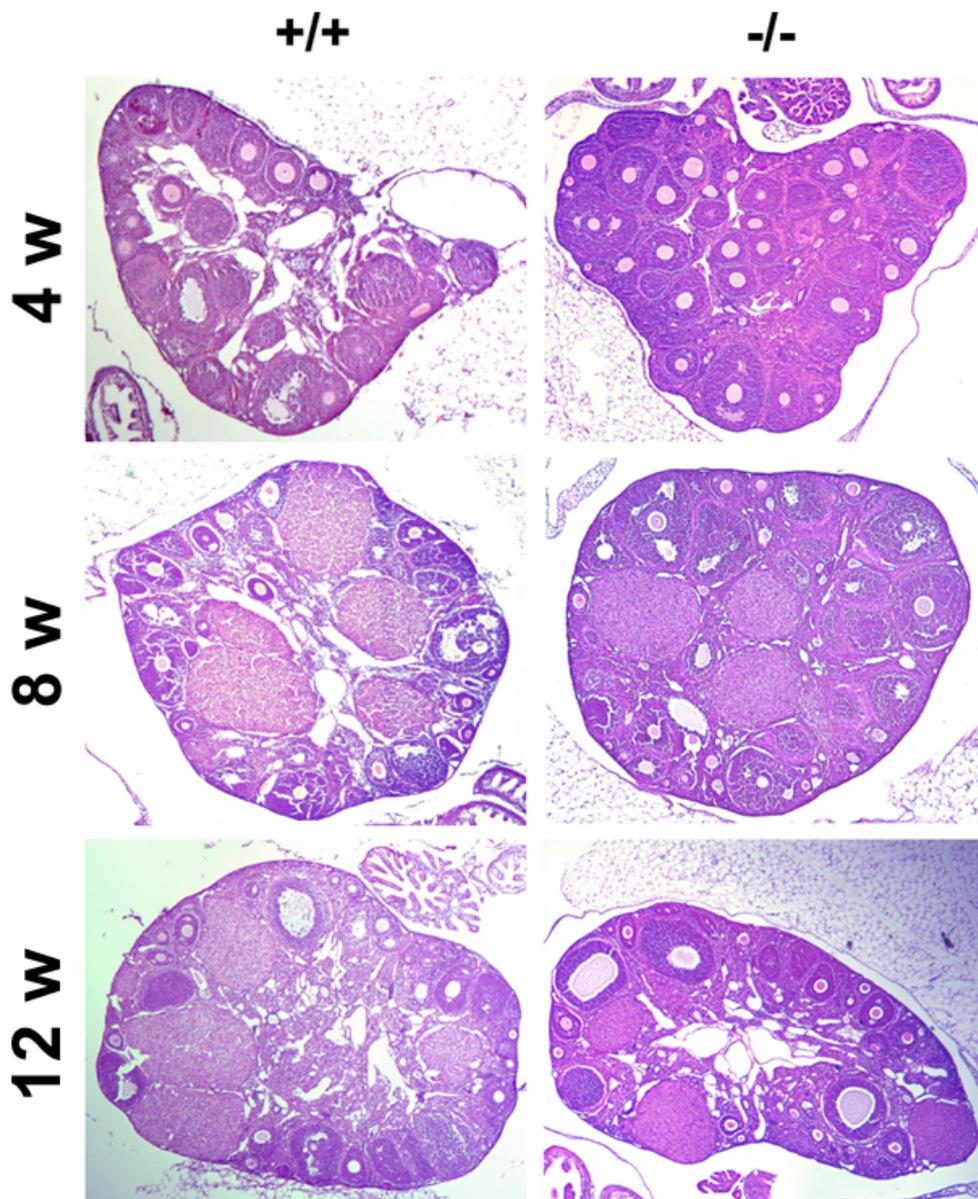


Abb. 37: Morphologie der Ovarien 4, 8 und 12 Wochen alter wildtyp- und AP-2 δ -defizienter Mäuse bei einer 5-fachen Vergrößerung.

Mithilfe der Hämalaun-Eosin Färbung konnten innerhalb der Ovarien Follikel unterschiedlicher Entwicklungsstadien identifiziert werden: primäre Follikel bestehen aus einer Oocyte, die von einer einzelnen Schicht Granulosa-Zellen umgeben sind. Wenn der Primärfollikel überlebt, entsteht der Sekundärfollikel (oder prä-antrale Follikel) mit einem mehrschichtigen Follikelepithel, bestehend aus Granulosa-Zellen. Falls auch der prä-antrale Follikel überlebt, geht daraus der Tertiärfollikel (oder antrale Follikel) hervor, der die Oocyte mit einem Flüssigkeits-gefüllten Hohlraum, dem Antrum, umgibt. In diesem Stadium ist die Oocyte innerhalb des Follikels soweit gereift, daß sie zur Ovulation den Follikel verläßt. Nur wenige der reifen antralen Follikel gelangen bis zur Ovulation. Die meisten Follikel sterben im Zuge der Follikelreifung in unterschiedlichen Stadien aufgrund von apoptotischen Prozessen, die durch Hormone reguliert werden (McGee und Hsueh, 2000). Die Rückbildung reifender Follikel in jedem Stadium der Follikelreifung wird als Follikelatresie (griech.: atresia, die nicht-Öffnung) bezeichnet. Atretische Follikel zeichnen sich durch mindestens zwei Kriterien aus: (i) mehr als zwei pyknotische Nuclei, (ii) unregelmäßige Granulosa-Zellschichten, (iii) Granulosa-Zellen befinden sich im Antrum oder (IV) Granulosa Zellen haben sich von der äußeren Basalmembran gelöst (Britt et al., 2000).

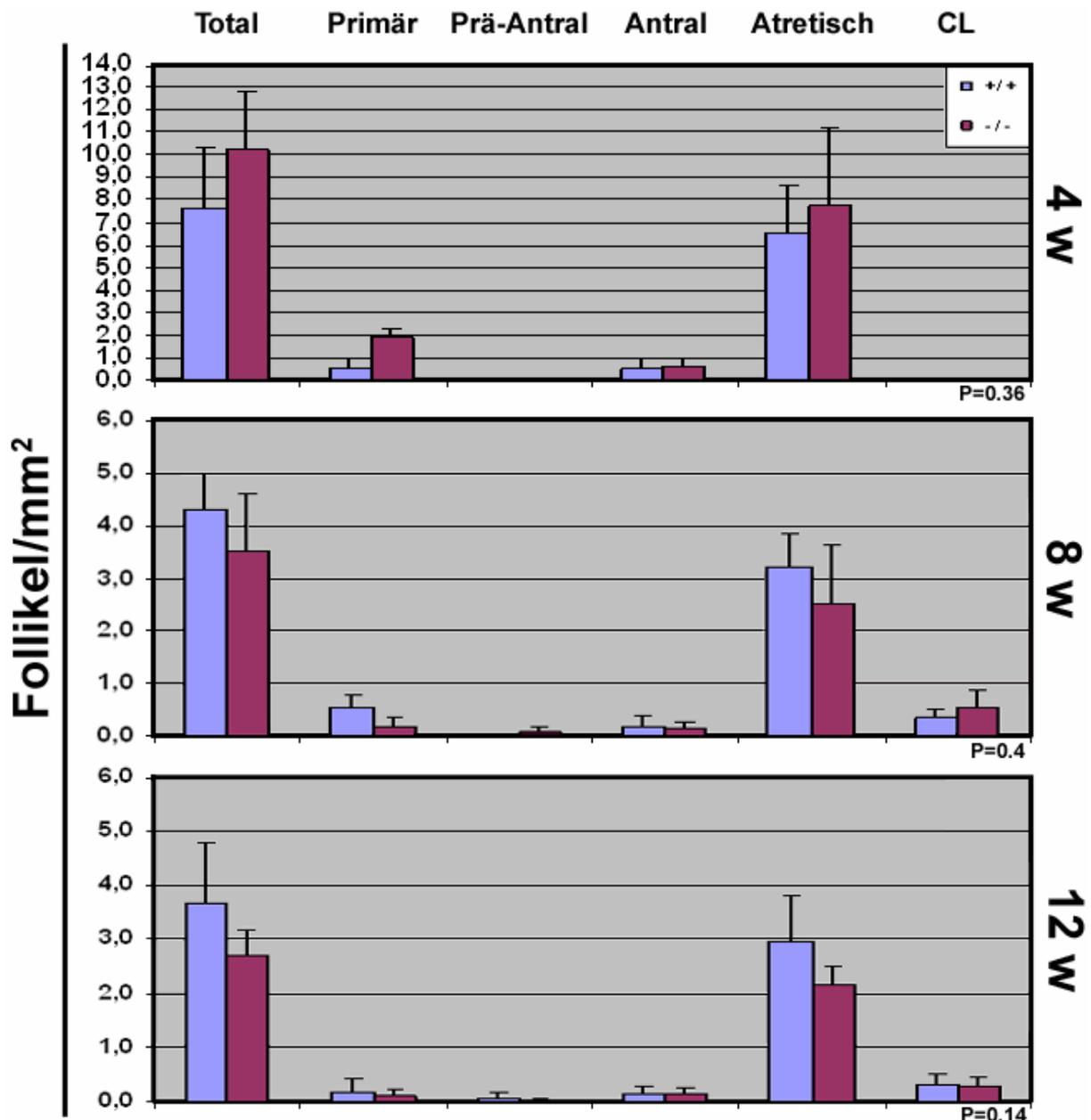


Abb. 38: Analyse der Follikel-Verteilung in den Ovarien 4, 8 und 12 Wochen alter wildtyp- und AP-2 δ -defizienter Mäuse (4 Wochen: +/+ n=3, -/- n=2; 8 Wochen: +/+ und -/- n=4; 12 Wochen: +/+ n=4, -/- n=6). Die Klassifizierung erfolgte anhand der Publikationen von Britt und Kollegen (Britt et al., 2000) und Cheng und Kollegen (Cheng et al., 2002b). Die Follikelanzahl jedes Ovars wurde auf den 3 Paraffinschnitten mit dem größten Durchmesser des jeweiligen Ovars gezählt und auf die gesamte Fläche des Ovars normalisiert (Cheng et al., 2002b). Die Follikelanzahl pro mm² wurde mithilfe einer definierten Fläche durch Photoshop 6.0 ermittelt. Die Signifikanz der Messung wurde durch einen ungepaarten, zweiseitigen Student's T-Test bei einem Signifikanzlevel von 5% berechnet. CL Corpora Lutea, w Wochen

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß die Ovarien der AP-2 δ -defizienten Weibchen keine morphologischen Unterschiede gegenüber den Ovarien gleichaltriger wildtyp-Weibchen erkennen lassen. Somit scheint die beobachtete Infertilität der AP-2 δ -defizienten Weibchen nicht auf morphologischen Defekten der Ovarien zu beruhen. Diese Vermutung wird durch den Vergleich der einzelnen Follikelstadien zwischen 4, 8 und 12 Wochen alten Mäusen gestützt, der keine Veränderung in der Verteilung der Follikelstadien im Vergleich zwischen wildtyp- und AP-2 δ -defizienten Mäusen

erbrachte. AP-2 δ -defiziente Mäuse besitzen demnach funktionsfähige Ovarien und können alle Phasen des Hormonzyklus, sowie alle Stadien der Follikelentwicklung ausbilden.

3.6.5.3 Expression von AP-2 Proteinen im Uterus und in den Ovarien

Um die Expression von AP-2 Proteinen im Ovar und im Uterus zu untersuchen, wurde die gesamte RNA aus den Ovarien und den Uteri von 4, 8 und 12 Wochen alten Mäusen präpariert, in cDNA umgeschrieben und für eine RT-PCR-basierte Expressionsanalyse eingesetzt. Dabei wurden mit AP-2 α -, AP-2 β -, AP-2 γ - und AP-2 δ -spezifischen Primern jeweils charakteristische Produkte (AP-2 α : 518 bp, AP-2 β : 258 bp, AP-2 γ : 439, AP-2 δ : 505 bp) amplifiziert.

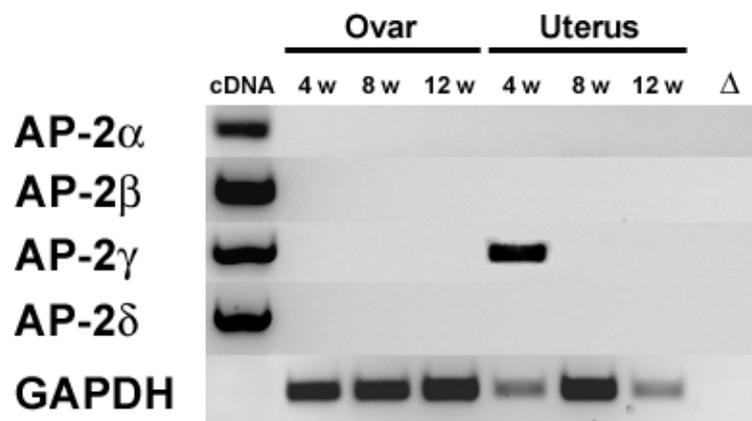


Abb. 39: Expressionsanalysen der AP-2 Isoformen AP-2 α , AP-2 β , AP-2 γ und AP-2 δ im Ovar und im Uterus mittels RT-PCR. Die dazu verwendete cDNA wurde aus RNA der Ovarien und der Uteri von 4 Wochen (n=3), 8 Wochen (n=4) und 12 Wochen (n=4) alten Mäusen synthetisiert. Als Positivkontrollen dienten 10 ng der vollständigen cDNAs der AP-2 Isoformen. Die Normalisierung jeder cDNA erfolgte durch eine RT-PCR mit GAPDH-spezifischen Primern (unten).

Die Analyse der Expression der AP-2 Proteine in den Ovarien und im Uterus ergab, daß lediglich AP-2 γ im Uterus 8 Wochen alter Mäuse exprimiert wird. Andere AP-2 Isoformen konnten dagegen nicht in den Ovarien oder den Uteri detektiert werden.

3.6.5.4 Analyse der Hormon-sezernierenden Zentren in der Hypophyse

Die beobachtete Infertilität AP-2 δ -defizienter Weibchen scheint nicht auf morphologischen Defekten der Ovarien oder der Uteri zu basieren. Ebenso konnten fehlerhafte Bildungs- und Reifungsprozesse von Oocyten, sowie eine defekte Bildung von Blastozysten aus befruchteten Oocyten als Ursachen der Infertilität ausgeschlossen werden. Dagegen scheint die Regulation des weiblichen Hormonzyklus in AP-2 δ -defizienten Tieren gestört zu sein. Daher wurde im folgenden die Expression von speziellen Hormonen der Hypophyse und des ventralen Hypothalamus untersucht, die zur Regulation des weiblichen Hormonzyklus beitragen.

Die Hypophyse gliedert sich in einen posterioren Teil, die Neurohypophyse (Hypophysen-Hinterlappen) und in einen anterioren Teil, die Adenohypophyse (Hypophysen-Vorderlappen). Zentrale Hormone der Hypophyse, die die weibliche Fertilität entscheidend regulieren, sind FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon). Beide Hormone wirken direkt auf die Follikel in den Ovarien. Dort ist LH zusammen mit FSH für die Östrogen-Freisetzung aus den Follikeln verantwortlich. FSH reguliert maßgeblich die Reifung der Follikel, während LH den Eisprung auslöst und den nun leeren Follikel zur Bildung des Progesteron-sezernierenden Corpus luteum anregt. Neben FSH und LH werden auch TSH (Thyroid-stimulierendes Hormon), PRL (Prolaktin), GH (growth hormone, Wachstumshormon), ACTH (Adrenocorticotrophes Hormon) und α -MSH (α -Melanozyten-stimulierendes Hormon) vom Hypophysen-Vorderlappen sezerniert. Die Freisetzung dieser Hormone aus dem Hypophysen-Vorderlappen erfolgt wie für LH und FSH als Antwort auf die Stimulation durch ein spezielles „Releasing“-Hormon.

Die Sekretion dieser Hormone wurde mithilfe immunhistologischer Färbungen an sagittalen Paraffinschnitten der Kopfregionen neugeborener Mäuse untersucht (Abb. 40).

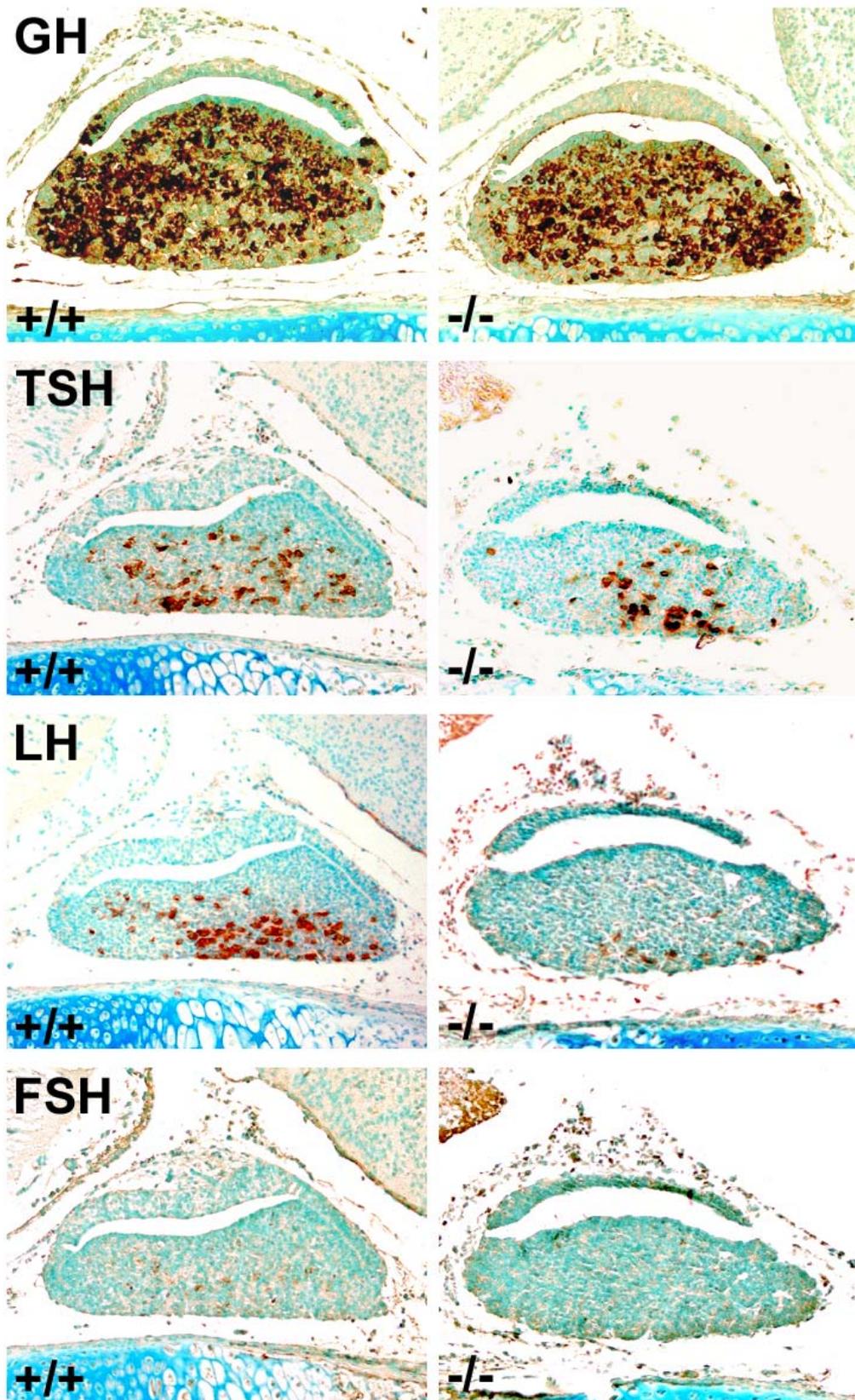


Abb. 40: Immunhistologische Analyse der Expressionsmuster verschiedener Hormone der Adenohypophyse an sagittalen Paraffinschnitten der Köpfe neugeborener Mäuseweibchen. GH Growth Hormone (Wachstumshormon), ACTH Adrenocorticotrophes Hormon, TSH Thyroid-stimulierendes Hormon, LH Luteinisierendes Hormon, FSH Follikel-stimulierendes Hormon

Nach der Inkubation der Schnitte mit Hormon-spezifischen Antikörpern zeigten sich neben einer verringerten TSH Expression auch reduzierte FSH und LH Expressionsspiegel im Hypophysenschnitt AP-25-defizienter Mäuse (Abb. 40).

Um die Expressionsmuster der Hypophysen-Hormone auch an den Hypophysen älterer Mäuse zu untersuchen, wurde die Expression der Hypophysen-Hormone an Hypophysenschnitten 12 Wochen alter Mäuseweibchen untersucht. Die immunhistologischen Untersuchungen an 12 Wochen alten Hypophysen bestätigten die reduzierten LH und TSH Expressionsspiegel, die bereits an Hypophysenschnitten neugeborener Mäuse nachgewiesen wurden (Abb. 41).

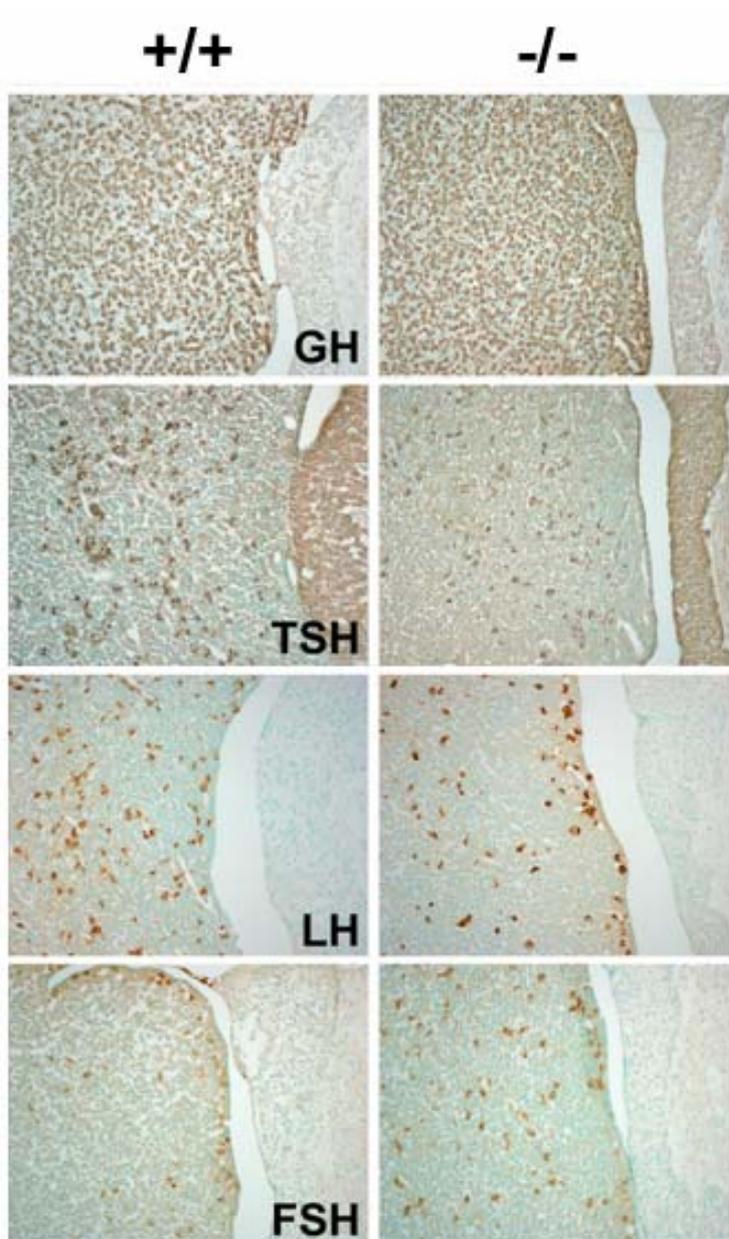


Abb. 41: Immunhistologische Analyse der Expressionsmuster verschiedener Hormone der Adenohypophyse an coronalen Paraffinschnitten der Hypophysen 12 Wochen alter Mäuseweibchen. GH Growth Hormone (Wachstumshormon), TSH Thyroid-stimulierendes Hormon, LH Luteinisierendes Hormon, FSH Follikel-stimulierendes Hormon

3.6.5.5 Expression von AP-2 Proteinen in der Hypophyse

Die Expression der AP-2 Isoformen in den Hypophysen wurde mithilfe der RT-PCR Methode und Isoform-spezifischen Primern an RNA aus den Hypophysen von jeweils vier 12 Wochen alten Wildtyp- und AP-2 δ -defizienten Mäusen untersucht.

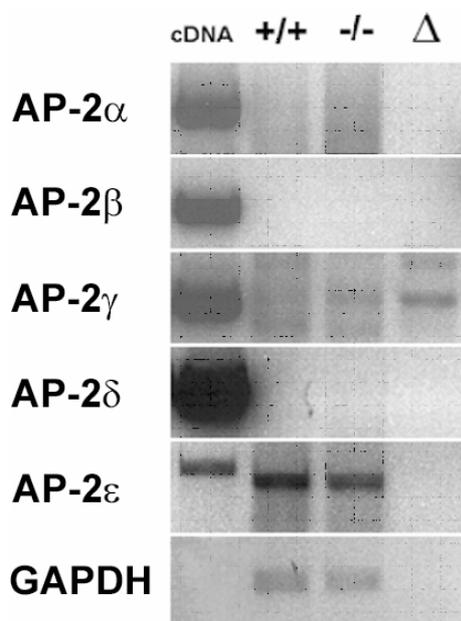


Abb. 42:

Nachweis der Expression der AP-2 Isoformen in den Hypophysen 12 Wochen alter Mäuseweibchen durch RT-PCR mit Isoform-spezifischen Primern. Die vollständige cDNA (10 ng) der jeweiligen Isoform diente als Positivkontrolle. Die Normalisierung jeder cDNA erfolgte durch eine RT-PCR mit GAPDH-spezifischen Primern.

Nach einer RT-PCR und der Auftrennung der einzelnen Proben im Agarose-Gel konnte kein PCR-Produkt für AP-2 α , AP-2 β , AP-2 γ und AP-2 δ nachgewiesen werden. Die PCR-Produkte, die für die AP-2 ϵ Isoform unterhalb der erwarteten Größe von 293 bp detektiert werden konnten, wurden nach der Extraktion der PCR-Produkte aus dem Gel in pBSIIISK subkloniert. Eine anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte ergab, daß die Sequenzen der subklonierten Fragmente keine Übereinstimmungen mit der AP-2 ϵ Isoform aufwiesen.

3.6.5.6 Analyse der Hormon-sezernierenden Zentren im Hypothalamus

Eine der wichtigsten Regionen des Hypothalamus, die die Hypophyse entscheidend reguliert, ist die Eminentia mediana (lat.: eminentia: die Herausragende, die Hervorragende; lat.: medianus: in der Mitte liegend; engl.: median eminence). Die Eminentia mediana stellt als sogenanntes Neurohämälorgan eine gefäßreiche Region im Bereich des Hypophysenstiels an der ventralen Basis des Hypothalamus dar. Neuropeptide wie das Gonadotrophine Releasing Hormone (GnRH) werden an besonderen Kapillarschlingen der Eminentia mediana ins Blut abgegeben und erreichen über das Hypophysen-Pfortader-System die Adenohypophyse. In der Adenohypophyse bewirkt GnRH die Freisetzung von LH und FSH.

Die folgende Immunhistologie untersucht die Sekretion von GnRH aus der Eminentia mediana, um auszuschließen, daß ein verminderter GnRH-Level in ebenso verminderten FSH- und LH-Spiegeln resultiert.

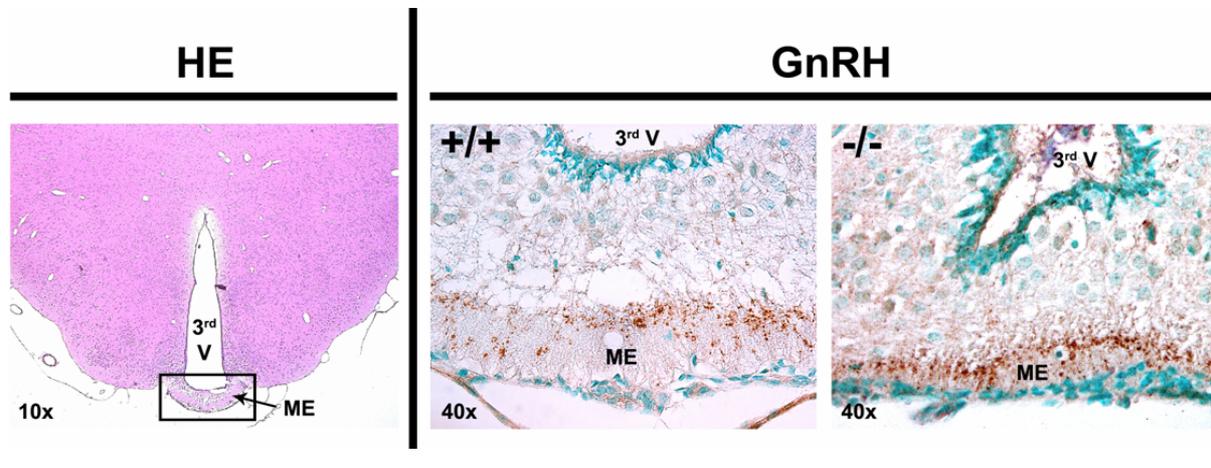


Abb. 43: Links: Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung eines coronalen Paraffinschnitts eines 4 Wochen alten Maushirns. Der Ausschnitt markiert in 10-facher Vergrößerung den ventralen Teil des Hypothalamus, die Eminentia mediana (median eminence, ME). Rechts: Nachweis der Expression des Gonadotrophine Releasing Hormone (GnRH) in Zellen der median eminence (ME) an coronalen Paraffinschnitten 4 Wochen alter Maushirne in 40-facher Vergrößerung. 3rdV dritter Ventrikel

Nach der Inkubation mit einem GnRH-spezifischen Antikörper und einer anschließenden DAB-Färbung konnte GnRH in den Kapillarschlingen der Eminentia mediana nachgewiesen werden (Abb. 43). Dabei konnte keine Veränderung in der GnRH Expression zwischen den Paraffinschnitten der wildtyp- und der AP-2 δ -defizienten Hirne festgestellt werden. Demnach scheint zumindest nicht die GnRH-Bildung im Hypothalamus AP-2 δ -defizienter Tiere beeinträchtigt zu sein.

3.6.6 Expressions- und Funktionsanalyse an der Retina von AP-2 δ Mutanten

Verschiedene Expressionstudien konnten bereits die Expression von anderen AP-2 Proteinen in verschiedenen Strukturen des murinen Auges während der Embryonalentwicklung nachweisen. So werden AP-2 α und AP-2 β in der Linse, in der Epidermis des Augenlids und in der Hornhaut koexprimiert (Mitchell et al., 1991; Moser et al., 1997b; Zhao et al., 2003).

Da erste immunhistologische Untersuchungen an Paraffinschnitten 13.5 Tage alter Mäuse ebenfalls AP-2 δ in der embryonalen Retina (schwarze Pfeile), sowie schwach im embryonalen Linsenkörper (roter Pfeil) nachweisen konnten (Abb. 44), sollten weitere immunhistologische Färbungen wie Doppel-Immunfluoreszenzen mit AP-2 α - und AP-2 β -spezifischen Antikörpern nachweisen, in welcher Schicht der Retina AP-2 δ exprimiert wird und, ob eine Koexpression mit anderen Mitgliedern der AP-2 Familie besteht.



Abb. 44:

Immunhistologischer Nachweis der AP-2 δ Expression in der Retina (schwarze Pfeile) und im Linsenkörper (roter Pfeil) an sagittalen Paraffinschnitten von 13.5 Tage alten Embryonen mit einem AP-2 δ -spezifischen Antikörper.

3.6.6.1 AP-2 δ wird in der Ganglion-Zellschicht exprimiert

Mithilfe von Immunfluoreszenzen an Paraffinschnitten von Augen 7 Tage alter Mäuse sollten die Expressionsmuster von AP-2 α , AP-2 β und AP-2 δ voneinander abgegrenzt werden. Die Immunfluoreszenzen zeigten, daß die Retina der AP-2 δ Mutanten gemäß der Retina des wildtyp-Auges aus drei Kern-haltigen Schichten besteht: der äußeren (ONL, outer nuclear layer) und der inneren (INL, inner nuclear layer) Kernschicht, sowie der Ganglion-Zellschicht (GCL, ganglion cell layer). Zudem konnten für jede AP-2 Isoform spezifische Expressionsmuster in unterschiedlichen Schichten der Retina beobachtet werden (Abb. 45). Dabei werden AP-2 α und AP-2 β in der inneren Kernschicht und in der Ganglion-Zellschicht koexprimiert. Da die amakrinen Zellen an der inneren Begrenzung der inneren Kernschicht liegen, werden AP-2 α und AP-2 β vermutlich in amakrinen Zellen exprimiert (Abb. 45). AP-2 δ dagegen wird ausschließlich in der Ganglion-Zellschicht exprimiert.

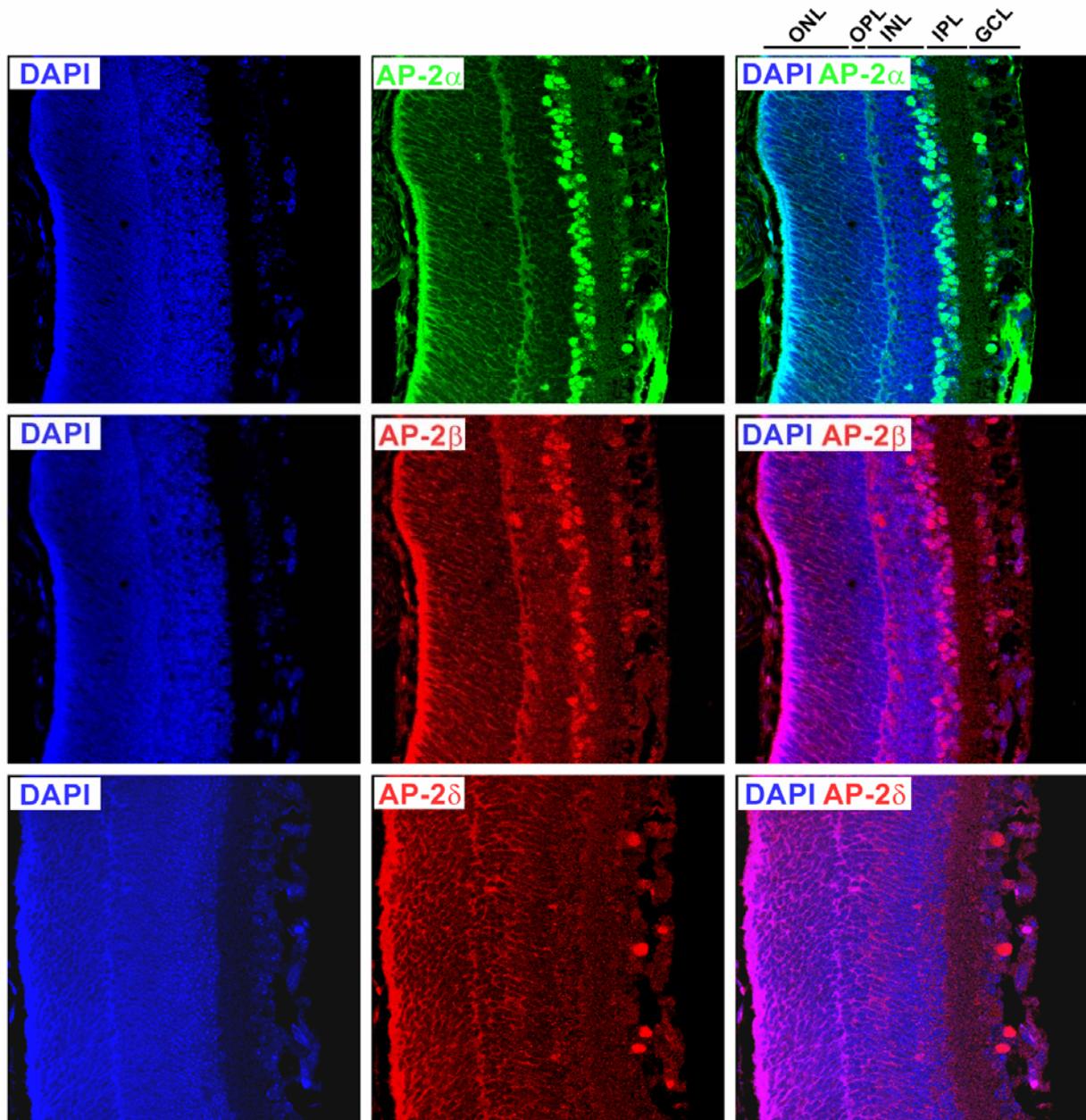


Abb. 45: Expression der AP-2 Isoformen AP-2 α , AP-2 β und AP-2 δ in unterschiedlichen Retina-Schichten von Augen 7 Tage alter Mäuse. Immunfluoreszenzen mit AP-2 α -, AP-2 β - und AP-2 δ -spezifischen Primär- und Fluoreszenz-gekoppelten Sekundär-Antikörpern an sagittalen Paraffinschnitten. ONL (outer nuclear layer, äußere Kernschicht), OPL (outer plexiform layer, äußere plexiforme Schicht), INL (inner nuclear layer, innere Kernschicht), IPL (inner plexiform layer, innere plexiforme Schicht), GCL (ganglion cell layer, Ganglion-Zellschicht). Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie mit einer 63-fachen Vergrößerung

Die Fragestellung, ob die Expressionsmuster von AP-2 α , AP-2 β und AP-2 δ in der murinen Retina überlappen, wurde mithilfe von Doppel-Immunfluoreszenzen an sagittalen Paraffinschnitten von Augen 7 Tage alter Mäuse untersucht. Da zum Zeitpunkt der Arbeit keine AP-2 β - und AP-2 δ -spezifischen Antikörper aus zwei verschiedenen Spezies zur Verfügung standen, konnten lediglich Doppel-Immunfluoreszenzen mit AP-2 α /AP-2 β und AP-2 α /AP-2 δ durchgeführt werden. Die mikroskopische Analyse der Doppelimmunfluoreszenzen zeigte zum einen, daß AP-2 α und AP-2 β nur

geringfügig in der Ganglion-Zellschicht koexprimiert werden (Abb. 46, D). Ebenso zeigen nur wenige Zellen in der Ganglion-Zellschicht eine Koexpression von AP-2 α und AP-2 δ .

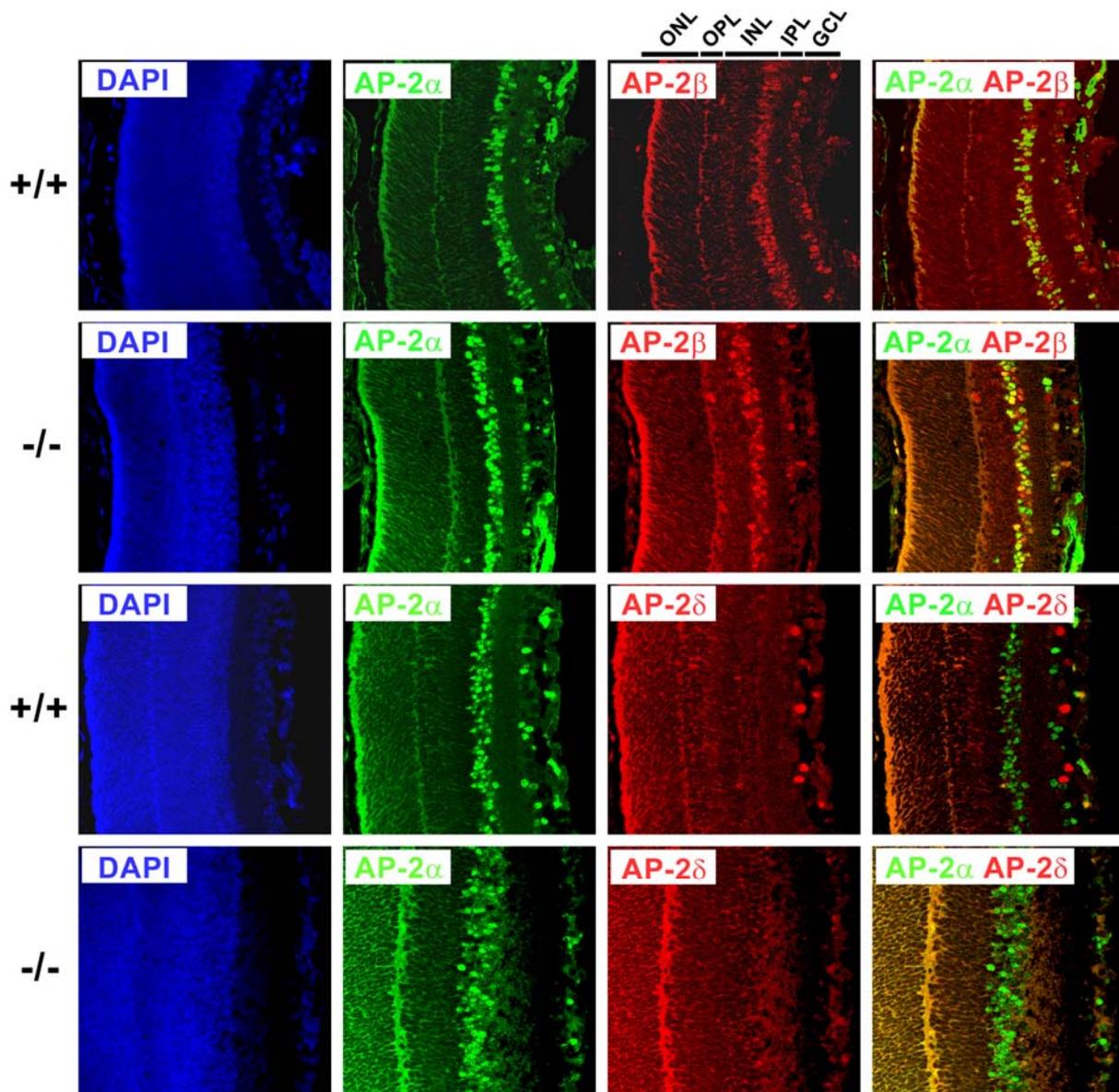


Abb. 46: Expression der AP-2 Isoformen AP-2 α , AP-2 β und AP-2 δ in unterschiedlichen Retina-Schichten von Augen 7 Tage alter Mäuse. Doppel-Immunfluoreszenzen mit AP-2 α -, AP-2 β - und AP-2 δ -spezifischen Primär- und Fluoreszenz-gekoppelten Sekundär-Antikörpern an sagittalen Paraffinschnitten. ONL (outer nuclear layer, äußere Kernschicht), OPL (outer plexiform layer, äußere plexiforme Schicht), INL (inner nuclear layer, innere Kernschicht), IPL (inner plexiform layer, innere plexiforme Schicht), GCL (ganglion cell layer, Ganglion Zellschicht). Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie mit einer 63-fachen Vergrößerung

Potentielle Funktionen von AP-2 δ in der Retina wie eine Beteiligung an apoptotischen Vorgängen wurden im Folgenden untersucht.

3.6.6.2 Zelltodanalysen in der Retina AP-2δ defizienter Mäuse

Im embryonalen Mittelhirn konnte bereits nachgewiesen werden, daß der Verlust von AP-2δ zum Zelltod in den AP-2δ-exprimierenden Zellen des Colliculus inferior führt. Dieser Zelltod kann nicht durch andere AP-2 Isoformen kompensiert werden, da AP-2δ als einzige AP-2 Isoform im Colliculus inferior exprimiert wird. Da in der Retina nur eine schwache Koexpression von AP-2α und AP-2β mit AP-2δ in der Ganglion-Zellschicht detektiert werden konnte, wurde mithilfe eines TUNEL-Assays untersucht, ob der Verlust von AP-2δ in der Retina ebenfalls zum Absterben der AP-2δ exprimierenden Zellen führt.

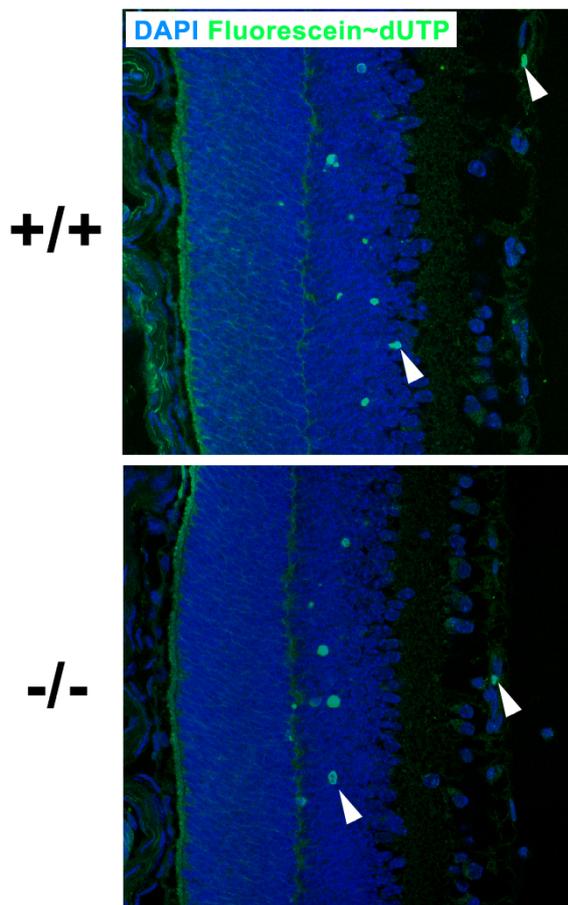


Abb. 47:

Nachweis apoptotischer Prozesse in der Retina mithilfe eines TUNEL Assays mit Fluorescein-markierten dUTPs an sagittalen Paraffinschnitten von Augen 7 Tage alter Mäuse. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie mit einer 63-fachen Vergrößerung

Apoptotische Prozesse konnten infolge der Fluorescein-dUTP Markierung beschädigter DNA mithilfe konfokaler Laser Scanning Mikroskopie detektiert werden. So konnten nicht nur in der AP-2δ-exprimierenden Ganglion-Zellschicht, sondern auch in der inneren Kernschicht vereinzelt tote Zellen nachgewiesen werden. Dabei waren in den Retinas AP-2δ-defizienter Mäuse gleichermaßen viele tote Zellen vorhanden, wie in den Retinas der Kontroll-Tiere.

Dies deutet darauf hin, daß der Verlust von AP-2 δ in der murinen Retina nicht in apoptotischen Prozessen resultiert und daher scheint AP-2 δ keine essentielle Rolle für das Überleben von Zellen in der Retina, besonders in der Ganglion-Zellschicht zu spielen. Ein möglicher Grund dafür kann in dem sich teilweise überlappenden Expressionsmuster von AP-2 α und AP-2 β mit AP-2 δ in der Ganglion-Zellschicht liegen (Abb. 46). Eine Kompensation für die fehlende AP-2 δ Isoform erscheint daher in der Ganglion-Zellschicht in AP-2 δ -defizienten Augen möglich.

3.7 Identifizierung von Interaktionspartnern von AP-2 δ

AP-2 Transkriptionsfaktoren interagieren nicht direkt mit der basalen Transkriptionmaschinerie, sondern initiieren die Transkription von Zielgenen über die Interaktion mit Coaktivatoren. Da AP-2 δ im Vergleich mit anderen AP-2 Isoformen über eine veränderte Transaktivierungsdomäne verfügt, in der einige zentrale Motive modifiziert sind oder fehlen, interagiert AP-2 δ vermutlich auch mit anderen Coaktivatoren. Potentielle Coaktivatoren wurden mithilfe eines Yeast-Two Hybrid Interaktionsscreens identifiziert, der auf dem Screening einer Hirn-cDNA-Bank adulter Mäuse mit einem Köderprotein basiert. Als Köderprotein wurde die AP-2 δ Transaktivierungsdomäne verwendet. Die Länge der AP-2 δ Transaktivierungsdomäne (TAD) war zuvor aufgrund von Literaturangaben auf die Aminosäuren 1-209 festgelegt worden, da Experimente mit der humanen AP-2 α Isoform diese ersten 209 Aminosäuren als Transaktivierungsdomäne auswiesen (Wankhade et al., 2000). Durch die Subklonierung der AP-2 δ -TAD in den korrekten Leserahmen des Vektors pGBKT7 entsteht ein Fusionsprotein aus der AP-2 δ -TAD und der N-terminalen Gal4-DNA-Bindedomäne des Vektors pGBKT7. Dieses Konstrukt diente als bait-Vektor für den Yeast Two-Hybrid Screen und verfügt neben der GAL4-DNA-Bindedomäne über ein Tryptophan-Synthese-Gen, was transformierten Hefezellen des Stammes AH109 das Wachstum auf Tryptophan-Mangelmedium ermöglicht. Um auszuschließen, daß dieses Konstrukt ohne die Anwesenheit eines Beute-Vektors (prey) in den Hefezellen zur Autoaktivierung der Reportergene führt und somit den eigentlichen Screen durch falsch-positive Resultate verfälscht, wurde zunächst die Autoaktivität dieses Konstrukts überprüft.

3.7.1.1 Analyse der Autoaktivität des Köder-Vektors

Um die Autoaktivierung von Reportergenen in AH109-Hefezellen zu überprüfen, wurden die Hefezellen nach der Transformation mit dem bait-Vektor (AP-2 δ -TAD in pGBKT7) auf SD-Platten ohne Adenin, Histidin und ohne Tryptophan mit steigenden 3-AT Konzentrationen ausgestrichen (Abb. 48). Der Adenin- und Histidin-Mangel führt in den transformierten Hefezellen zu einer Streßsituation, die sie vermeiden können, wenn das bait-Konstrukt autoaktivierbar ist und die Reportergene Adenin und Histidin transaktiviert werden können. Da transformierte AH109-Zellen eine leicht erhöhte HIS3 Expression aufgrund der intrinsischen DNA-Bindungseigenschaften des bait-Proteins zeigen, enthielten einige Platten zusätzlich 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) in Konzentrationen von 5 - 20 mM. 3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor des Hefe HIS3-Proteins (His3p) und wird verwendet, um das in

geringer Konzentration gebildete His3p zu inhibieren, das konstitutiv in geringer Dosis von den Zellen exprimiert wird (Fields, 1993; Durfee et al., 1993). Die Transformation wurde durch einen Ausstrich auf einer Adenin-, Histidin- und Leucin-haltigen Platte überprüft, da die Hefezellen im Gegensatz zum Test auf Autoaktivierung unter normalen Bedingungen wachsen sollten (Abb. 48, +Ade, +His, +Leu).

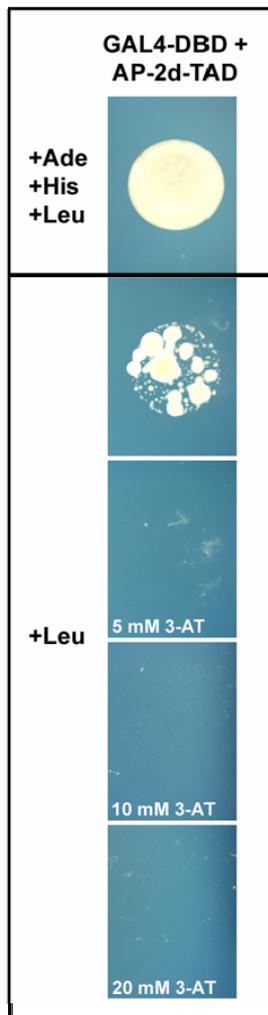


Abb. 48:

Analyse der Autoaktivität des bait-Vektors.

Nach 3-4 Tagen zeigte der Test auf Autoaktivierung, daß die Zellen durch den Adenin- und Histidin-Mangel deutlich im Wachstum gehemmt werden. Eine Autoaktivität des bait-Konstruktes scheint somit nicht vorzuliegen, da das bait-Konstrukt den Hefezellen die Aktivierung der Reportergene und somit das Überleben trotz der verschärften Stoffwechselsituation nicht ermöglicht. Der Zusatz von 3-AT verstärkt die Selektion der transformierten Hefezellen effektiv, sodaß das Wachstum transformierter Hefezellen bereits bei 5 mM 3-AT völlig unterbunden wird.

3.7.2 Yeast Two-Hybrid Screen

Einzelne Parameter der Transformation wie die einzusetzende DNA-Menge oder die optische Dichte der Kultur, aus der die kompetenten Zellen zur Transformation präpariert wurden, waren vor dem

Screen durch Testtransformationen mit dem pCL-1 Vektor, der die GAL4-DBD, sowie die GAL4-TAD als ein zusammenhängendes Polypeptid enthält, optimiert worden. So zeigten diese Testtransformationen auch, daß höhere Transformationseffizienzen mit kompetenten Hefezellen erzielt werden konnten, die unmittelbar vor der Transformation ihre Kompetenz erlangt hatten. Die Analyse der Autoaktivität des bait-Vektors ergab zudem, daß mit einer Konzentration von 5 mM 3-AT bereits eine deutliche Inhibierung des HIS3-Proteins eintrat. Um starke Interaktoren zu identifizieren und andererseits falsch-positive Kolonien aufgrund des konstitutiv exprimierten HIS3-Proteins vollständig zu vermeiden, wurde das 3-AT für den Screen in einer Konzentration von 20 mM eingesetzt.

Zur Kotransformation mit dem bait-Vektor wurde der Vektor pACT2 des Matchmaker-Systems verwendet, der neben einem Ampicillin-Resistenz-Gen und einem Leucin-Synthese-Gen eine murine cDNA-Bank mit 0.4 bis 5 kb großen cDNA-Fragmenten enthält, die aus Hirnen adulter Mäusen gewonnen wurde. Diese cDNA-Bank umfaßt 3.5×10^6 unabhängige Klone. Für die Kotransformation mit dem bait- und dem prey-Vektor wurden jeweils 2 µg Plasmid-DNA eingesetzt und die Transformation wurde wie beschrieben durchgeführt. Nach der Transformation wurden die Transformationsansätze zum einen auf Platten mit 20 mM 3-AT ohne Tryptophan, ohne Histidin, ohne Adenin und ohne Leucin ausplattiert (-THAL). Der Mangel an Tryptophan und Leucin konnte durch die Biosynthese-Gene der beiden transformierten Vektoren kompensiert werden und die Selektion erfolgte auf die beiden Reportergene Adenin und Histidin, die infolge einer Interaktion des Köder- und des Beuteproteins aktiviert werden. Zum anderen wurden die Transformationsansätze auch auf Histidin- und Adenin-haltige Platten ohne 3-AT, sowie ohne Tryptophan und ohne Leucin (-TL) ausplattiert. Anhand dieser Platten, die als Transformationskontrollen dienten, wurde das Wachstum der Kolonien überprüft und die Transformationseffizienz bestimmt (Abb. 49).

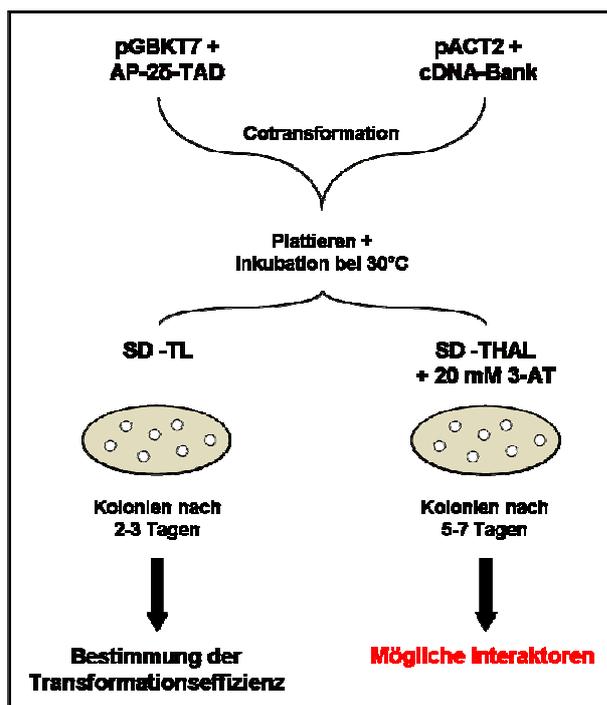


Abb. 49: Interaktions-Screen

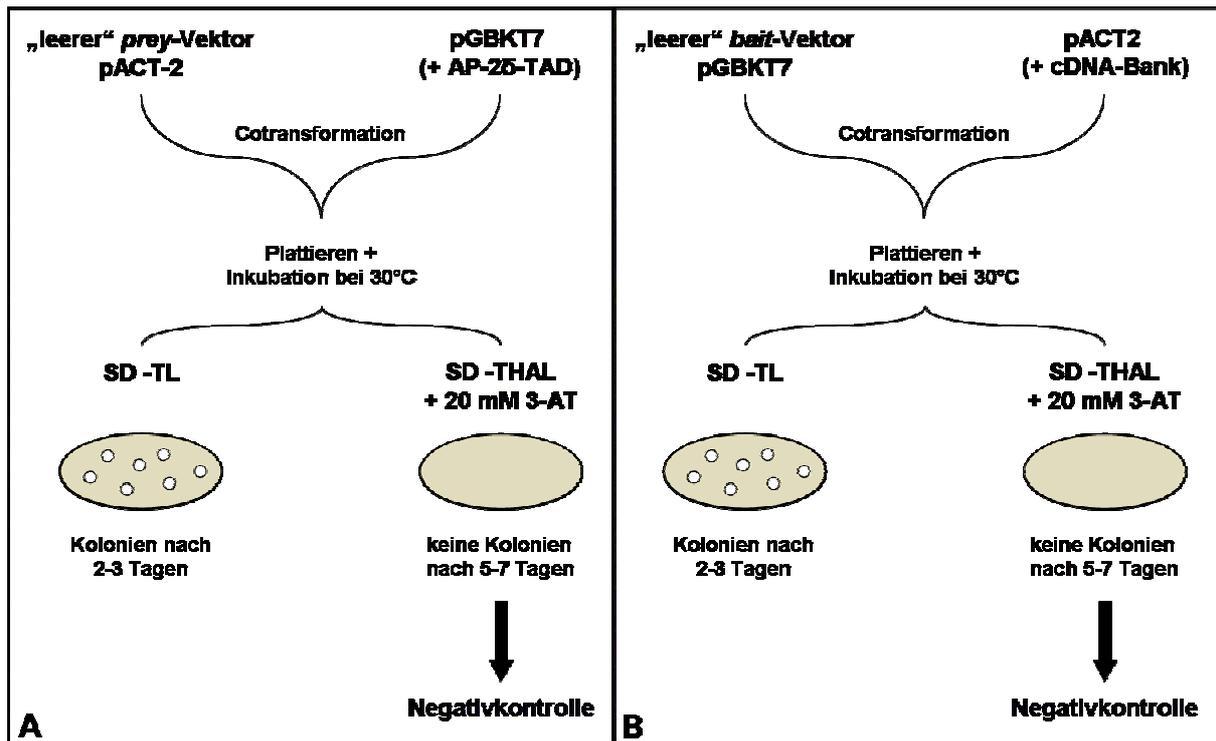


Abb. 50: Kontrollen des Interaktions-Screens

Als Negativkontrollen wurden jeweils der „leere“ bait-, sowie der „leere“ prey-Vektor jeweils mit dem bait- oder mit dem prey-Vektor kotransformiert (Abb. 50). Diese Transformationsansätze wurden auf Platten mit derselben Zusammensetzung, die auch für den Screen verwendet wurden, ausplattiert. Nach einem 2-3 tägigen Wachstum konnten die ersten Kolonien auf der SD -TL-Platte detektiert werden. Da die Anzahl der Kolonien in einem ersten Screen unter 3.5×10^6 Kolonien lag, waren nicht alle Kolonien der cDNA-Bank in den Screen miteinbezogen worden und daher wurde der Screen unter denselben Bedingungen wiederholt. Die Ermittlung der Kolonienzahl im zweiten Screen lag bei ca. 5.9×10^7 Kolonien, was einem 17-fachen Screening der cDNA-Bank entspricht. Die ersten positiven Kolonien der SD -THAL-Platte waren nach 5 Tagen sichtbar. Die möglichen Interaktoren wurden jeden Tag gesammelt und auf einer Masterplatte (SD -THAL + 10 mM 3-AT) ausgestrichen. Gleichzeitig konnten nach 7 Tagen auf den Platten der Negativkontrollen keine Kolonien detektiert werden.

3.7.3 Verifikation und Analyse positiver Klone

3.7.3.1 Analyse der Interaktionen durch einen X-Gal Filter Assay

Insgesamt konnten im ersten und im zweiten Screen 342 Klone auf Masterplatten gesammelt werden. Klone, die im Screen die Wachstumsselektion auf den SD -THAL-Platten mit 20 mM 3-AT überlebten, wurden durch einen β -Galaktosidase filter lift-Assay weiterhin auf eine „echte“ Interaktion überprüft. Dieser Assay ergab, daß von den 342 Klonen 100 Klone keine Blaufärbung aufwiesen und somit als Interaktoren ausschieden.

3.7.3.2 Analyse der prey-Vektoren

Um die verbleibenden Klone als „echte“ Interaktoren zu bestätigen, wurde zunächst die Plasmid-DNA aus den Hefezellen präpariert. E.coli-Bakterien wurden nach der Transformation mit der Plasmid-DNA durch Ampicillin selektioniert, sodaß nur Bakterien mit dem prey-Plasmid überlebten. Der Präparation der prey-Plasmid-DNA aus den Bakterien folgte ein anschließender Restriktionsverdau zur Isolation des im prey-Vektor pACT2 enthaltenen cDNA-Fragments. Die Auftrennung der Restriktionsspaltungen im Agarosegel zeigte, daß von den 242 Klonen 8 Klone kein cDNA-Fragment enthielten.

Um vor der Sequenzierung der Plasmid-DNA möglichst viele Klone als „falsche“ Interaktoren identifizieren zu können, wurde die Stabilität der Interaktion durch die Retransformation des prey- und des bait-Vektors in die Hefezellen überprüft. Von den verbleibenden Klonen konnte für 131 Klone nach der Transformation kein Wachstum beobachtet werden.

Zum anderen wurde lediglich der prey-Vektor in die Hefezellen transformiert. Anschließend wurden die Hefezellen auf Tryptophan-haltige Platten (SD -HAL) mit 20 mM 3-AT ausgestrichen, um die Klone ohne Interaktion mit dem bait-Vektor in die Autoaktivierung der Reportergene Histidin und Adenin zu treiben. Neun der restlichen Klone konnten auf SD-HAL-Platten wachsen und somit die Reportergene aktivieren.

3.7.3.3 Identifizierung der Interaktoren durch Sequenzierung

Die Sequenzen der verbleibenden 94 Klone wurden durch Sequenzierung des prey-Vektors mithilfe des Primers „Gal4 AD seq sense“ bestimmt. Der Vergleich des Leserahmens des Vektors und des enthaltenen cDNA-Fragments zeigte, daß beide Leserahmen in 38 Klonen (40.4%) übereinstimmen. Mithilfe des BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Programms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) konnten in einer redundanten Nukleotid-Datenbank (nr) die Gene identifiziert werden, die den Sequenzen der Klone im Leserahmen des pACT2-Vektors entsprechen. Zwei Klone, deren Sequenz mit dem mitochondrialen Genom, bzw. mit dem pACT2-Vektor übereinstimmte, werden in der Tabelle nicht aufgeführt.

Name des Gens	GenBank Notierung	Name/Expression/Funktion
<u>Transkriptionsfaktoren</u>		
<i>E2F4</i>	NM_148952	<ul style="list-style-type: none">• E2F transcription factor 4• Breites Expressionsmuster in embryonalen und adulten Geweben (Herz, Leber, Gehirn, Lunge, Muskel, Nieren)
<i>FoxG1</i>	BC079597	<ul style="list-style-type: none">• Forkhead box G1• Frühe embryonale Expression im Gehirn, Ohr, Neuroektoderm, Retina

Name des Gens	GenBank Notierung	Name/Expression/Funktion
<i>NFAT1-D</i>	AF289078	<ul style="list-style-type: none"> • Synonym: Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 (Nfatc2) • Expression im embryonalen Gehirn, Ohr, Retina
<u>RNA und DNA Modifizierung</u>		
<i>U2AF1L1</i>	AK160974	<ul style="list-style-type: none"> • U2 small nuclear RNA auxillary factor 1-like 1 • Expression im Gehirn nachgewiesen • mRNA Splicing
<i>AOF2</i>	BC059885	<ul style="list-style-type: none"> • amine oxidase (flavin containing) domain 2 • Embryonale Expression im Trophoblasten, Auge, Gehirn, Extremitätenknospen, breite Expression in adulten Geweben • enthält eine Lysin-spezifische Histon-Demethylase 1 Untereinheit • Chromatin Modifizierung
<u>Translation</u>		
<i>eIF1</i>	BC096656	<ul style="list-style-type: none"> • eukaryotic translation initiation factor 1 • Breites Expressionsspektrum in embryonalen und adulten Geweben • Initiation der Translation
<i>eEF2¹</i>	BC007152	<ul style="list-style-type: none"> • eukaryotic translation elongation factor 2 • Expression im embryonalen Auge, Herz, Niere, Leber, Lunge und im adulten Thymus • Elongation der Translation
<i>QTRT1</i>	BC044811	<ul style="list-style-type: none"> • queuine tRNA-ribosyltransferase 1 • Embryonale Expression zwischen E7.5 und E14.5 • tRNA Modifikation
<u>Ubiquitinylierung</u>		
<i>Nedd4</i>	NM_010890	<ul style="list-style-type: none"> • neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4 • Expression im ZNS, Knorpelgewebe, in vorderen und hinteren Extremitäten, nukleäre Schichten der Retina • Ubiquitin Ligase
<i>Fbxo25</i>	BC014749	<ul style="list-style-type: none"> • F-box only protein 25 • Expression embryonal: Gehirn, Expression adult: Gehirn, Thymus, Auge • Beteiligung am Ubiquitin-Zyklus
<i>Unp</i>	AF026469	<ul style="list-style-type: none"> • ubiquitin-specific protease gene • Synonym: ubiquitin specific peptidase 4 (Usp4) • Expression in der embryonalen Niere und im adulten Cerebellum, Thymus, in den Ovarien, Lymphknoten und in der Milz • Substrat-Deubiquitinylierung

Name des Gens	GenBank Notierung	Name/Expression/Funktion
<u>Regulation apoptotischer Prozesse</u>		
<i>Fastk</i>	NM_023229	<ul style="list-style-type: none"> • Fas-activated serine/threonine kinase • Embryonale Expression: Auge, Herz, Leber, Extremitätenknospen, Hypophyse; Adulte Expression: Cortex, Hypothalamus, Dickdarm, Thymus, Ovar, Niere, Milz • Regulation apoptotischer Prozesse
<i>Sphk2</i>	NM_203280	<ul style="list-style-type: none"> • Sphingosine kinase 2 • Embryonale Expression: Gehirn, Ohr, Retina; breit in adulten Geweben exprimiert • Induktion von Apoptose • Regulation der Entwicklung des Gehirns und der Blutgefäße • Regulation der Zellproliferation
<u>Weitere degenerative Prozesse</u>		
<i>Tegt</i>	NM_026669	<ul style="list-style-type: none"> • testis enhanced gene transcript • Synonym: Bax inhibitor-1 • Expression im embryonalen Kopf nachgewiesen • Hemmung apoptotischer Prozesse
<i>PSMC5</i>	BC030840	<ul style="list-style-type: none"> • protease (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 5 • Breite expression in adulten Organen • Proteasomaler Abbau
<i>Ctss</i>	NM_021281	<ul style="list-style-type: none"> • cathepsin S • Breite Expression in adulten Geweben • Lysosomaler Abbau
<u>Zytoskelett-assoziierte Prozesse</u>		
<i>Ndr3</i>	NM_013865	<ul style="list-style-type: none"> • <i>N-myc downstream regulated gene 3</i> • Expression im embryonalen und adulten ZNS, Ohr, Retina • Zelldifferenzierung
<i>Epn2</i>	BC039138	<ul style="list-style-type: none"> • Epsin2 • Embryonale exprimiert; adulte Expression: Diencephalon, Cerebellum, Ovar, Blase • Clathrin-vermittelte Endozytose
<i>St3gal5</i>	NM_001035228	<ul style="list-style-type: none"> • ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5, transcript variant 1 • Breite Expression in adulten Geweben • Glykosylierung im Golgi-Apparat
<i>Arc²</i>	NM_018790	<ul style="list-style-type: none"> • activity regulated cytoskeletal-associated protein • Expression in embryonalem und extraembryonalem Gewebe • Regulation des Cytoskeletts
<i>SNAP25</i>	BC018249	<ul style="list-style-type: none"> • synaptosomal-associated protein 25 • Expression im embryonalen Gehirn und in der Retina • Fusion der synaptischen Membran

Name des Gens	GenBank Notierung	Name/Expression/Funktion
<u>Signaltransduktion</u>		
<i>Gnb2</i>	BC059942	<ul style="list-style-type: none"> • guanine nucleotide binding protein, beta 2 • Breite Expression in embryonalen und adulten Geweben • G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion
<i>Gpr153</i>	NM_178406	<ul style="list-style-type: none"> • G protein-coupled receptor 153 • Embryonale Expression: Gehirn, Herz, Extremitätenknospen; adulte Expression: Dickdarm, Auge, Hypophyse, Milz • G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion
<i>Axin2</i>	NM_015732	<ul style="list-style-type: none"> • Embryonale Expression: Ektoderm, Mesoderm, Kiemenbögen, Rückenmark. Nierenanlage • Regulation des Wnt/β-Catenin Signalwegs
<i>AIP</i>	BC075614	<ul style="list-style-type: none"> • aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein • Expression im embryonalen und im adulten Gehirn, Ohr, Retina • AHR (aromatic hydrocarbon receptor)-vermittelte Signaltransduktion
<u>Metabolismus</u>		
<i>Gba2</i>	BC056935	<ul style="list-style-type: none"> • glucosidase beta 2 • Gallensäure Metabolismus
GAPDH-ähnlich	BC085274	<ul style="list-style-type: none"> • Glykolyse
<u>Unbekannt / Sonstiges</u>		
Glutamin-reiches Protein mit Tetratricopeptid-Wiederholung	BC003836	<ul style="list-style-type: none"> • Genprodukt unbekannt • Funktion unbekannt
RIKEN Klon 5430410O10	AK160274	<ul style="list-style-type: none"> • Hypothetisches Produkt: ähnlich zu INM02 • Funktion unbekannt
RIKEN Klon F830016J03	AK156326	<ul style="list-style-type: none"> • Genprodukt unbekannt • Funktion unbekannt
RIKEN Klon F830011M14	AK171800	<ul style="list-style-type: none"> • Genprodukt: ALS2
RIKEN cDNA 2700089E24 Gen	BC053418	<ul style="list-style-type: none"> • Genprodukt unbekannt • Funktion unbekannt
RIKEN Klon C430039I17	AK049558	<ul style="list-style-type: none"> • Genprodukt: Wnt5b • Funktion unbekannt
RIKEN Klon 6430579F19	AK135083	<ul style="list-style-type: none"> • Genprodukt: S100 protein • Funktion unbekannt
RIKEN cDNA 1110061N23 Gen	BC030073	<ul style="list-style-type: none"> • Genprodukt unbekannt • Funktion unbekannt

Tab. 5: Liste der Gene, die als Interaktoren durch einen Yeast Two-Hybrid Screen mit der AP-2 δ -TAD identifiziert werden konnten. ¹ eEF-2 wurde in beiden Screens gefunden, wird aber nur einmal aufgeführt. ² Arc wurde im zweiten Screen in zwei verschiedenen Klonen identifiziert, wird jedoch nur einmal aufgeführt.

Zehn der 38 Klone waren für weitere Untersuchungen aufgrund ihrer Funktion als Transkriptionsfaktor, oder ihrer Beteiligung an degenerativen Prozessen wie Apoptose und Ubiquitylierung von besonderem Interesse. Diese prey-Klone wurden erneut zusammen mit dem bait-Vektor kotransformiert und auf verschiedene Selektionsplatten getropft. Neben diesen Interaktor-Transformationen wurden ebenfalls Kontroll-Transformationen mit den jeweils „leeren“ bait- und prey-Vektoren durchgeführt, die lediglich die DNA-Bindedomäne (DBD), bzw. die Transaktivierungsdomäne (TAD) enthielten. Die Transformationen auf SD -TL-Platten (SD-Mangelmedium mit Adenin und Leucin) dienen der Transformationskontrolle. Die SD -THAL-Platten (SD-Mangelmedium ohne Thryptophan, Histidin, Adenin und Leucin) mit 20 mM 3-AT wurden bereits für den Screen verwendet. Zusätzlich wurde mit den „Interaktor-Kolonien“ ein α -Galaktosidase in vivo Assay durchgeführt. Dazu waren die Kolonien vor der Überschichtung mit der X-Gal-haltigen Agaroselösung photographiert worden. Nach 1-2 Tagen wiesen die Kolonien durch die Aktivierung des LacZ Reportergens eine blaue Färbung auf und wurden erneut photographiert.

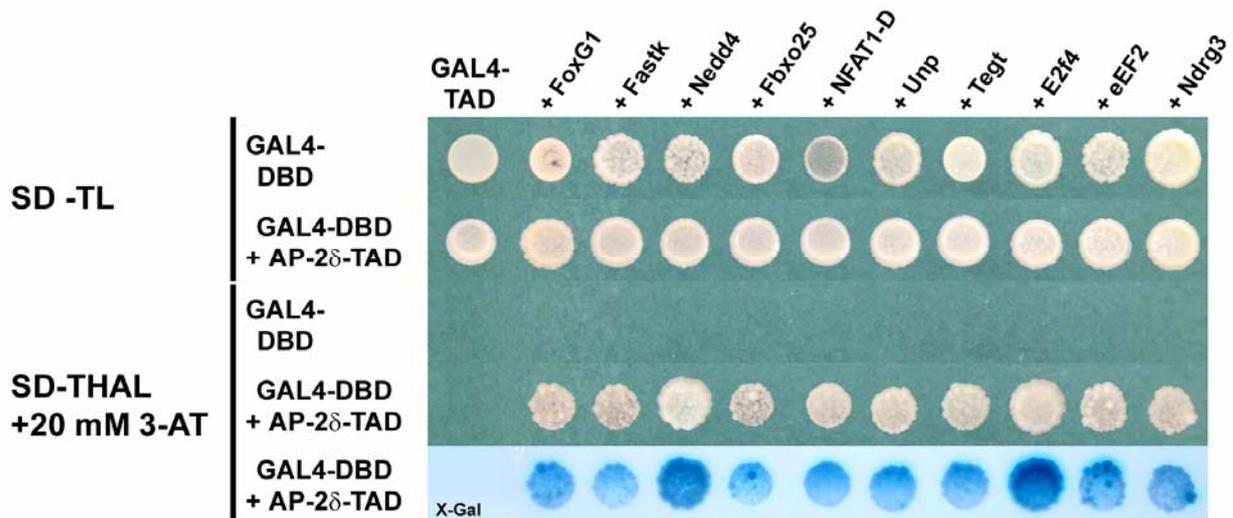


Abb. 51: Transformationen der 10 interessantesten Klone mit den beschriebenen Kontrollen. GAL4-DBD beschreibt den „leeren“ bait-Vektor (pGBKT7) und GAL4-TAD den „leeren“ prey-Vektor (pACT2).

3.7.3.4 Verifikation positiver Klone durch GST-Pulldown Experimente

Die Interaktionsfähigkeit zweier potentieller Kandidaten, FoxG1 und NFAT1-D mit der AP-2 δ -TAD wurde durch eine GST-Pulldown-Analyse überprüft. Dazu wurde die AP-2 δ -TAD als bait-Protein in den korrekten Leserahmen des Vektors pGEX-3x kloniert. Dieses Fusionsprotein, bestehend aus der Glutathion-S-Transferase (GST) und der AP-2 δ -TAD wurde nach der Transformation in BL21 E.coli Bakterien durch IPTG-Induktion exprimiert und aufgereinigt. Parallel wurden die cDNA-Fragmente der Kandidaten (prey-Klone) mit einem N-terminalen HA (Hämagglutinin)-Epitop aus dem Ursprungsvektor pACT2 in den Expressionsvektor pCMX-PL1 kloniert. Dieser Vektor besitzt einen T7-Promotor, der die in vitro Translation des C-terminal inserierten cDNA-Fragments ermöglicht. In einem anschließenden GST-Pulldown wurden die GST-Fusionsproteine, sowie „unfusionierte“ GST-Proteine

an Glutathion Sepharose gebunden. Die „beladene“ Glutathion Sepharose wurde danach mit den in vitro Translaten (IVT) inkubiert. Diese Komplexe wurden nach mehreren Waschschritten mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und nach erfolgter Denaturierung auf ein 12.5 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Zur Ermittlung des Molekulargewichts der cDNA-Fragmente der einzelnen Kandidaten wurde die Sequenz der cDNA-Fragmente mithilfe des Programms „six frame translation“ (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>) in eine Proteinsequenz übersetzt (siehe Anhang). Von dieser Proteinsequenz wurde der jeweils längste verfügbare Leserahmen (ORF, open reading frame) zur Bestimmung des Molekulargewichts des Proteinfragments genutzt. Für das FoxG1-Fragment konnte so ein Molekulargewicht von 31.7 kDa ermittelt werden, während das Molekulargewicht des NFAT1-D-Fragments 16.2 kDa betrug.

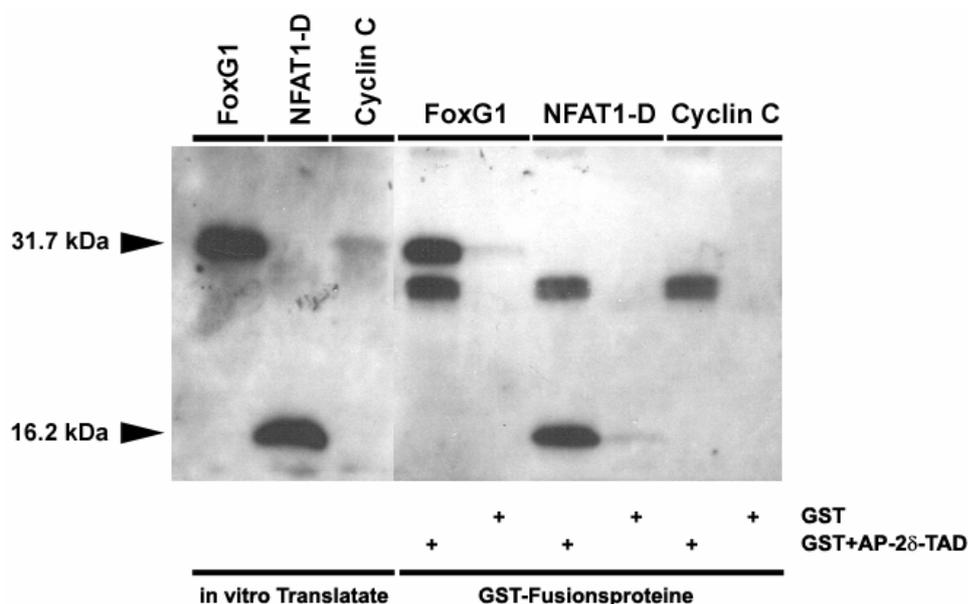


Abb. 52: Nachweis der Interaktion von FoxG1 und NFAT1-D mit der AP-2δ-TAD durch GST-Pulldown und anschließenden anti HA-Immunoblot. Als Negativkontrolle diente ein GST-Pulldown mit humanem Cyclin C.

Nach dem Blotten des Gels auf eine PVDF-Membran wurde das Gel mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop inkubiert. Die Signale im anti HA-Immunoblot zeigten, daß FoxG1 (31.7 kDa) und NFAT1-D (16.2 kDa) mit der AP-2δ-TAD interagieren (Abb. 52, GST+AP2δ-TAD). Die Negativkontrolle des humanen Cyclin C (33 kDa) konnte nur schwach in vitro translatiert werden und interagiert offensichtlich nicht mit der AP-2δ-TAD.

Anschließend wurde zum einen untersucht, ob die Interaktion spezifisch mit der Transaktivierungsdomäne von AP-2δ erfolgt und zum anderen, ob die potentiellen Interaktoren auch mit anderen AP-2 Proteinen interagieren. Dazu wurden neben der AP-2δ-TAD auch die AP-2δ-DBD, sowie die hAP-2α-TAD und die hAP-2α-DBD in den Vektor pGEX-3x kloniert. Die Fusionsproteine wurden nach der Transformation in BL21 E.coli Bakterien durch IPTG-Induktion exprimiert und aufgereinigt. Um die in vitro translatierten Protein-Fragmente der potentiellen Interaktoren bereits im SDS-Polyacrylamid-Gel detektieren zu können, wurden die Protein-Fragmente während der in vitro

Translation mit ^{35}S -Methionin markiert. Nach erfolgtem GST-Pulldown und SDS-PAGE wurden die Proteine durch das Schwenken des Gels in Fixierungslösung im Gel fixiert. Zur Verstärkung der radioaktiven Signale wurde das Gels zusätzlich in einer „Verstärker“-Lösung (Amplify™ Fluorographic Reagent) inkubiert. Nach erfolgtem Trocknen des Gels konnten die Proteine durch Autoradiographie mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

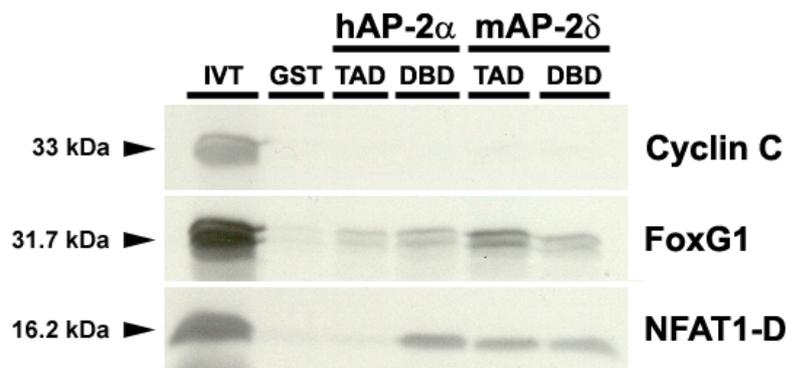


Abb. 53: GST-Pulldown mit GST-Fusionsproteinen der Transaktivierungsdomänen (TADs) und der DNA-Binde- und Dimerisierungsdomänen (DBDs) der AP2 Isoformen AP-2 α und AP-2 δ , inkubiert mit ^{35}S -markierten in vitro Translataten (IVT) von FoxG1, NFAT1-D und der Negativkontrolle hCyclin C. GST bezeichnet die Inkubation der in vitro Translatate mit der unfusionierten Glutathion-S-Transferase.

Die radioaktiven Signale auf dem Film konnten nach mehreren Tagen ausgewertet werden. NFAT1-D scheint neben der AP-2 δ -TAD ebenso an die AP-2 δ -DBD und an die AP-2 α -DBD zu binden, während FoxG1 am stärksten mit der AP-2 δ -TAD interagiert.

3.8 Analyse der AP-2 δ Expression in AP-2 β Mausmutanten

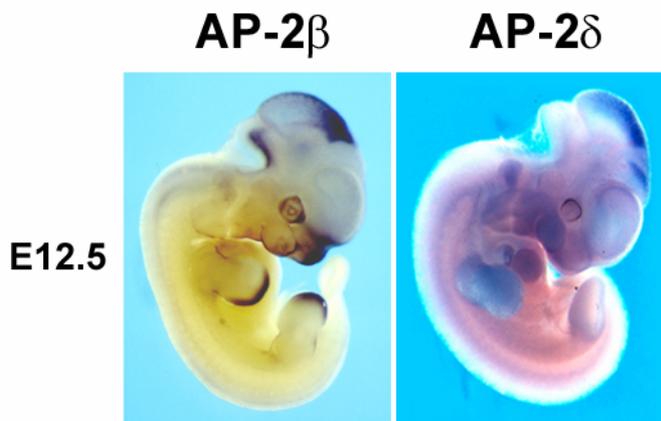


Abb. 54:

Überlappende Expression von AP-2 β und AP-2 δ im Mittelhirn. Whole mount in situ Hybridisierungen mit einer AP-2 β -spezifischen Probe (Abbildung zur Verfügung gestellt von PD Dr. M. Moser), sowie mit einer AP-2 δ -spezifischen Probe an C57Bl/6-Embryonen am Tag E12.5.

Die Expression von AP-2 β ist am Tag E12.5 im dorsalen Teil des Mittelhirns, dem Mittelhirndach, sowie im Hinterhirn zu beobachten. Dieses Expressionsmuster überlappt deutlich mit dem AP-2 δ Expressionsmuster, das ebenfalls im Mittelhirndach und schwach im Hinterhirn lokalisiert. Zudem wird AP-2 δ im Zwischenhirn exprimiert, wo keine AP-2 β Expression nachzuweisen ist. Aufgrund der überlappenden Expressionsmuster von AP-2 β und AP-2 δ stellt sich die Frage, ob der Verlust eines dieser beiden Gene Auswirkungen auf die Expression des anderen Gens hat. Whole mount in situ Hybridisierungen an 10 bis 12 Tage alten wildtyp- und AP-2 β -defizienten Embryonen mit einer AP-2 δ -spezifischen Probe zeigten, daß keine offensichtliche Veränderung im Expressionslevel von AP-2 δ in den Mittelhirnen von AP-2 β Mutanten vorliegt. Interessanterweise zeigten Hybridisierungen dieser Mausembryonen, daß in den AP-2 β Mutanten eine feine, AP-2 δ exprimierende Struktur im Hinterhirn fehlt. Weitere Untersuchungen müssen nun die Ursache für den Verlust der AP-2 δ Expression im Hinterhirn klären.

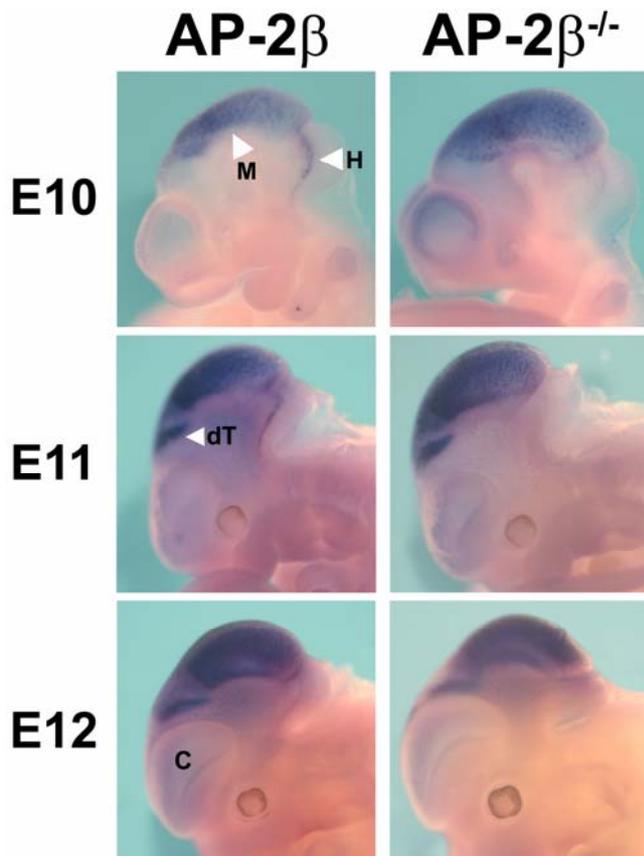


Abb. 55:

Whole mount in situ Hybridisierungen an 10 bis 12 Tage alten wildtyp- und AP-2β-defizienten Embryonen mit einer AP-2δ-spezifischen Probe. C Cortex; dT dorsaler Thalamus; H Hinterhirn; M Mittelhirn

Parallel zu den whole mount in situ Hybridisierungen wurde die Menge an AP-2δ-spezifischem Transkript im Mittelhirn von wildtyp- und AP-2β-defizienten Tieren vergleichend mit Hilfe eines Northern Blots untersucht. Dazu wurden die Mittelhirne von wildtyp-, AP-2β-heterozygoten und AP-2β-defizienten Mäusen präpariert und 15 µg der daraus präparierten RNA wurden geblottet. Nach der Hybridisierung mit der AP-2δ-spezifischen Probe ergab sich keine offensichtliche Veränderung des Expressionslevels von AP-2δ, was die Ergebnisse der in situ Hybridisierung bestätigte. (Abb. 56).

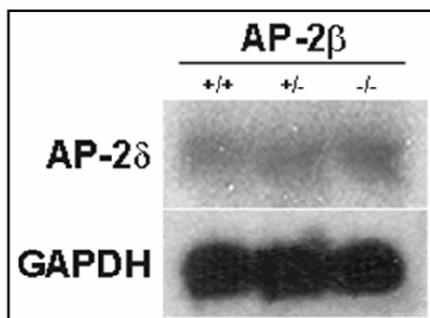


Abb. 56:

Northern Blot mit 15 µg RNA aus den Mittelhirnen von Wildtyp-, heterozygoten und AP-2β-defizienten Mäusen, hybridisiert mit einer AP-2δ-spezifischen Probe. Die anschließende erneute Hybridisierung der Membran mit einer GAPDH-spezifischen Probe diente dem Abgleich der aufgetragenen RNA-Mengen.

4 Diskussion

4.1 Expressionsmuster von AP-2 δ

Die Expression von AP-2 δ wurde mithilfe von RT-PCR Analysen, verschiedenen Methoden der in situ Hybridisierung und immunhistologischen Färbungen im embryonalen und im adulten Gewebe untersucht. Die Expression von AP-2 δ kann erstmalig mit der Differenzierung des Nervensystems nachgewiesen werden (Zhao et al., 2003). Im Gegensatz zu den Expressionsstudien von Zhao und Kollegen, die AP-2 δ erst am Tag E9.5 nachweisen konnten (Zhao et al., 2003), konnten unsere Studien AP-2 δ -spezifisches Transkript mithilfe der Methode der RT-PCR und einer anschließenden Southern Hybridisierung bereits am Tag E8.5 detektieren. Alle anderen AP-2 Isoformen werden dagegen bereits während der Implantation der Blastozyste in die Uterusschleimhaut, sowie in Trophoblasten- und ES-Zellen exprimiert (Chazaud et al., 1996; Moser et al. 1997b; Winger et al., 2006). Die vergleichsweise späte Expression von AP-2 δ läßt daher vermuten, daß die Funktion von AP-2 δ erst in der späteren Embryonalentwicklung wichtig wird.

Vergleiche mit den Expressionsmustern anderer AP-2 Isoformen zeigten, daß sich die Expression von AP-2 δ hauptsächlich auf das Zentralnervensystem beschränkt. Damit unterscheiden sich die spezifisch im Gehirn exprimierten Isoformen AP-2 δ und AP-2 ϵ wesentlich von den anderen AP-2 Isoformen, für die ein breites Expressionsspektrum in neuronalen Geweben, im Auge, Neuralleistenzellen, im Oberflächenektoderm, in der Haut, im Urogenitaltrakt, im Rückenmark und in den Extremitätenanlagen beschrieben wurde.

Genauere Analysen der AP-2 δ Expression ergaben, daß AP-2 δ beginnend mit dem Tag E10 der Embryonalentwicklung im dorsalen Mittelhirn und ab E11 auch im dorsalen Zwischenhirn nachgewiesen wird. Zusätzlich wird AP-2 δ ab dem Tag E14 der Embryogenese auch im neopallialen Cortex detektiert. Innerhalb des Mittelhirns ist im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung eine Verschiebung des Expressionsmusters von AP-2 δ in Richtung des posterioren Mittelhirns zu beobachten. Demgegenüber nimmt die Expression von AP-2 δ im anterioren Mittelhirn ab, sodaß AP-2 δ zum Ende der Embryogenese hauptsächlich im posterioren Mittelhirn, dem Colliculus inferior nachgewiesen werden kann. Ein derart dynamisches Expressionsmuster konnte für andere AP-2 Isoformen bisher nicht beschrieben werden.

Neben AP-2 δ werden auch AP-2 α und AP-2 β zu Beginn der Embryonalentwicklung im Mittelhirn exprimiert. Im weiteren Verlauf der Embryogenese differenzieren sich diese Expressionsmuster, sodaß AP-2 δ hauptsächlich im posterioren Teil des Mittelhirns exprimiert wird, während die Koexpression der drei Isoformen im dorsalen Teil des Mittelhirns bestehen bleibt. Demnach wird AP-2 δ als einzige AP-2 Isoform im posterioren Mittelhirn exprimiert. Ein Verlust von AP-2 δ wie in den AP-2 δ Nullmutanten kann in späteren Entwicklungsstadien dann nicht mehr durch andere AP-2 Isoformen ausgeglichen werden. So führt der Verlust von AP-2 δ in den posterioren Mittelhirnen AP-2 δ -defizienter Tiere am Tag E17 zu massiven apoptotischen Prozessen und zeigt daher, daß AP-2 δ in dieser Region offensichtlich entscheidend für das Überleben der Zellen verantwortlich ist.

Neben der Expression im Zentralnervensystem konnte AP-2 δ zusätzlich in der Retina detektiert werden. Außerdem wurde mithilfe der RT-PCR und einem anschließenden Southern Blot eine schwache Expression von AP-2 δ auch in der Blase und im Skelettmuskel nachgewiesen. Alle anderen untersuchten Organe zeigten dagegen keine Expression von AP-2 δ .

Da die Expression von AP-2 δ nur im embryonalen Gewebe, sowie im Gehirn adulter Mäuse untersucht wurde, konnte das Expressionsmuster von AP-2 δ in der Blase und im Skelettmuskel adulter Tiere bislang nicht von anderen Gruppen bestätigt werden. Expressionsstudien anderer AP-2 Isoformen konnten für AP-2 α und AP-2 β lediglich ein frühes Expressionsmuster in tubulären Strukturen des Mesonephros nachweisen (Mitchell et al., 1991; Moser et al., 1997b). Diese Strukturen differenzieren sich aus der Ureterknospe, dem caudalen Anteil des Wolff'schen Kanals, der in die Blase eintritt. AP-2 γ dagegen wurde zwischen dem Tag E11 und E13 der Embryogenese in Epithelien der embryonalen Harnröhre detektiert (Chazaud et al., 1996). Eine Expression von AP-2 Proteinen im Skelettmuskel oder dem Somitenmesoderm, aus dem sich die Skelettmuskulatur während der Embryogenese differenziert, konnte ebenfalls noch nicht beschrieben werden (Mitchell et al., 1991; Chazaud et al., 1996; Moser et al., 1997b).

Die vorliegenden Expressionsdaten stimmen mit Datenbank-basierten Expressionsanalysen, die mithilfe der nicht-redundanten EST-Datenbank „UniGene“ erhalten wurden, weitgehend überein. Jedoch konnten durch Datenbanken-basierte Expressionsanalysen zusätzliche Expressionsmuster von AP-2 δ in der Milz (EST-Klone BY764746.1, BY572702.1, BY568406.1, BY560457.1) und in der embryonalen Hypophyse (CB057840.1, BY668666.1) identifiziert werden. In situ Hybridisierungen, immunhistologische Färbungen und RT-PCR Analysen an verschiedenen Embryonalstadien und an adultem Gewebe konnten beide Expressionsmuster jedoch nicht bestätigen. Darüberhinaus konnte in der adulten Hypophyse, die von großem Interesse für die Analyse der Infertilität AP-2 δ -defizienter Weibchen ist, weder AP-2 δ -spezifisches Transkript, noch Transkripte anderer AP-2 Proteine nachgewiesen werden.

Parallel zur Expression im Gehirn am Tag E9.5 konnten Zhao und Kollegen zusätzlich eine starke Expression von AP-2 δ im embryonalen Herzen nachweisen (Zhao et al., 2003). Obwohl Embryonen des gleichen Entwicklungsstadiums mit derselben AP-2 δ -spezifischen Probe untersucht wurden, konnten unsere Expressionsanalysen dieses Expressionsmuster nicht reproduzieren.

Da von Herrn PD Dr. Moser AP-2 β Mausmutanten zur Verfügung gestellt wurden, konnte die Koexpression und eine mögliche funktionale Redundanz von AP-2 δ und AP-2 β im dorsalen Mittelhirn genauer untersucht werden. Embryonen, sowie Northern Blots mit Mittelhirn-RNA von wildtyp- und AP-2 β -defizienten Mäusen, die mit einer AP-2 δ -spezifischen Probe hybridisiert wurden, wiesen jedoch keine veränderte Expression von AP-2 δ in den Mittelhirnen AP-2 β -defizienter Tiere auf. Interessanterweise fehlt aber den AP-2 β Mausmutanten eine feine AP-2 δ -positive Struktur im Hinterhirn, was darauf hindeutet, daß der Verlust von AP-2 β dort nicht durch andere AP-2 Proteine, insbesondere nicht durch AP-2 δ ersetzt werden kann. Im Gegensatz dazu kann der Verlust von AP-2 β im Mittelhirn offensichtlich durch AP-2 δ oder AP-2 α , das ebenso im Mittelhirndach während der Embryonalentwicklung exprimiert wird, kompensiert werden.

Um die Kompensation von AP-2 β und AP-2 δ im Mittelhirn weiterhin zu untersuchen, wurde versucht AP-2 β /AP-2 δ Doppelmutanten zu generieren. Diese Doppelmutanten sollten einen schwereren Phänotyp zeigen, wenn eins der beiden Gene Auswirkungen auf die Expression des anderen hat und eine funktionelle Redundanz beider Isoformen vorliegt. Dazu waren jeweils heterozygote Tiere miteinander verpaart worden. Die doppelt-heterozygoten Nachkommen dieser Verpaarung wurden erneut miteinander verpaart, um ein Tier mit dem Genotyp AP-2 $\beta^{+/-}$ und AP-2 $\delta^{-/-}$ zu generieren. Da beide ko-Allele auf einem Chromosom liegen, ist ein Rekombinationsereignis erforderlich. Da beide Genloci jedoch nur durch ~43 kb getrennt sind, ist die Rekombinationseffizienz gering, sodaß der Erfolg der Verpaarungen ausblieb und die Verpaarungen abgebrochen wurden. Die notwendige Rekombination könnte durch die Elektroporation von AP-2 δ - oder AP-2 β -heterozygoten ES-Zellen mit einem AP-2 β , bzw. AP-2 δ „Targeting Vector“ ermöglicht werden.

4.2 Analyse der AP-2 δ Mausmutanten

4.2.1 Infertilität AP-2 δ -defizienter Weibchen

Das AP-2 δ Gen konnte erfolgreich durch konventionelles gene targeting inaktiviert werden, indem eine Selektionskassette in das erste kodierende Exon inseriert wurde. Die Mutation wurde durch homologe Rekombination stabil in das Genom der ES-Zellen integriert und durch die Keimbahn weitergegeben, sodaß homozygote AP-2 δ Mutanten generiert werden konnten. Im Gegensatz zu den Mausmodellen anderer AP-2 Mutanten, konnten AP-2 δ Mutanten die Embryogenese vollenden und zeigten keine erhöhte Sterblichkeit. Insgesamt entwickelten sich die AP-2 δ Mutanten nahezu normal, waren jedoch vor allem in den ersten drei Lebenswochen in ihrer Entwicklung verzögert und somit kleiner als die wildtyp-Tiere.

Nachdem Verpaarungen mit AP-2 δ -defizienten Weibchen ohne Nachkommen blieben, wurde die Fertilität der Weibchen untersucht. Eine Infertilitätssymptomatik konnte bei gleichaltrigen Männchen nicht festgestellt werden. Dies wurde durch morphologische Untersuchungen der Hoden, sowie der Leydig-, der Sertoli- und der Keimzellen AP-2 δ -defizienter Männchen unterstützt, die keine Veränderungen gegenüber Kontrolltieren aufwiesen (persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. R. Büttner, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn).

Erste Studien an AP-2 δ -defizienten Weibchen ergaben, daß sie in demselben Umfang wie Kontrolltiere „gepluggt“ werden und demnach von Männchen als paarungsbereit erkannt werden, was einen Hormonzyklus voraussetzt. Die Progression dieses Hormonzyklus erwies sich in AP-2 δ -defizienten Weibchen als verlängert, sodaß der gesamte Zyklus AP-2 δ -defizienter Weibchen gegenüber den Zyklen von Kontrolltieren um durchschnittlich 3 Tage verlängert war. Die Hormonzyklen AP-2 δ -defizienter Weibchen wiesen zudem Rückfälle in frühere Zyklusphasen auf.

Anschließende Superovulationsstudien ergaben, daß AP-2 δ -defiziente Weibchen befruchtungsfähige Oocyten bilden, die nach der Befruchtung zu Blastozysten heranreifen. Somit können AP-2 δ -defiziente Weibchen auf einen externen hormonellen Stimulus reagieren. Wurden jedoch die

Blastozysten unstimulierter Tiere gezählt, konnten nur in wenigen AP-2 δ Mutanten Blastozysten nachgewiesen werden. Diese Beobachtung kann durch die verzögerte Zyklus-Progression erklärt werden, die die Chance des einzelnen Tieres auf eine paarungsbereite Estrus-Phase reduziert. Die Ergebnisse der Superovulationsstudien zeigen zudem, daß ein externer hormoneller Stimulus den fehlregulierten Hormonzyklus AP-2 δ -defizienter Weibchen wieder ausgleichen kann. Somit können anschließend in einer erhöhten Anzahl AP-2 δ -defizienter Weibchen Blastozysten gefunden werden.

Neben der Bildung von Blastozysten wurden ebenfalls die Ovarien und die Uteri AP-2 δ -defizienter Mäuse untersucht, um mögliche morphologische Defekte dieser Organe als Ursache der weiblichen Infertilität zu identifizieren. Die Analysen der Ovarien und der Uteri von AP-2 δ Mutanten ergaben jedoch keine morphologischen Veränderungen gegenüber den Organen von Kontrolltieren. Somit kann eine hormonelle Störung vermutet werden, die jedoch nicht auf der Ebene des Ovars besteht, da AP-2 δ -defiziente Weibchen alle im Ovar ablaufenden Prozesse vollenden können: AP-2 δ -defiziente Weibchen bilden alle Follikelstadien aus, die zur Entstehung reifer Oocyten führen und auch in der Follikelanzahl unterschieden sich die Mutanten nicht von den Kontrolltieren. Reife Oocyten dieser Weibchen können nach erfolgter Ovulation in den Uterus eintreten. Die Befruchtung dieser Oocyten und die weitere Entwicklung der Zygote zur Blastozyste implizieren, daß bis zu diesem Zeitpunkt eine funktionale Blastozyste entwickelt wurde und ein Entwicklungsdefekt auf der Seite der Blastozyste somit nicht zu bestehen scheint. Außerdem gingen aus den Verpaarungen heterozygoter Tiere auch knockout Blastozysten hervor, was die Vermutung unterstützt, daß der Defekt auf der Seite der AP-2 δ -defizienten Weibchen liegt.

Da offensichtlich keine morphologischen Veränderungen zu der beobachteten Infertilität AP-2 δ -defizienter Weibchen führten und mit der verzögerten Zyklusprogression erste Hinweise auf eine mögliche hormonelle Störung gegeben waren, wurden die Hormonspiegel AP-2 δ -defizienter Weibchen untersucht. Immunhistologische Analysen an den Hypophysen neugeborener und adulter AP-2 δ -defizienter Mäuse zeigten jedoch reduzierte Expressionsspiegel für TSH und besonders für LH. Ebenso wurde die Expression von GnRH in der Eminentia mediana von AP-2 δ Mausmutanten immunhistologisch analysiert. Zellen der Eminentia mediana sezernieren GnRH, welches die Freisetzung von LH und FSH aus der Hypophyse reguliert. Die Untersuchungen konnten weder morphologische Veränderungen der Eminentia mediana nachweisen, noch wurde eine deregulierte GnRH Expression im Hypothalamus von AP-2 δ Mutanten beobachtet.

In den Hirnen von AP-2 α Mutanten dagegen wurde eine reduzierte GnRH Expression detektiert. Vermutlich wird die GnRH Expression jedoch nicht direkt durch AP-2 α reguliert, da im GnRH Promotor keine AP-2 Bindestelle nachgewiesen werden konnte (Kramer et al., 2000).

Die Sekretion von GnRH wird maßgeblich von Neuronen des Hypothalamus reguliert, die das *KiSS-1* Gen exprimieren (Gottsch et al., 2004). Durch die Prozessierung des KiSS-1 Peptids entstehen mehrere Genprodukte, die sogenannten Kisspeptine. Zwei dieser Kisspeptine, Kisspeptin 10 und 54 können zum einen indirekt über die Stimulation von GnRH, als auch direkt die Freisetzung von FSH und LH in der Hypophyse anregen (Gottsch et al., 2004). Neuere in vitro Studien an Brustkrebszellen zeigen, daß die *KiSS-1* Expression durch AP-2 α reguliert wird (Mitchell et al., 2006). Obwohl im *KiSS-1* Promotor einige AP-2 Bindestellen nachgewiesen werden konnten, erfolgt die Regulation nicht

über eine Bindung von AP-2 α an diese Bindestellen, sondern über die Bildung eines Sp1-AP2 Komplexes und die anschließende Bindung an eine Sp1 Bindestelle. Somit wirkt AP-2 α hier als Coaktivator der Sp1-vermittelten Transaktivierung von *KiSS-1*. Ein Fehlen von AP-2 α oder eine dominant-negative AP-2 Form resultiert in einer reduzierten *KiSS-1* Expression. Ob andere AP-2 Proteine, insbesondere AP-2 δ im Gehirn eine ähnliche Rolle für die Expression von *KiSS-1* und somit auch für die Regulation von GnRH spielen, ist derzeit noch unklar. Immunhistologische Studien konnten *KiSS-1* jedoch bereits im Thalamus, sowie im posterioren Mittelhirn von Rattenhirnen nachweisen (Brailoiu et al., 2005).

RT-PCR Analysen, die an RNA aus der Hypophyse, dem Ovar und dem Uterus von wildtyp-Tieren durchgeführt wurden, konnten keine Expression von AP-2 δ in diesen Geweben nachweisen. Daher scheint eine direkte AP-2 δ -vermittelte Störung der Fertilität AP-2 δ -defizienter Tiere in diesen Geweben nicht gegeben zu sein. Vielmehr ist eine hormonelle Regulation durch AP-2 δ denkbar, die auf diese Gewebe wirkt, wie die Ergebnisse der verzögerten Zyklusprogression und die Superovulationsstörungen zeigen. Eine Störung der hormonellen Regulation ist auch deshalb wahrscheinlich, da keine morphologischen Ursachen für die Infertilität vorliegen, wie morphologische Studien an den Ovarien, den Uteri, der Hypophysen und der Eminentia mediana zeigen.

Weiterführende Untersuchungen müssen sich zum einen auf die Morphologie der Uteri in Abhängigkeit von der Zyklus-Phase konzentrieren. Diese Untersuchungen könnten wichtige Hinweise auf eine hormonelle Störung liefern, falls AP-2 δ -defiziente Weibchen in bestimmten Zyklus-Phasen morphologische Veränderungen des Uterus aufweisen, die eine Trächtigkeit verhindern.

Zum zweiten sollten die Hormonspiegel verschiedener Hormone in Abhängigkeit von der Zyklus-Phase direkt mithilfe der Analyse des Serums von AP-2 δ Mutanten untersucht werden. So könnten Veränderungen der FSH- und LH-Spiegel im Blut AP-2 δ -defizienter Mäuse je nach Zyklus-Phase nachgewiesen werden. Zudem würden diese Messungen einen direkten Rückschluss auf die GnRH Sekretion ermöglichen.

Die serologischen Untersuchungen würden zudem auch zur Kontrolle von Hormonen dienen, die in den Ovarien sezerniert werden: Östrogene und Progesteron. Die Spiegel beider Hormone können im Serum der Mäuse, sowie im Gewebe der Ovarien ermittelt werden. Östradiol ist das häufigste Östrogen und wird von den Ovarien nach der Stimulation von FSH und LH sezerniert. LH stimuliert zum anderen auch die Sekretion von Progesteron aus den nach dem Eisprung entstehenden Corpora lutea. Östradiol und Progesteron wirken durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus hemmend auf den Hypothalamus und die weitere Sekretion von GnRH ein. Progesteron spielt dabei eine zentrale Rolle für die Vorbereitung des Uterus-Endometriums für eine bevorstehende Schwangerschaft: der Progesteron-Spiegel signalisiert der Blastozyste die Empfänglichkeit des Uterus und macht sie so kompetent für eine Einnistung. Ein kurzzeitig erhöhter Östrogen-Spiegel induziert anschließend die Implantation. Während niedrige Östrogen-Dosen das Zeitfenster für eine Implantation ausdehnen, führt eine über einen längeren Zeitraum erhöhte Östrogen-Konzentration zum Verlust der Empfänglichkeit (Paria et al., 1993; Ma et al., 2003; Wang und Dey, 2006).

Daher können die Messungen der Hormon-Konzentrationen im Serum neben morphologischen Untersuchungen des Uterus in Abhängigkeit von Zyklus-Phasen wichtige Informationen über den

Hormon-Haushalt von AP-2 δ Mausmutanten liefern. Zum anderen tragen diese Erkenntnisse entscheidend dazu bei, Vorgänge in der präimplantativen Phase und zu Beginn der Implantation der Blastozyste in das Uterus-Endometrium in AP-2 δ -defizienten Weibchen aufzuklären.

4.2.2 Untersuchungen des posterioren Mittelhirns AP-2 δ -defizienter Mäuse

Während der Embryonalentwicklung wird AP-2 δ hauptsächlich im Mittelhirn und im Zwischenhirn exprimiert. Im weiteren Verlauf der Entwicklung manifestiert sich die Expression von AP-2 δ im posterioren Mittelhirn. Daher konzentrierten sich unsere histologischen Analysen besonders auf diese Hirnbereiche. Histologische Analysen an Hirnen 3 und 6 Wochen alter AP-2 δ Mausmutanten wiesen morphologische Defekte im posterioren Mittelhirn nach: AP-2 δ -defizienten Mäusen fehlte das posteriore Mittelhirn, der Colliculus inferior. Da sich die Expression von AP-2 δ in adulten Mäusen im posterioren Mittelhirn konzentriert und deutlich von den AP-2 α und AP-2 β Expressionsmustern im dorsalen Mittelhirn abgrenzt, konnten immunhistologische Untersuchungen an Hirnschnitten von wildtyp- und AP-2 δ -defizienten Mäusen bestätigen, daß die AP-2 δ -exprimierende Struktur des posterioren Mittelhirns fehlt. Erste morphologische Veränderungen konnten bereits an isolierten Hirnen von Neugeborenen mithilfe von LacZ Färbungen beobachtet werden: während an heterozygoten Tieren noch eine klare, lokal begrenzte Färbung des posterioren Mittelhirns beobachtet werden konnte, wiesen Mutanten eine diffuse Verteilung der Färbung über den gesamten Bereich des Mittelhirns auf. Diese Beobachtung deutete bereits darauf hin, daß die AP-2 δ exprimierende Struktur des posterioren Mittelhirns nicht korrekt ausgebildet wird. Aus dieser Beobachtung ergab sich die Frage, ob das posteriore Mittelhirn während der Embryonalentwicklung AP-2 δ -defizienter Mäuse angelegt wird.

4.2.2.1 Anlage des Mittel-/Hinterhirnbereichs in AP-2 δ Mutanten

AP-2 δ wird während der Embryonalentwicklung im gesamten Mittelhirndach, vor allem aber auch im Bereich der Mittel-/Hinterhirngrenze exprimiert. Die Musterbildung in diesem Bereich erfolgt maßgeblich durch eine Struktur, die als Mittel-/Hinterhirn Organisator (MHO) bezeichnet wird. Dieses an der Grenzregion zwischen Mittel- und Hinterhirn gelegene Organisationszentrum regionalisiert das Mittelhirn und das anteriore Hinterhirn (Wurst und Bally-Cuif, 2001; Rhinn und Brand, 2001; Echevarria et al., 2003; Prakash und Wurst, 2004; Nakamura et al., 2005). Der MHO wird zum Ende der Gastrulation mit dem Beginn der anterioren Expression von *Otx2* und der posterioren Expression von *Gbx2* angelegt. Der Schnittpunkt beider Expressionsmuster markiert die zukünftige Position der Mittel-Hinterhirngrenze. Das Gewebe im Bereich der Mittel-Hinterhirngrenze, der sogenannte Isthmus spielt eine entscheidende Rolle für Musterbildungsprozesse im Mittelhirn und im anterioren Hinterhirn und bildet den Mittel-Hinterhirn Organisator (MHO). Inzwischen konnten in dieser Region spezifische Expressionsmuster für weitere Gene wie *Pax2*, *Pax5*, *En1*, *Fgf8* und *Wnt1* beschrieben werden. Die in den letzten Jahren generierten Mausmutanten der Markergene des Mittel-/Hinterhirn Bereichs

unterstreichen die essentielle Bedeutung dieser Gene für die Anlage und weitere Organisation des caudalen Mittelhirns und des rostralen Hinterhirns:

Dabei nimmt Fgf8 für die Organisation des Mittel-/Hinterhirnbereichs eine Schlüsselrolle ein. Die Expression von Fgf8 wird durch Pax2 im MHO induziert (Pfeffer et al., 2000; Ye et al., 2001). Die ektopische Expression von Fgf8 ahmt die Aktivität des MHOs nach, indem Fgf8 im Empfängergewebe Isthmus-ähnliche Strukturen und Genexpressionsmuster der Mittel-/Hinterhirngrenze induziert (Crossley et al., 1996; Liu et al., 1999; Martinez et al., 1999). Fgf8 wird im Isthmusgewebe exprimiert und wirkt zum einen auf das rostrale Hinterhirn, indem Fgf8 die Differenzierung des Cerebellums induziert. Nachdem die konstitutive Deletion des *Fgf8* Gens zum Tod der Fgf8 Mutanten führte (Moon und Capecchi, 2000), konnte die zentrale Rolle von Fgf8 für die Organisatorregion mithilfe einer konditionalen Inaktivierung von Fgf8 durch Kreuzung mit *En1^{Cre/+}* Mäusen nachgewiesen werden: die Fgf8 Defizienz führte zum Verlust des gesamten Mittelhirns und des anterioren Hinterhirns aufgrund von Apoptose (Chi et al., 2003). Die essentielle Rolle von Fgf8 für diese Region wird durch den Phänotyp von Pax2 Mutanten unterstrichen: der Verlust von funktionalem Pax2 führt in Pax2 Mutanten zu einem kompletten Verlust des Isthmus, da die Expression von Fgf8 nicht mehr induziert werden kann (Favor et al., 1996).

Otx2 wird im embryonalen Vorderhirn und im Mittelhirn exprimiert, während Gbx2 im Hinterhirn gebildet wird. Während die ektopische Expression von Otx2 im Hinterhirn transgener Mäuse durch die Repression von Gbx2 zur Vergrößerung des Mittelhirns führte (Broccoli et al., 1999), wurde eine Verkleinerung des Mittelhirns durch die ektopische Expression von Gbx2 im Mittelhirn und die damit verbundene Repression von Otx2 beobachtet (Millet et al., 1999). Obwohl das angrenzende caudale Mittelhirn ebenso durch Fgf8 beeinflusst wird, wird eine Induktion von Kleinhirnstrukturen im Mittelhirn durch die Expression des anterioren Otx2 verhindert (Martinez et al., 1999). Otx2-defizienten Mäusen fehlt das Vorderhirn, das Mittelhirn und das rostrale Hinterhirn (Acampora et al., 1995; Matsuo et al., 1995), während Gbx2-defiziente Mäuse Fehlbildungen des Isthmus und der caudalen Ausdehnung des Mittelhirns zeigen (Wassarman et al., 1997; Kikuta et al., 2003).

Wnt1 wird zunächst im gesamten Mittelhirn exprimiert, die Expression beschränkt sich später aber auf das posteriore Mittelhirn und die Grundplatte. Wnt1-defizienten Mäusen fehlt das Mittelhirn und das rostrale Hinterhirn (McMahon et al., 1992).

Engrailed- und Pax-Gene werden im embryonalen Mittelhirn und im rostralen Hinterhirn exprimiert und sind für den Aufbau und den Erhalt des MHOs verantwortlich. En1-defizienten Mäusen fehlen die dorsalen und ventralen Anteile des Mittelhirns und des rostralen Hinterhirns (Wurst et al., 1994). Demgegenüber zeigen En2-defiziente Mäuse lediglich geringe Defekte im Cerebellum (Millen et al., 1994). Doppelmutanten fehlt das komplette Mittel- und das komplette Hinterhirn (Liu und Joyner, 2001).

Einen vergleichsweise milden Phänotyp zeigen Pax5-defiziente Mäuse mit partiellen Deletionen des posterioren Mittelhirns und einem leicht vergrößertem Cerebellum (Urbanek et al., 1994). Doppelmutanten für Pax2 und Pax5 fehlt das Mittelhirn und das Cerebellum vollständig (Schwarz et al., 1997; Bouchard et al., 2000).

Ein Vergleich des Phänotyps der AP-2 δ Mutanten mit den Mausmutanten der Markergene des MHOs zeigt, daß der Defekt der AP-2 δ Mausmutanten im Mittelhirn am ehesten mit dem Phänotyp der Pax5-defizienten Mäuse verglichen werden kann:

Obwohl Pax5 bereits am Tag E8.5 im Neuroepithel exprimiert wird, zeigten Pax5 Mutanten erste Entwicklungsdefekte im posterioren Mittelhirn erst am Tag E16.5 der Embryonalentwicklung (Urbanek et al., 1994). Ein ähnliches embryonales Expressionsmuster konnte für AP-2 δ beschrieben werden, das ebenfalls erstmals am Tag E8.5 detektiert wird. Apoptotische Veränderungen im posterioren Mittelhirn treten zwischen Tag 15 und 17 der Embryonalentwicklung auf, woraus anschließend ein morphologischer Defekt des posterioren Mittelhirns resultiert.

Die Größe des Colliculus inferior war in Pax5 Mutanten auffallend reduziert, was jedoch nicht auf einer veränderten Zusammensetzung der Zellpopulationen im Colliculus inferior, sondern vielmehr auf Defekten in der Anlage der gesamten Struktur beruhte. Diese Beobachtung unterscheidet Pax5 von AP-2 δ Mutanten klar, da sich infolge der Apoptose der AP-2 δ -exprimierenden Zellen die Zusammensetzung der Zellen im posterioren Mittelhirn verändert.

Expressionsmuster anderer Markergene des Isthmus wurden an Pax5, sowie an Pax2/Pax5 Doppelmutanten jedoch nicht untersucht, sodaß der weitere Effekt von Pax5 auf die Expression dieser Markergene und damit zusammenhängende Regionalisierungsprozesse im Mittel-/Hinterhirnbereich nicht aufgeklärt wurde. Neben dem ausgeprägten Hirn-Phänotyp weisen Mutanten beider Proteine auch eine verminderte Größe und eine Gewichtsreduktion auf, die für Pax5 Mutanten in der Mehrzahl der Fälle nach dem Absetzen aufgrund eines schweren Entwicklungsdefekts von B-Lymphozyten zum Tod führt. Abweichend von dem Phänotyp der Pax5 Mutanten zeigten AP-2 δ -defiziente Tiere keine Verhaltensauffälligkeiten wie ein verkrampftes Umklammern des Rumpfes beim Aufnehmen der Tiere am Schwanz (*clasp*ing). Urbanek und Kollegen berichten außerdem über ein vergrößertes Cerebellum mit einer veränderten Faltung der einzelnen Foliae, im Gegensatz dazu konnten Mißbildungen des Cerebellums in Hirnen AP-2 δ -defizienter Tiere nicht beobachtet werden.

Die Anlage des MHOs in den Mittel-/Hinterhirn Bereichen AP-2 δ -defizienter Mäuse wurde mithilfe von whole mount in situ Hybridisierungen an 10 Tage alten Embryonen mit den Markergenen des Isthmus untersucht. Die whole mount in situ Hybridisierungen zeigten jedoch keine Veränderung der Expressionsmuster in den Mittel-/Hinterhirn Bereichen der AP-2 δ Mutanten. Daher hat der Verlust von AP-2 δ vermutlich keinen Einfluß auf die Entstehung des Mittel-/Hinterhirnbereichs, sodaß eine korrekte Anlage des posterioren Mittelhirns in AP-2 δ Mutanten angenommen wird. Somit scheinen Pax5 und alle weiteren Markergene eine wichtige Rolle für die Anlage des posterioren Mittelhirns zu spielen, während AP-2 δ zu einem späteren Zeitpunkt für die Erhaltung dieser Struktur entscheidend ist (siehe unten).

4.2.2.2 Apoptotische Veränderungen im posterioren Mittelhirn von AP-2 δ Mutanten

Nachdem im Mittel-/Hinterhirnbereich der AP-2 δ Mutanten offensichtlich kein Defekt in der Anlage vorlag, wurde untersucht, ob der Verlust von AP-2 δ im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung zur Degradation dieser Hirnregion führt. Immunhistologische Analysen an coronalen Hirnschnitten 13, 15

und 17 Tage alter Embryonen und neugeborener Mäuse (P0) zeigten, daß einzelne apoptotische Kerne bereits am Tag E15 im Bereich des posterioren Mittelhirns detektiert werden können. Das massive Einsetzen apoptotischer Prozesse wurde am Tag E17 nachgewiesen und war auch in den Hirnen neugeborener Mäuse noch festzustellen. Somit scheint AP-2 δ für den Erhalt des posterioren Mittelhirns eine essentielle Rolle zu spielen und sichert das Überleben der Zellen in dieser Struktur. Immunhistologische Analysen dieser Hirne zeigten, daß AP-2 α , AP-2 β und AP-2 δ im Mittelhirn koexprimiert werden. Diese Koexpression beschränkt sich jedoch auf den dorsalen Bereich des Mittelhirns und ist nicht im Colliculus inferior zu beobachten. Da AP-2 δ somit als einzige AP-2 Isoform im Colliculus inferior exprimiert wird, kann ein Verlust durch andere Isoformen funktionell nicht kompensiert werden, woraus ein apoptotischer Zelltod in diese Struktur resultiert.

Damit schließt sich das AP-2 δ Mausmodell den anderen AP-2 Mausmutanten an: in allen bisher beschriebenen knockout Phänotypen der AP-2 Transkriptionsfaktoren konnten an dem jeweiligen Hauptexpressionsort apoptotische Prozesse nachgewiesen werden, wenn der Verlust der jeweiligen AP-2 Isoform nicht durch andere AP-2 Proteine kompensiert werden konnte.

Moser und Kollegen konnten in RT-PCR Analysen mit Nierengewebe AP-2 β -defizienter Mäuse eine reduzierte Expression anti-apoptotischer Gene der Bcl-2 Familie feststellen (Moser et al., 1997a). Um einen ähnlichen molekularen Mechanismus für den massiven Zelltod im posterioren Mittelhirn von AP-2 δ Mutanten zu identifizieren, müßten nun in weiterführenden Experimenten RT-PCR und real time PCR Analysen mit pro- und anti-apoptotischen Genen, wie *Bax*, *Bcl-2*, *Fas*, *Bcl-xl*, *Bad*, *c-Myc* und *Bcl-w* durchgeführt werden.

Neben apoptotischen Prozessen muß weiterhin untersucht werden, ob eventuell Störungen der Zellproliferation oder -migration in den Mittelhirnen von AP-2 δ Mutanten vorliegen, die z. B. aufgrund von unzureichenden Zell-Zell-Kontakten zur Apoptose führen. Die hauptsächliche Proliferations- und Migrationsphase des murinen Gehirns umfaßt den Zeitraum zwischen E12.5 bis E17.5 der Embryogenese und besonders den Zeitpunkt der Geburt, sowie anschließende neuronale Migrationsprozesse der Ventrikularzone (Chenn et al., 1997). Dieser Aspekt kann mit Ki-67 und CyclinD1-spezifischen immunhistologischen Färbungen an verschiedenen Embryonalstadien analysiert werden. Ebenso können proliferierende Zellen in den Hirnen nach einer BrdU Inkorporation und anschließender BrdU-Färbung nachgewiesen werden.

4.2.3 Untersuchungen des Thalamus AP-2 δ -defizienter Mäuse

Analysen in anderen Hirnbereichen AP-2 δ -defizienter Mäuse, wie dem Thalamus und dem Cortex ergaben, daß dort lediglich vereinzelt in einigen Zellkernen apoptotische Prozesse beobachtet werden konnten. Eine mögliche Kompensation des Verlustes von AP-2 δ durch andere AP-2 Isoformen, die ebenfalls während der Embryonalentwicklung im Thalamus und im Cortex exprimiert werden, wurde mithilfe von immunhistologischen Färbungen untersucht. Diese Koexpressionsstudien mit AP-2 α , AP-2 β , AP-2 γ und AP-2 δ -spezifischen Antikörpern zeigten, daß der Verlust von AP-2 δ auch im

Thalamus nicht durch andere Isoformen kompensiert werden kann, da AP-2 α und AP-2 β im Vergleich mit AP-2 δ in einer dorsaleren Region des Thalamus, dem Epithalamus exprimiert werden.

Aufgrund fehlender apoptotischer Prozesse im dorsalen Thalamus scheint AP-2 δ in dieser Hirnregion nicht für das Überleben der Zellen verantwortlich zu sein. Es ist vielmehr möglich, daß AP-2 δ im dorsalen Thalamus z.B. für Differenzierungsprozesse von Bedeutung sein könnte. Im Thalamus werden einige Transkriptionsfaktoren wie Emx2, Tbr1, Gbx2, Mash1, Pax6, Nkx2.1 und Ebf1 exprimiert, die für die Regulation thalamo-corticaler Entwicklungsprozesse verantwortlich sind (Lopez-Bendito und Molnar, 2003). Mausmutanten einiger dieser Transkriptionsfaktoren weisen schwere Defekte im zielgerichteten Auswachsen der Axone von Neuronen des Thalamus auf. So können Axone der thalamischen Neurone Gbx2-, Mash1-, sowie Pax6-defizienter Mäuse den Cortex nicht mehr innervieren (Tuttle et al., 1999; Hevner et al., 2002; Jones et al., 2002). Ebenso ist die reziproke corticofugale Projektion Neurone in Tbr1, Emx2, Pax6 und Gbx2 Mutanten gestört. Eine ähnliche Störung der corticofugalen Projektion konnte in Nkx2.1 Mutanten beobachtet werden: durch verlängerte Axone werden fälschlicherweise Regionen wie der ventrale Cortex und der Hypothalamus innerviert (Marin et al., 2002). In Ebf1 Mutanten ist dagegen eine Verlagerung thalamo-corticaler Axone in einen caudalen Bereich des Neocortex zu beobachten, sodaß eine Projektion in der Zielregion, dem visuellen Cortex ausbleibt (Garel et al., 2002).

Eine Beeinflussung thalamo-corticaler Prozesse durch AP-2 δ könnte mithilfe von Tracer-Experimenten nachgewiesen werden. Neuroanatomische Prozesse wie z.B. die Projektionen verschiedener Neuronenpopulationen könnten mithilfe von Tracer-Experimenten in vivo analysiert werden.

4.2.4 Untersuchungen der Retina von AP-2 δ Mausmutanten

Neben der Expression im Zentralnervensystem kann AP-2 δ während der Embryonalentwicklung ebenfalls in der Ganglion-Zellschicht der embryonalen Retina, sowie schwach im Linsenkörper nachgewiesen werden. Zhao und Kollegen konnten AP-2 δ zwar ebenso in der murinen Retina nachweisen, das Expressionsmuster wurde aber nicht genauer eingegrenzt (Zhao et al., 2003). Die Expression in der embryonalen Linse konnte von Zhao und Kollegen nicht bestätigt werden.

Doppel-Immunfluoreszenzen an Retinaschnitten mit AP-2 δ und anderen AP-2 Isoformen zeigten, daß AP-2 α und AP-2 β mit AP-2 δ nur in geringem Ausmaß in der Ganglion-Zellschicht koexprimiert werden. Zelltod-Analysen ergaben keine vermehrte Apoptose in der Ganglion-Zellschicht. Da Oulad-Abdelghani und Kollegen auch AP-2 γ in der Ganglion-Zellschicht nachweisen konnten (Oulad-Abdelghani et al., 1996), könnte AP-2 γ den Verlust von AP-2 δ in der Ganglion-Zellschicht von AP-2 δ Mutanten ausgleichen und somit den ausbleibenden Zelltod in der Ganglion-Zellschicht erklären. Zum anderen könnte AP-2 δ in der Retina auch eine ganz andere Funktion ausüben, als die bisher im posterioren Mittelhirn beschriebene Funktion als „Überlebensfaktor“. Daher muß überprüft werden, ob AP-2 δ eventuell für die Differenzierung von Zellen in der Retina bedeutsam ist.

Eine Beteiligung von AP-2 Proteinen an der Regulation zellulärer Differenzierungsprozesse in der inneren Kernschicht wurde bereits an den Retinas von Hühner-Embryos nachgewiesen (Bisgrove und Godbout, 1999). Die bislang im Huhn nachgewiesenen AP-2 Isoformen AP-2 α und AP-2 β werden in der inneren Kernschicht der embryonalen Retina Zell-spezifisch exprimiert: während sich die Expression von AP-2 α auf Amakrinzellen beschränkt, wird AP-2 β neben Amakrinzellen auch in Horizontalzellen exprimiert. AP-2 α und AP-2 β scheinen dabei nicht an der Spezifizierung von Zelllinien der Retina mitzuwirken, da sie erst nach dieser Phase exprimiert werden. Vielmehr tragen AP-2 α und AP-2 β anschließend dazu bei, die Richtungen für frühe Differenzierungsprozesse in Amakrin- und in Horizontalzellen festzulegen.

4.3 Interaktionspartner von AP-2 δ

AP-2 Transkriptionsfaktoren können nicht direkt mit der basalen Transkriptionmaschinerie interagieren, sondern initiieren die Transkription von Zielgenen über die Interaktion mit Coaktivatoren. Da AP-2 δ im Vergleich mit anderen AP-2 Isoformen über eine veränderte Transaktivierungsdomäne verfügt, in der einige zentrale Motive modifiziert sind oder fehlen, interagiert AP-2 δ vermutlich auch mit anderen Coaktivatoren. Potentielle Coaktivatoren wurden mithilfe eines Yeast-Two Hybrid Interaktionsscreens identifiziert, der auf dem Screening einer Hirn-cDNA-Bank adulter Mäuse mit einem Köderprotein basiert. Als Köderprotein (bait) wurde die AP-2 δ Transaktivierungsdomäne (AP-2 δ -TAD) verwendet. Das Fusionsprotein aus der AP-2 δ -TAD und der Gal4-DNA-Bindedomäne, das durch die Subklonierung der AP-2 δ -TAD in einen bait-Vektor entsteht, gleicht funktional einem Transkriptionsfaktor. Die Autoaktivität dieses Konstrukt konnte durch kontrolliertes Wachstum auf einem speziellen Selektionsmedium ausgeschlossen werden. Die im anschließenden Screen eingesetzte cDNA-Bank aus dem Hirn adulter Mäuse (prey-Vektor) wurde unter optimierten Transformationsbedingungen 17-fach gescreent. Die Anzahl der erhaltenen Klone wurden mithilfe von Retransformationen, X-Gal Filter Assays, Autoaktivitäts-Screens und der Sequenzierung der enthaltenen cDNA-Fragmente auf 38 potentielle Interaktoren eingegrenzt, deren enthaltene cDNA im korrekten Leserahmen des prey-Vektors orientiert war. Davon wurden 10 potentielle Interaktoren aufgrund ihrer Eigenschaft als Transkriptionsfaktoren oder aufgrund ihrer Beteiligung an apoptotischen und anderen degradativen Prozessen ausgewählt.

Zwei potentiellen Interaktoren, FoxG1 und NFAT1-D, wurden zunächst genauer analysiert, da es sich um Transkriptionsfaktoren handelt, die zudem spezifisch im Gehirn exprimiert werden. Der Transkriptionsfaktor FoxG1, der auch als brain factor-1 (BF-1) bezeichnet wird, wird bereits während der frühen Embryonalentwicklung von Zellen des rostralen Neuralrohrs exprimiert, welches im weiteren Verlauf der Entwicklung das Telencephalon bildet. Die Inaktivierung von FoxG1 in der murinen Keimbahn führt während der Geburt zum Tod der Mutanten. Eine Analyse der Mutanten ergab verkleinerte cerebrale Hemisphären (Xuan et al., 1995). Ein derartiger Phänotyp konnte bei AP-2 δ Mutanten nicht nachgewiesen werden.

Der Transkriptionsfaktor NFAT1-D (novel nuclear factor of activated T-cells-1) wurde erstmalig 2001 beschrieben und im Gehirn nachgewiesen (Plyte et al., 2001), wurde später jedoch in einigen

Datenbanken als Synonym für *Nfatc2* und *NFATp* aufgeführt. Expressionsstudien wiesen *NFATp* in T-Zellen der Milz und ebenfalls im Gehirn, besonders im olfaktorischen Epithel nach (Ho et al., 1994). In *Nfatc2*-, bzw. *Nfatp*-defizienten Mäusen konnte bisher noch kein Hirn-assoziiertes Phänotyp nachgewiesen werden. Lediglich Defekte, die das Immunsystem betreffen, wie eine erhöhte IL-4 Expression, hyperproliferative B- und T-Zellen konnten beobachtet werden (Hodge et al., 1996; Tsytsykova und Goldfeld, 2000).

Um die Interaktionen von *FoxG1* und *NFAT1-D* mit *AP-2δ* zu verifizieren, wurden zunächst GST-Pulldown Assays durchgeführt. Diese konnten die Interaktion der Peptidfragmente der beiden potentiellen Interaktoren mit der Transaktivierungsdomäne von *AP-2δ* bestätigen. Beide Peptidfragmente können aber auch mit der *AP-2δ*-DNA-Bindedomäne interagieren. Darüberhinaus binden beide Fragmente auch schwach an die DNA-DBD von *AP-2α*. In einem nächsten Schritt muß daher die Interaktion der vollständigen cDNAs mit *AP-2δ* und auch mit anderen *AP-2* Isoformen mithilfe von GST-Pulldowns und Co-Immunopräzipitationen untersucht werden.

Die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren wurde mithilfe von whole mount in situ Hybridisierungen untersucht. Eine *FoxG1*-spezifische antisense Probe aus dem 3'-untranslatierten Bereich der cDNA konnte die Expression von *FoxG1* im Telencephalon bestätigen. Ebenso wurde versucht, die Expression von *NFAT1-D* im Gehirn genauer zu studieren. Die dazu generierte antisense Probe aus dem 3'-untranslatierten Bereich der *NFAT1-D* mRNA konnte bisher jedoch kein spezifisches Signal im Gehirn 10 Tage alter Embryonen nachweisen. Die von Plyte und Kollegen beschriebene Probe zur Identifizierung von *NFAT1-D* im Gehirn umfaßte eine nicht genauer beschriebene Sequenz ebenfalls aus dem 3'-Bereich der mRNA. In folgenden Experimenten muß daher die Expression von *NFAT1-D* zu späteren Zeiten der Entwicklung im Gehirn untersucht werden, oder - falls dies nicht gelingt - eine neue *NFAT1-D*-spezifische antisense Probe generiert werden. Die Expressionsmuster, die mit dieser Probe für *NFAT1-D* nachgewiesen werden, muß anschließend auch mit den Expressionsdaten für *Nfatc2* und *Nfatp* verglichen werden.

Die Expression der Interaktoren sollte zudem auch mithilfe von immunhistologischen Methoden an Gewebeschnitten von Mäusen nachgewiesen werden.

In einem nächsten Schritt sollte die Interaktion zudem auch in einem Zellkultur-basierten System nachgewiesen werden, um die Interaktion nicht nur in Hefezellen, sondern auch in Säugerzellen nachweisen zu können. Dazu bietet sich ein Mammalian-Two Hybrid an. Zudem sollte auch in einem Zellkultur-basierten System durch Kotransfektionsstudien und anschließender Immunfluoreszenz gezeigt werden, daß die Transkriptionsfaktoren im Zellkern lokalisiert sind und auch im Kern miteinander interagieren. Zudem kann für *NFAT1-D* und *AP-2* Proteine auch eine Kolo-kalisation im Cytoplasma nachgewiesen werden, da cytoplasmatisch lokalisierte *NFAT* Proteine zunächst im Cytoplasma durch Calcineurin aktiviert werden, bevor sie in den Kern gelangen (Graef et al., 2001). Auch *AP-2* Proteine können unter bestimmten Umständen im Cytoplasma vorliegen, z.B. aufgrund einer cytoplasmatischen Retention infolge der Interaktion mit bestimmten Coaktivatoren (Mazina et al., 2001; Aqeilan et al., 2004; Popa et al., 2004).

Weitere Ansätze für Analysen der Interaktion bestehen zum einen in der Identifizierung der interagierenden Domänen durch verschiedene Mutations- und Deletionskonstrukte der potentiellen Interaktoren. Um die interagierenden Domänen von *AP-2δ* und den jeweiligen Kofaktoren genauer zu

charakterisieren, müssen verschiedene Mutations- und Deletionskonstrukte der Kofaktoren in Luciferase-Reporterassays auf ihre Fähigkeit getestet werden, die transkriptionelle Aktivität von AP-2 δ zu regulieren.

4.4 Ausblick

4.4.1 Analyse von Hörstörungen mithilfe von AP-2 δ Mausmutanten

Das Mittelhirn gliedert sich dorsal in das Mittelhirndach (Tectum) mit der Vierhügelplatte (Corpora quadrigemina), die sich in zwei paarig angeordnete Hügel gliedert, den anterioren Colliculi superiores und den posterioren Colliculi inferiores. Der anteriore Colliculus superior spielt eine wesentliche Rolle für die Verarbeitung von Sehprozessen, während der posteriore Colliculus inferior der Hörverarbeitung dient.

Der Colliculus inferior kann anatomisch in drei Regionen, den zentralen Nucleus, den lateralen Nucleus und den dorsalen Cortex unterteilt werden (Meininger et al., 1986). Der zentrale Kern des Colliculus inferior ist aus übereinanderliegenden Schichten von neuronalen Zellen aufgebaut, die miteinander über multipolare Zellen verknüpft sind. Elektrophysiologische Ableitungen konnten nachweisen, daß Neurone mit einer ähnlichen charakteristischen Frequenz in einer Isofrequenzebene angeordnet sind, d.h. alle Neurone einer Schicht (Isfrequenzebene) besitzen eine ähnliche Frequenz (Ryan und Miller, 1978). Aufsteigende Afferenzen, die in den Hirnstammkernen bereits vorverarbeitet wurden, kommen im zentralen Kern des Colliculus inferior an und können durch den laminaren Aufbau des zentralen Kerns getrennt nach der jeweiligen Frequenz in den einzelnen Schichten parallel weiterverarbeitet werden. Der laminare Aufbau des Colliculus inferior ermöglicht somit die Auflösung eines komplexen akustischen Signals in einzelne Frequenzkomponenten. Vom Colliculus inferior aus werden Efferenzen auf den Corpus geniculatum mediale im Thalamus projiziert. Efferente Fasern des Thalamus wiederum innervieren den auditorischen Cortex (Gyrus temporalis superior). Diese thalamo-corticalen Verbindungen sind reziprok, sodaß vom auditorischen Cortex Efferenzen zum Thalamus ausgesendet werden (Hofstetter und Ehret, 1992). Ebenso erhält der Colliculus inferior Rückprojektionen vom auditorischen Cortex (Oliver und Huerta, 1992). Daher stellt der Colliculus inferior ein wichtiges auditorisches Integrationszentrum für Signale vom Thalamus und vom auditorischen Cortex dar.

Neueste Studien stellen diese zentrale Funktion des Colliculus inferior als obligate Schaltstelle afferenter Fasern vom Nucleus cochlearis zum Corpus geniculatum mediale im Thalamus in Frage. Bereits Malmierca und Kollegen konnten 2002 an Ratten zeigen, daß eine direkte Verbindung zwischen dem dorsalen Nucleus cochlearis und dem Thalamus besteht (Malmierca et al., 2002), wie es bereits von Strominger und Kollegen 1977 an Versuchen mit Schimpansen postuliert wurde (Strominger et al., 1977). So konnten Anderson und Kollegen diese Verbindung auch an Meerschweinchen durch elektrophysiologische Untersuchungen und Tracer-Experimente bestätigen (Anderson et al., 2006). Diese verkürzte Verbindung unter Umgehung des Colliculus inferior resultierte in verkürzten Reaktionszeiten von Thalamus-Neuronen auf akustische Stimulationen. Die Funktion

dieser verkürzten Reaktionszeiten ist noch unklar, spielt wahrscheinlich aber eine wichtige Rolle für die Vorbereitung von Prozessen in bestimmten Hirnarealen, wie der Vorbereitung des auditorischen Cortex auf die schnelle Analyse von sensorischen Informationen oder die Vorbereitung der Amygdala auf schnelle emotionale Antworten wie Furcht. AP-2 δ -defiziente Mäuse könnten somit ein geeignetes Model darstellen, um zum einen diese direkte Verbindung zwischen dem dorsalen Nucleus cochlearis und dem Thalamus in Mäusen nachzuweisen und zum anderen die Funktion dieser Verbindung genauer analysieren zu können.

Mit Pax5 und Foxb1 Mausmutanten konnten zwei Mausmodelle beschrieben werden, die aufgrund verkleinerter Colliculi inferiores in der Entwicklung des Hörsystems verzögert sind (Urbanek et al., 1994; Reimer et al., 1996; Wehr et al., 1997). Während sich das Expressionsmuster von AP-2 δ und von Pax5 im Mittel-Hinterhirn Bereich weitgehend überlagert, wird Foxb1 abweichend von AP-2 δ nicht streifenförmig im dorsalen Teil des Mittelhirns exprimiert, sondern nur in einer rostralen und in einer caudalen Zellpopulation (Wehr et al., 1997). Foxb1 wird zwar auch im caudalen Mittelhirn, sowie im angrenzenden Hinterhirn exprimiert, eine klare Expression in der Region des Isthmus konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Pax5 und Foxb1 Mausmutanten zeigten einen milden Phänotyp im posterioren Mittelhirn mit einem verkleinerten Colliculus inferior im Vergleich zum kompletten Verlust des posterioren Mittelhirns in AP-2 δ -defizienten Mäusen. Diese milden Phänotypen führen lediglich zu einer verzögerten Entwicklung des Hörzentrums. Im Gegensatz dazu könnte bei AP-2 δ -defizienten Mäusen jedoch eine weitaus schwerere Hörstörung zu erwarten sein, da es im Verlauf der weiteren postnatalen Entwicklung aufgrund des Zelltods im posterioren Mittelhirn zum kompletten Verlust dieser Struktur kommt.

Mögliche Defekte des Hörvermögens AP-2 δ -defizienter Mäuse können zum einen durch Untersuchungen an den Hörzentren im Gehirn, sowie durch Analysen der Cochlea und der Mittel- und Innenohrbereiche identifiziert werden. Da eine Expression von AP-2 δ in der Cochlea und den Mittel- und Innenohrbereichen nicht nachgewiesen wurde, müssen sich weitere Untersuchungen auf die Hörzentren im Gehirn konzentrieren. Analysen, die die Hörfunktion der Hörzentren im Gehirn untersuchen, umfassen zum einen immunhistologische Studien mit einem Fos-spezifischen Antikörper am Colliculus inferior und am auditorischen Cortex, sowie Tracer-Experimente mit Carbocyanin-Farbstoffen. Weiterhin kann ein Aktivitätsverlust von Neuronen des Colliculus inferior auch mithilfe ¹⁴C-markierter 2-Desoxyglucose und Manganese-enhanced MRI (MEMRI) nachgewiesen werden.

Da die AP-2 δ -defizienten Mäuse keinen einheitlichen genetischen Hintergrund besitzen, müssen Rückkreuzungen mit C57Bl/6 Weibchen zur Vereinheitlichung des Genpools durchgeführt werden. So sollte nach 10 Rückkreuzungen mit C57Bl/6 Weibchen eine Übereinstimmung von ca. 99.8% mit dem C57Bl/6 Genom vorliegen. Verschiedene elektrophysiologische Studien beschreiben einen innerhalb weniger Lebensmonate beginnenden Hörverlust der Mauszüchtlinie C57Bl/6 im hochfrequenten Bereich (Hunter und Willott, 1987). Daher ist zudem zu überlegen, eine outbred-Linie dieser congenen Tiere anzulegen, um mögliche Hördefekte unabhängig vom genetischen Hintergrund beobachten zu können.

4.4.2 Identifizierung von AP-2 δ Zielgenen durch Microarray-Analysen

Neben der Identifizierung von Interaktionspartnern von AP-2 δ bietet sich die Charakterisierung von AP-2 δ Zielgenen mithilfe von Microarray Untersuchungen an. Eine Microarray-Analyse wurde bereits mit RNA-Extrakten aus den posterioren Mittelhirnen von wildtyp- und AP-2 δ -defizienten 15 Tage alten Embryonen durchgeführt. Diese RNA-Isolate wurden mit einem Gen-Chip der Firma Affymetrix hybridisiert und führten zur Identifikation von AP-2 δ -regulierten Genen, die durch den Verlust von AP-2 δ ein verändertes Expressionsmuster aufweisen. Ähnliche Microarray-Analysen sind auch mit RNA der Retina und des Thalamus denkbar und können wichtige Einblicke in die Funktion von AP-2 δ in diesen Organen gewähren. In einem nächsten Schritt müssen diese Zielgene verifiziert und mögliche Expressionsunterschiede quantitativ mithilfe von Northern Blots, RT-PCR und real time-PCR Analysen an cDNA aus den posterioren Mittelhirnen von Kontroll- und AP-2 δ -defizienten Tieren untersucht werden. Weiterhin müssen die Expressionsmuster der Zielgene auch durch in situ Hybridisierungen an Embryonen und an Gehirnschnitten von Kontrolltieren und AP-2 δ Mutanten verglichen werden.

Um den Einfluß von AP-2 δ auf die transkriptionelle Regulation dieser Zielgene zu untersuchen, müssen Promotorstudien durchgeführt werden. Dies umfaßt die Klonierung der Promotorbereiche der Zielgene, sowie die anschließende Analyse der Promotor-Aktivität mithilfe eines Luziferase-Reporter-Assays in Kotransfektionsstudien mit AP-2 δ in einer neuronalen Zelllinie.

Der nächste Schritt besteht in dem Nachweis von AP-2 Bindestellen innerhalb des Promotorbereichs mithilfe von Punkt- und Deletionsmutationen und der Nachweis der Bindung von AP-2 δ durch einen Mobility-Shift Assay.

Da AP-2 Proteine nicht selbst, sondern nur über Koaktivatoren mit der basalen Transkriptions-Maschinerie interagieren können, besteht ein weiteres Ziel darin, die im Yeast-Two Hybrid Screen identifizierten Interaktoren auf ihre Fähigkeit, als Koaktivatoren die Transkription der AP-2 δ -spezifischen Zielgene mit zu regulieren. Die Wirkung der Interaktoren auf die neu identifizierten Zielgene wird anschließend ebenfalls in Luziferase-Reporter-Assays kontrolliert.

5 Zusammenfassung

Die Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren umfaßt in Mensch und Maus 5 Isoformen - AP-2 α , AP-2 β , AP-2 γ , AP-2 δ und AP-2 ϵ , die sich durch ein konserviertes, palindromisches DNA-Bindemotiv auszeichnen. Diese GC-reiche Sequenz konnte in vielen AP-2-regulierten viralen und eukaryontischen Genen identifiziert werden. Ebenso verfügen AP-2 Proteine über eine charakteristische Struktur, bestehend aus einer N-terminalen Prolin-reichen Transaktivierungsdomäne, einer zentralen basischen Domäne und einer C-terminalen DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne zur Bildung von Homo- und Heterodimeren. AP-2 Proteine werden bereits in frühen Embryonalstadien exprimiert und können in ES-Zellen, in Zellen des Trophoblasten, sowie in Neuralleistenzellen und ihren Derivaten nachgewiesen werden. So stellen das Herz, das Gesichtsmesenchym, sowie craniale Ganglien und dorsale Wurzelganglien neben dem Auge, der Haut, dem Urogenitaltrakt, den Extremitätenanlagen und charakteristischen Expressionsmustern im embryonalen Zentralnervensystem wichtige Expressionsorte von AP-2 Proteinen dar. Obwohl die einzelnen AP-2 Proteine besonders zu Beginn der Embryogenese in einigen dieser Gewebe koexprimiert werden, deuten Studien an AP-2-defizienten und transgenen Mausmodellen auf eine individuelle Funktion jeder einzelnen Isoform während der Embryonalentwicklung hin. So zeigen alle AP-2-defizienten Mausmodelle charakteristische Entwicklungsdefekte an den Hauptexpressionsorten der jeweiligen Isoform, die je nach Schweregrad zum pre- oder postnatalen Tod der Tiere führen. Interessanterweise wurden diese Defekte von apoptotischen Prozessen begleitet, was die essentielle Rolle der jeweiligen Isoform für das Überleben von Zellen im exprimierenden Gewebe unterstreicht.

Die 1999 identifizierte AP-2 δ Isoform weicht in einigen Merkmalen von den Gemeinsamkeiten ab, die die Familie der AP-2 Proteine kennzeichnen: gegenüber dem breiten Expressionsspektrum anderer Isoformen wird AP-2 δ vergleichsweise spät und hauptsächlich in Geweben des Zentralnervensystems exprimiert. Daher bestand ein Ziel meiner Doktorarbeit in einer umfassenden Analyse des Expressionsmusters von AP-2 δ . Die durchgeführten Analysen ergaben, daß AP-2 δ ab Tag E10.5 hauptsächlich im Mittelhirn-/Hinterhirnbereich, sowie dem dorsalen Thalamus und dem neopallialen Cortex nachgewiesen wird. Im weiteren Verlauf der Embryogenese manifestiert sich die Expression von AP-2 δ im posterioren Teil des Mittelhirns, dem Colliculus inferior, bleibt aber auch im Colliculus superior nachweisbar.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Analyse der in vivo Funktion von AP-2 δ mithilfe AP-2 δ -defizienter Mäuse. Dazu wurde ein „Targeting Vector“ zur Deletion des murinen AP-2 δ Gens in embryonalen Stammzellen durch homologe Rekombination generiert. Die daraus hervorgegangenen AP-2 δ -defizienten Mäuse zeigten folgende Phänotypen

1. AP-2 δ Mutanten vollenden die Embryogenese und zeigten im Gegensatz zu den bisher bekannten AP-2 Mutanten keine reduzierte Lebenserwartung. Jedoch wiesen die Mutanten innerhalb der ersten 4 Lebenswochen auffallende Gewichtsreduktionen und ein verzögertes

Wachstum auf. Histologische Untersuchungen der Röhrenknochen der hinteren Extremitäten wiesen eine verminderte Proliferationsrate der Chondrozyten in den Epiphysen auf.

2. Erste immunhistologische Analysen zeigten an den Hirnen von 1.5 Monate alten Mäusen, daß der posteriore Teil des Mittelhirns, der AP-2 δ -exprimierende Colliculus inferior fehlt. Markergene des Mittel-/Hinterhirn-Organisators, die die Bildung des Mittel- und des Hinterhirns entscheidend beeinflussen, wiesen keine Veränderungen der Expressionsmuster auf und bestätigten somit die korrekte Anlage des Mittelhirns in frühen Phasen der Embryogenese. Mithilfe von Zelltod-Analysen in späteren Entwicklungsstadien konnten massive apoptotische Prozesse im posterioren Mittelhirn 17 Tage alter Embryonen nachgewiesen werden. Zwar werden auch andere AP-2 Proteine im embryonalen Mittelhirn exprimiert, jedoch stellt AP-2 δ die einzige im posterioren Mittelhirn exprimierte Isoform dar. Folglich kann ein Verlust der Isoform nicht kompensiert werden und der beobachtete Zelltod setzt ein. Damit kommt AP-2 δ eine essentielle Funktion für das Überleben von Zellen im posterioren Mittelhirn zu. In anderen Expressionsorten von AP-2 δ wie dem Cortex und dem dorsalen Thalamus konnten dagegen keine apoptotischen Prozesse festgestellt werden. Während der Verlust von AP-2 δ im Cortex durch andere AP-2 Isoformen kompensiert wurde, scheint AP-2 δ im dorsalen Thalamus hingegen für eine korrekte neuronale Differenzierung von Bedeutung zu sein.
3. Neben dem Hirn-basierten Phänotyp blieben erste Verpaarungen AP-2 δ -defizienter Weibchen ohne Nachkommen. Diese Infertilität scheint jedoch keine organische Ursache zu haben, da die Ovarien und die Uteri der Weibchen keine morphologischen Veränderungen aufwiesen. Darüberhinaus können AP-2 δ -defiziente Weibchen befruchtungsfähige Oocyten ausbilden, die zu Blastozysten heranreifen. Untersuchungen des Hormonzyklus und der Expression verschiedener Hormone ergaben jedoch, daß AP-2 δ -defiziente Weibchen einen unregelmäßigen Zyklus aufweisen, der vermutlich aus reduzierten FSH- und LH-Expressionsspiegeln resultiert.

Eine weitere Aufgabe dieser Promotion bestand in der Identifizierung von Interaktionspartnern von AP-2 δ , da die Transaktivierungsdomäne von AP-2 δ im Gegensatz zu anderen AP-2 Proteinen über einige veränderte Motive verfügt. Daher interagiert AP-2 δ wahrscheinlich auch mit anderen als den bislang für die anderen AP-2 Isoformen bekannten Coaktivatoren. Mithilfe eines Yeast Two-Hybrid basierten Interaktions-Screenings konnten einige potentielle Interaktoren wie die Transkriptionsfaktoren FoxG1 und NFAT1-D anhand ihrer Wechselwirkung mit der AP-2 δ Transaktivierungsdomäne identifiziert werden. Die Interaktion der partiellen Proteine mit der Transaktivierungsdomäne von AP-2 δ konnte mithilfe von GST-Pulldowns bestätigt werden.

6 Literatur

- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A. and Brulet, P., (1995) Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation, *Development*, Oct; 121 (10): 3279 - 3290
- Aho, S., Arffman, A., Pummi, T. and Uitto, J., (1997) A novel reporter gene MEL1 for the yeast two-hybrid system, *Anal. Biochem.*, Nov 15; 253 (2): 270 - 272
- Anderson, L.A., Malmierca, M.S., Wallace, M.N. and Palmer, A.R., (2006) Evidence for a direct, short latency projection from the dorsal cochlear nucleus to the auditory thalamus in the guinea pig, *Eur. J. Neurosci.*, Jul 12; [Epub ahead of print]
- Aqeilan, R.I., Palamarchuk, A., Weigel, R.J., Herrero, J.J., Pekarsky, Y. and Croce, C.M., (2004) Physical and functional interactions between the *Wwox* tumor suppressor protein and the AP-2 gamma transcription factor, *Cancer Res.*, Nov 15; 64 (22): 8256 - 8261
- Auman, H.J., Nottoli, T., Lakiza, O., Winger, Q., Donaldson, S. and Williams, T., (2002) Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development, *Development*, Jun; 129 (11): 2733 - 2747
- Bamforth, S.D., Braganca, J., Eloranta, J.J., Murdoch, J.N., Marques, F.I., Kranc, K.R., Farza, H., Henderson, D.J., Hurst, H.C. and Bhattacharya, S., (2001) Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking *Cited2*, a new *Tfap2* co-activator, *Nat. Genet.*, Dec; 29 (4): 469 - 474
- Barembaum, M. and Bronner-Fraser, M., (2005) Early steps in neural crest specification, *Semin. Cell. Dev. Biol.*, Dec; 16 (6): 642 - 646
- Batsche, E., Muchardt, C., Behrens, J., Hurst, H.C. and Cremisi, C., (1998) RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2, *Mol. Cell. Biol.*, Jul; 18 (7): 3647 - 3658
- Bauer, R., Imhof, A., Pscherer, A., Kopp, H., Moser, M., Seegers, S., Kerscher, M., Tainsky, M.A., Hofstaedter, F. and Buettner, R., (1994) The genomic structure of the human AP-2 transcription factor, *Nucleic Acids Res.*, Apr 25; 22 (8): 1413 - 1420
- Bauer, R., McGuffin, M.E., Mattox, W. and Tainsky, M.A. (1998) Cloning and characterization of the *Drosophila* homologue of the AP-2 transcription factor, *Oncogene*, Oct 15; 17 (15): 1911 - 1922
- Beier, U.H. and Gorogh, T., (2005) Implications of galactocerebrosidase and galactosylcerebroside metabolism in cancer cells, *Int. J. Cancer*, May 20; 115 (1): 6 - 10
- Bisgrove, D. A. and Godbout, R., (1999) Differential expression of AP-2alpha and AP-2beta in the developing chick retina: repression of R-FABP promoter activity by AP-2, *Dev. Dyn.*, Mar; 214 (3): 195 - 206
- Blackburn, M.R., Datta, S.K., Wakamiya, M., Vartabedian, B.S. and Kellems, R.E., (1996) Metabolic and immunologic consequences of limited adenosine deaminase expression in mice, *J. Biol. Chem.*, Jun 21; 271 (25): 15203 - 15210
- Bosher, J.M., Williams, T. and Hurst, H.C., (1995) The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Jan 31; 92 (3): 744 - 747
- Bosher, J.M., Totty, N.F., Hsuan, J.J., Williams, T. and Hurst, H.C., (1996) A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma, *Oncogene*, Oct 17; 13 (8): 1701 - 1707

- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J. and Eilers, M., (1999) Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27, *EMBO J.*, Oct 1; 18 (19): 5321 - 5333
- Bouchard, M., Pfeffer, P. and Busslinger, M., (2000) Functional equivalence of the transcription factors Pax2 and Pax5 in mouse development, *Development*, Sep; 127 (17): 3703 - 3713
- Braganca, J., Swingler, T., Marques, F.I., Jones, T., Eloranta, J.J., Hurst, H.C., Shioda, T. and Bhattacharya, S., (2002) Human CREB-binding protein/p300-interacting transactivator with ED-rich tail (CITED) 4, a new member of the CITED family, functions as a co-activator for transcription factor AP-2, *J. Biol. Chem.*, Mar 8; 277 (10): 8559 - 8565
- Braganca, J., Eloranta, J.J., Bamforth, S.D., Ibbitt, J.C., Hurst, H.C. and Bhattacharya, S., (2003) Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors, p300/CREB-binding protein, and CITED2, *J. Biol. Chem.*, May 2; 278 (18): 16021 - 16029
- Brailoiu, G.C., Dun, S.L., Ohsawa, M., Yin, D., Yang, J., Chang, J.K., Brailoiu, E. and Dun, N.J., (2005) KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain, *J. Comp. Neurol.*, Jan 17; 481 (3): 314 - 329
- Breeden, L. and Nasmyth, K., (1985) Regulation of the yeast HO gene, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 50: 643 - 650
- Brent, R. and Ptashne, M., (1985) A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor, *Cell*, Dec; 43 (3 Pt 2) : 729 – 736
- Brewer, S., Jiang, X., Donaldson, S., Williams, T. and Sucov, H.M., (2002) Requirement for AP-2alpha in cardiac outflow tract morphogenesis, *Mech. Dev.*, Jan; 110 (1-2): 139 - 149
- Brewer, S., Feng, W., Huang, J., Sullivan, S. and Williams, T., (2004a) Wnt1-Cre-mediated deletion of AP-2alpha causes multiple neural crest-related defects, *Dev. Biol.*, Mar 1; 267 (1): 135 - 152
- Brewer, S. and Williams, T., (2004b) Loss of AP-2alpha impacts multiple aspects of ventral body wall development and closure, *Dev. Biol.*, Mar 15; 267 (2): 399 - 417
- Britt, K.L., Drummond, A.E., Cox, V.A., Dyson, M., Wreford, N.G., Jones, M.E., Simpson, E.R. and Findlay, J.K., (2000) An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene, *Endocrinology*, Jul; 141 (7): 2614 - 2623
- Broccoli, V., Boncinelli, E. and Wurst, W., (1999) The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmus organizer, *Nature*, Sep 9; 401 (6749): 164 - 168
- Byrne, C. and Fuchs, E., (1993) Probing keratinocyte and differentiation specificity of the human K5 promoter in vitro and in transgenic mice, *Mol. Cell. Biol.*, Jun; 13 (6): 3176 - 3190
- Carl, T.F., Dufton, C., Hanken, J. and Klymkowsky, M.W., (1999) Inhibition of neural crest migration in *Xenopus* using antisense slug RNA, *Dev. Biol.*, 213 (1): 101 - 115
- Chadwick, R.B., Conrad, M.P., McGinnis, M.D., Johnston-Dow, L., Spurgeon, S.L. and Kronick, M.N., (1996) Heterozygote and mutation detection by direct automated fluorescent DNA sequencing using a mutant Taq DNA polymerase. *Biotechniques*, Apr; 20 (4) : 676 - 683
- Champlin, A.K., Dorr, D.L. and Gates, A.H., (1973) Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina, *Biol. Reprod.*, May; 8 (4): 491 - 494
- Char, F., (1978) Peculiar facies with short philtrum, duck-bill lips, ptosis and low-set ears--a new syndrome? *Birth Defects Orig. Artic. Ser.*, 14 (6B): 303 - 305
- Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Decimo, D., Chambon, P. and Dolle, P., (1996) AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis, *Mech. Dev.*, Jan; 54 (1): 83 - 94

- Chen, T.T., Wu, R.L., Castro-Munozledo, F. and Sun, T.T., (1997) Regulation of K3 keratin gene transcription by Sp1 and AP-2 in differentiating rabbit corneal epithelial cells, *Mol. Cell. Biol.*, Jun; 17 (6): 3056 - 3064
- Cheng, C., Ying, K., Xu, M., Zhao, W., Zhou, Z., Huang, Y., Wang, W., Xu, J., Zeng, L., Xie, Y. and Mao, Y., (2002a) Cloning and characterization of a novel human transcription factor AP-2 beta like gene (TFAP2BL1), *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Jan; 34 (1): 78 - 86
- Cheng, G., Weihua, Z., Makinen, S., Makela, S., Saji, S., Warner, M., Gustafsson, J.A. and Hovatta, O., (2002b) A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary, *Biol. Reprod.*, Jan; 66 (1): 77 - 84
- Chenn, A., Braisted, J.E., McConnell, S.K. and O'Leary, D.D.M., (1997) Development of the cerebral cortex: mechanisms controlling cell fate, laminar and areal patterning, and axonal connectivity, *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*, Edited by: Cowan, W.M., Jessell, T.M. and Zipursky, S.L., New York, Oxford University Press, 440-473
- Chi, C.L., Martinez, S., Wurst, W. and Martin, G.R., (2003) The isthmic organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum, *Development*, Jun; 130 (12): 2633 - 2644
- Coelho, D.J., Sims, D.J., Ruegg, P.J., Minn, I., Muench, A.R. and Mitchell, P.J., (2005) Cell type-specific and sexually dimorphic expression of transcription factor AP-2 in the adult mouse brain, *Neuroscience*, 134 (3): 907 - 919
- Copeland, N.G., Zelenetz, A.D. and Cooper, G.M., (1979) Transformation of NIH/3T3 mouse cells by DNA of Rous sarcoma virus, *Cell*, Aug; 17 (4): 993 - 1002
- Courtois, S.J., Lafontaine, D.A., Lemaigre, F.P., Durvieux, S.M. and Rousseau, G.G., (1990) Nuclear factor-1 and activator protein-2 bind in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequences and trans-activate the human growth hormone gene, *Nucleic Acids Res.*, Jan 11; 18 (1): 57 - 64
- Creaser, P.C., D'Argenio, D.A. and Williams, T., (1996) Comparative and functional analysis of the AP2 promoter indicates that conserved octamer and initiator elements are critical for activity, *Nucleic Acids Res.*, Jul 1; 24 (13): 2597 - 2605
- Crossley, P.H., Martinez, S. and Martin, G.R., (1996) Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo, *Nature*, Mar 7; 380 (6569): 66 - 68
- Danielian, P.S., Muccino, D., Rowitch, D.H., Michael, S.K. and McMahon, A.P., (1998) Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase, *Curr. Biol.*, Dec 3; 8 (24): 1323 - 1326
- Decary, S., Decesse, J.T., Ogryzko, V., Reed, J.C., Naguibneva, I., Harel-Bellan, A. and Cremisi, C.E., (2002) The retinoblastoma protein binds the promoter of the survival gene bcl-2 and regulates its transcription in epithelial cells through transcription factor AP-2, *Mol. Cell. Biol.*, Nov; 22 (22): 7877 - 7888
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G., (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei, *Nucleic Acids Res.*, Mar 11; 11 (5): 1475 - 1489
- Donohoe, M.E., Zhang, X., McGinnis, L., Biggers, J., Li, E. and Shi, Y., (1999) Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality, *Mol. Cell. Biol.*, Oct; 19 (10): 7237 - 7244
- Duan, C. and Clemmons, D.R., (1995) Transcription factor AP-2 regulates human insulin-like growth factor binding protein-5 gene expression, *J. Biol. Chem.*, Oct 20; 270 (42): 24844 - 24851

- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W.H. and Elledge, S.J., (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit, *Genes Dev.*, 7: 555 - 569
- Echevarria, D., Vieira, C., Gimeno, L. and Martinez, S., (2003) Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, Oct; 43 (2): 179 - 191
- Eilers, M., Schirm, S. and Bishop, J.M., (1991) The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene, *EMBO J.*, Jan; 10 (1): 133 - 141
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. and Wall, R., (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot, *J. Mol. Biol.*, Oct 15; 179 (1): 125 - 142
- Ellens, D.J. and Gielkens, A.L., (1980) A simple method for the purification of 5-aminosalicylic acid. Application of the product as substrate in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *J. Immunol. Methods*, 37 (3-4): 325 - 332
- Eloranta, J.J. and Hurst, H.C., (2002) Transcription factor AP-2 interacts with the SUMO-conjugating enzyme UBC9 and is sumoylated in vivo, *J. Biol. Chem.*, Aug 23; 277 (34): 30798 - 30804
- Emini, E.A., Hughes, J.V., Perlow, D.S., und Boger, J., (1985) Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by virus-specific synthetic peptide, *J. Virol.*, 55: 836-839
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z. and Hancock, D.C., (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein, *Cell*, Apr 3; 69 (1): 119 - 128
- Evan, G.I. and Littlewood, T.D., (1993) The role of c-myc in cell growth, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, Feb; 3 (1): 44 - 49
- Fassler, R., Schnegelsberg, P.N.J., Dausman, J., Shinya, T., Muragaki, Y., McCarthy, M.T., Olsen, B.R. and Jaenisch, R., (1994) Mice lacking $\alpha 1$ (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, May; 91 : 5070 - 5074
- Favor, J., Sandulache, R., Neuhauser-Klaus, A., Pretsch, W., Chatterjee, B., Senft, E., Wurst, W., Blanquet, V., Grimes, P., Sporle, R. and Schughart, K., (1996) The mouse Pax2(1Neu) mutation is identical to a human PAX2 mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Nov, 26; 93 (24): 13870 - 13875
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B., (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum., *Anal. Biochem.*, Feb; 137 (1): 266 - 267
- Feng, W. and Williams, T., (2003) Cloning and characterization of the mouse AP-2 epsilon gene : a novel family member expressed in the developing olfactory bulb, *Mol. Cell. Neurosci.*, Oct; 24 (2): 460 - 475
- Fields, S. and Song, O., (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, Jul 20; 340 (6230) : 245 – 246
- Fields, S. (1993) The two-hybrid system to detect protein-protein interactions, *METHODS: A Companion to Meth. Enzymol.*, 5: 116 - 124
- Fields, S. and Sternglanz, R., (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.*, Aug; 10 (8) : 286 – 292
- Frisch, S.M. and Morisaki, J.H., (1990) Positive and negative transcriptional elements of the human type IV collagenase gene, *Mol. Cell. Biol.*, Dec; 10 (12): 6524 - 6532

- Galli-Taliadoros, L.A., Sedgwick, J.D., Wood, S.A. and Korner, H., (1995) Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice, *J. Immunol. Methods.*, Apr 12; 181 (1): 1 - 15
- Garcia, M.A., Campillos, M., Marina, A., Valdivieso, F. and Vazquez J., (1999) Transcription factor AP-2 activity is modulated by protein kinase A-mediated phosphorylation, *FEBS Lett.*, Feb 5; 444 (1): 27 - 31
- Garel, S., Yun, K., Grosschedl, R. and Rubenstein, J.L., (2002) The early topography of thalamocortical projections is shifted in Ebf1 and Dlx1/2 mutant mice, *Development*, Dec; 129 (24): 5621 - 5634
- Gaubatz, S., Imhof, A., Dosch, R., Werner, O., Mitchell, P., Buettner, R. and Eilers, M., (1995) Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2, *EMBO J.*, Apr 3; 14 (7): 1508 - 1519
- Gaynor, R.B., Muchardt, C., Xia, Y.R., Klisak, I., Mohandas, T., Sparkes, R.S. and Lusic, A.J., (1991) Localization of the gene for the DNA-binding protein AP-2 to human chromosome 6p22.3-pter, *Genomics*, Aug; 10 (4): 1100 - 1102
- Gerster, T., Balmaceda, C.G. and Roeder, R.G., (1990) The cell type-specific octamer transcription factor OTF-2 has two domains required for the activation of transcription, *EMBO J.*, May; 9 (5): 1635 - 1643
- Gilbert, S.F., (2003) *Developmental biology*, Sinauer Associates Inc., Sunderland, USA, 427 - 442
- Gonchoroff, N.J., Katzmann, J.A., Currie, R.M., Eavens, E.L., Houk, D.W., Kline, B.C., Greipp, P.R. and Loken, M. R., (1986) S-Phase detection with an antibody to bromodeoxyuridine, *J. Immunol. Methods*, Oct 23; 93 (1): 97 - 101
- Gottsche, M.L, Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K. and Steiner, R.A., (2004) A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse, *Endocrinology*, Sep; 145 (9): 4073 - 4077
- Graef, I.A, Chen, F. and Crabtree, G.R., (2001) NFAT signaling in vertebrate development, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, Oct; 11 (5): 505 - 512
- Gratzner, H.G., (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication, *Science*, Oct 29; 218 (4571): 474 - 475
- Greco, D., Zellmer, E., Zhang, Z. and Lewis, E., (1995) Transcription factor AP-2 regulates expression of the dopamine beta-hydroxylase gene, *J. Neurochem.*, Aug; 65 (2): 510 - 516
- Greene, L.A. and Tischler, A.S., (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Jul; 73 (7): 2424 - 2428
- Grooteclaes, M., Vernimmen, D., Plaza, S., Pasleau, F., Hodzic, D. and Winkler-Gol, R., (1999) A new cis element is involved in the HER2 gene overexpression in human breast cancer cells, *Cancer Res.*, Jun 1; 59 (11): 2527 - 2531
- Hamatani, T., Carter, M.G., Sharov, A.A. and Ko, M.S., (2004) Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development, *Dev. Cell*, Jan; 6 (1): 117 - 131
- Herr, W., (1992) Oct-1 and Oct-2: Differential transcriptional regulation by proteins that bind to the same DNA sequence, in: McKnight, S.L. and Yamamoto, K.R. (eds) *Transcriptional Regulation*, 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, 1103 - 1135
- Heslot, H. and Gaillardin, C., eds. (1992) *Molecular Biology and Genetic Engineering of Yeasts* (CRC Press, Inc.), 393

- Hevner, R.F., Miyashita-Lin, E. and Rubenstein, J.L., (2002) Cortical and thalamic axon pathfinding defects in *Tbr1*, *Gbx2*, and *Pax6* mutant mice: evidence that cortical and thalamic axons interact and guide each other, *J. Comp. Neurol.*, May 20; 447 (1): 8 - 17
- Hilger-Eversheim, K., Moser, M., Schorle, H. and Buettner, R., (2000) Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control, *Gene*, Dec 30; 260 (1-2): 1 - 12
- Ho, J.S., Ma, W., Mao, D.Y. and Benchimol, S., (2005) p53-Dependent transcriptional repression of *c-myc* is required for G1 cell cycle arrest, *Mol. Cell. Biol.*, Sep; 25 (17): 7423 - 7431
- Hodge, M.R., Ranger, A.M., Charles de la Brousse, F., Hoey, T., Grusby, M.J. and Glimcher, L.H., (1996) Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice, *Immunity*, Apr; 4 (4): 397 - 405
- Hofstetter, K.M., and Ehret, G., (1992) The auditory cortex of the mouse: connections of the ultrasonic field, *J. Comp. Neurol.*, Sep 15; 323 (3): 370 - 386
- Hogan, B.L., Beddington, R.S., Costantini, F., and Lacy, E., (1994) *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Huang, S., Luca, M., Gutman, M., McConkey, D.J., Langley, K.E., Lyman, S.D. and Bar-Eli, M., (1996) Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential, *Oncogene*, Dec 5; 13 (11): 2339 - 2347
- Huang, S., Jean, D., Luca, M., Tainsky, M.A. and Bar-Eli, M., (1998) Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis, *EMBO J.*, Aug 3; 17 (15): 4358 - 4369
- Hunter, K.P. and Willott, J.F., (1987) Aging and the auditory brainstem response in mice with severe or minimal presbycusis, *Hear. Res.*, 30 (2-3): 207 - 218
- Hyman, S.E., Comb, M., Pearlberg, J. and Goodman, H.M., (1989) An AP-2 element acts synergistically with the cyclic AMP- and phorbol ester-inducible enhancer of the human proenkephalin gene, *Mol. Cell. Biol.*, Jan; 9 (1): 321 - 324
- Imagawa, M., Chiu, R. and Karin, M., (1987) Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP, *Cell*, Oct 23; 51 (2): 251 - 260
- Imataka, H., Nakayama, K., Yasumoto, K., Mizuno, A., Fujii-Kuriyama, Y. and Hayami, M., (1994) Cell-specific translational control of transcription factor BTEB expression. The role of an upstream AUG in the 5'-untranslated region, *J. Biol. Chem.*, Aug 12; 269 (32): 20668 - 20673
- Imhof, A., Schuierer, M., Werner, O., Moser, M., Roth, C., Bauer, R. and Buettner R. (1999) Transcriptional regulation of the AP-2alpha promoter by BTEB-1 and AP-2rep, a novel wt-1/egr-related zinc finger repressor, *Mol. Cell. Biol.*, Jan; 19 (1): 194 - 204
- Ioannou, P.A., Amemiya, C.T., Garnes, J., Kroisel, P.M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M.A. and de Jong, P.J., (1994) A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat. Genet.*, Jan; 6 (1) : 84-89
- Israel, A., Le Bail, O., Hatat, D., Piette, J., Kieran, M., Logeat, F., Wallach, D., Fellous, M. and Kourilsky, P., (1989) TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF kappa B-like enhancer binding activity which displaces constitutive factors, *EMBO J.*, Dec 1; 8 (12): 3793 - 3800
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A., (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *J. Bacteriol.*, Jan; 153 (1): 163 - 168

- Jainchill, J.L., Aaronson, S.A. and Todaro, G.J., (1969) Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells, *J. Virol.*, Nov; 4 (5): 549 - 553
- James, P., Halladay, J. and Craig, E.A., (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast., *Genetics*, Dec; 144 (4) : 1425 - 1436
- Jameson, B.A. and Wolf, H., (1988) The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants, *Comput. Appl. Biosci.*, Mar; 4 (1): 181 - 186
- Jean, D., Gershenwald, J.E., Huang, S., Luca, M., Hudson, M.J., Tainsky, M.A. and Bar-Eli, M., (1998) Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells, *J. Biol. Chem.*, Jun 26; 273 (26): 16501 - 16508
- Jiang, M.S., Tang, Q.Q., McLenithan, J., Geiman, D., Shillinglaw, W., Henzel, W.J. and Lane, M.D., (1998) Derepression of the C/EBPalpha gene during adipogenesis: identification of AP-2alpha as a repressor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Mar 31; 95 (7): 3467 - 3471
- Jiang, X., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P. and Sucov, H.M., (2000) Fate of the mammalian cardiac neural crest, *Development*, Apr; 127 (8): 1607 - 1616
- Jones, L., Lopez-Bendito, G., Gruss, P., Stoykova, A. and Molnar, Z., (2002) Pax6 is required for the normal development of the forebrain axonal connections, *Development*, Nov; 129 (21): 5041 - 5052
- Jones-Villeneuve, E.M., McBurney, M.W., Rogers, K.A. and Kalnins, V.I., (1982) Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J. Cell Biol.*, Aug; 94 (2) : 253 - 262
- Jun, D.Y., Kim, M.K., Kim, I.G. and Kim, Y.H., (1997) Characterization of the murine cyclin D2 gene: exon/intron organization and promoter activity, *Mol. Cells*, Aug 31; 7 (4): 537 - 543
- Kannan, P., Buettner, R., Chiao, P.J., Yim, S.O., Sarkiss, M. and Tainsky, M.A., (1994) N-ras oncogene causes AP-2 transcriptional self-interference, which leads to transformation, *Genes Dev.*, Jun 1; 8 (11): 1258 - 1269
- Kannan, P. and Tainsky, M.A., (1999) Coactivator PC4 mediates AP-2 transcriptional activity and suppresses ras-induced transformation dependent on AP-2 transcriptional interference, *Mol. Cell. Biol.*, Jan; 19 (1): 899 - 908
- Kannan, P., Yu, Y., Wankhade, S. and Tainsky, M.A., (1999) PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation, *Nucleic Acids Res.*, Feb 1; 27 (3): 866 - 874
- Karplus, P.A. and Schulz, G.E., (1985) Prediction of chain flexibility in proteins, *Naturwissenschaften*, 72: 212-213
- Keegan, L., Gill, G. and Ptashne, M., (1986) Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein, *Science*, Feb 14; 231 (4739) : 699 - 704
- Kikuta, H., Kanai, M., Ito, Y. and Yamasu, K., (2003) gbx2 Homeobox gene is required for the maintenance of the isthmus region in the zebrafish embryonic brain, *Dev. Dyn.*, Nov; 228 (3): 433 - 450
- Kramer, P.R., Krishnamurthy, R., Mitchell, P.J. and Wray, S., (2000) Transcription factor activator protein-2 is required for continued luteinizing hormone-releasing hormone expression in the forebrain of developing mice, *Endocrinology*, May; 141 (5): 1823 - 1838
- Kyte, J. and Doolittle, R.F., (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.*, May 5; 157 (1): 105 - 132

- LaBonne, C. and Bronner-Fraser, M., (2000) Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration, *Dev. Biol.*, 221 (1): 195 - 205
- Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, Aug 15; 227 (5259): 680 - 685
- Lee, J.S., Galvin, K.M., See, R.H., Eckner, R., Livingston, D., Moran, E. and Shi, Y., (1995) Relief of YY1 transcriptional repression by adenovirus E1A is mediated by E1A-associated protein p300, *Genes Dev.*, May 15; 9 (10): 1188 - 1198
- Li, M., Wang, Y., Hung, M.C. and Kannan, P., (2006) Inefficient proteasomal-degradation pathway stabilizes AP-2alpha and activates HER-2/neu gene in breast cancer, *Int. J. Cancer*, Feb 15; 118 (4): 802 - 811
- Liljestrom, P.L., (1985) The nucleotide sequence of the yeast MEL1 gene, *Nucleic Acids Res.*, Oct 25; 13 (20): 7257 - 7268
- Liu, A., Losos, K. and Joyner, A.L., (1999) FGF8 can activate Gbx2 and transform regions of the rostral mouse brain into a hindbrain fate, *Development*, Nov; 126 (21): 4827 - 4838
- Liu, A. and Joyner, A.L., (2001) EN and GBX2 play essential roles downstream of FGF8 in patterning the mouse mid/hindbrain region, *Development*, Jan; 128 (2): 181 - 191
- Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dolle, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A. and Chambon, P., (1994) Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants, *Development*, Oct; 120 (10): 2723 - 2748
- Lopez-Bendito, G. and Molnar, Z., (2003) Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat. Rev. Neurosci.*, Apr; 4 (4): 276 - 289
- Luscher, B., Mitchell, P.J., Williams, T. and Tjian, R., (1989) Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers, *Genes Dev.*, Oct; 3 (10): 1507 - 1517
- Ma, J. and Ptashne, M., (1987) A new class of yeast transcriptional activators., *Cell*, Oct 9; 51 (1) : 113 - 119
- Ma, W.G., Song, H., Das, S.K., Paria, B.C. and Dey, S.K., (2003) Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Mar 4; 100 (5): 2963 - 2968
- Malmierca, M.S., Merchan, M.A., Henkel, C.K. and Oliver, D.L., (2002) Direct projections from cochlear nuclear complex to auditory thalamus in the rat, *J. Neurosci.*, Dec 15; 22 (24): 10891 - 10897
- Marek, L., Levresse, V., Amura, C., Zentrich, E., Van Putten, V., Nemenoff, R.A. and Heasley, L.E., (2004) Multiple signaling conduits regulate global differentiation-specific gene expression in PC12 cells, *J. Cell Physiol.*, Dec; 201 (3): 459 - 469
- Marin, O., Baker, J., Puelles, L. and Rubenstein, J.L., (2002) Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections, *Development*, Feb; 129 (3): 761 - 773
- Martinez, S., Crossley, P.H., Cobos, I., Rubenstein, J.L. and Martin, G.R., (1999) FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expression, *Development*, Mar; 126 (6): 1189 - 1200
- Masutani, M., Nozaki, T., Wakabayashi, K. and Sugimura, T., (1995) Role of poly(ADP-ribose) polymerase in cell-cycle checkpoint mechanisms following gamma-irradiation, *Biochimie*, 77 (6): 462 - 465

- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N. and Aizawa, S., (1995) Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head, *Genes Dev.*, Nov 1; 9 (21): 2646 - 2658
- Matsushime, H., Roussel, M.F. and Sherr, C.J., (1991) Novel mammalian cyclins (CYL genes) expressed during G1, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 56: 69 - 74
- Maytin, E.V., Lin, J.C., Krishnamurthy, R., Batchvarova, N., Ron, D., Mitchell, P.J. and Habener, J.F., (1999) Keratin 10 gene expression during differentiation of mouse epidermis requires transcription factors C/EBP and AP-2, *Dev. Biol.*, Dec 1; 216 (1): 164 - 181
- Mazina, O.M., Phillips, M.A., Williams, T., Vines, C.A., Cherr, G.N. and Rice, R.H., (2001) Redistribution of transcription factor AP-2alpha in differentiating cultured human epidermal cells., *J. Invest. Dermatol.*, Oct; 117 (4) : 864 - 870
- McBurney, M.W. and Rogers, B.J., (1982) Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns, *Dev. Biol.*, Feb; 89 (2): 503 - 508
- McGee, E.A. and Hsueh, A.J., (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles, *Endocr. Rev.*, Apr; 21 (2): 200 - 214
- McMahon, A.P., Joyner, A.L., Bradley, A. and McMahon, J.A., (1992) The midbrain-hindbrain phenotype of *Wnt-1/Wnt-1-* mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum, *Cell*, May 15; 69 (4): 581 - 595
- McPherson, L.A., Baichwal, V.R. and Weigel, R.J., (1997) Identification of ERF-1 as a member of the AP2 transcription factor family, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Apr 29; 94 (9): 4342 - 4327
- McPherson, L.A., Loktev, A.V. and Weigel, R.J., (2002) Tumor suppressor activity of AP2alpha mediated through a direct interaction with p53, *J. Biol. Chem.*, Nov 22; 277 (47): 45028 - 45033
- Meininger, V., Pol, D. and Derer, P., (1986) The inferior colliculus of the mouse. A Nissl and Golgi study, *Neuroscience*, Apr; 17 (4): 1159 - 1179
- Mercurio, F. and Karin, M., (1989) Transcription factors AP-3 and AP-2 interact with the SV40 enhancer in a mutually exclusive manner, *EMBO J.*, May; 8 (5): 1455 - 1460
- Mermod, N., O'Neill, E.A., Kelly, T.J. and Tjian, R., (1989) The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain, *Cell*, Aug 25; 58 (4): 741 - 753
- Millen, K.J., Wurst, W., Herrup, K. and Joyner, A.L., (1994) Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse *Engrailed-2* mutants, *Development*, Mar; 120 (3): 695 - 706
- Millet, S., Campbell, K., Epstein, D.J., Losos, K., Harris, E. and Joyner, A.L., (1999) A role for *Gbx2* in repression of *Otx2* and positioning the mid/hindbrain organizer, *Nature*, Sep 9; 401 (6749): 161 - 164
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M. and Caput, D., (2000) Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif, *J. Biol. Chem.*, Nov 17; 275 (46): 36316 - 36323
- Mitchell, P.J., Wang, C. and Tjian, R., (1987) Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen, *Cell*, Sep 11; 50 (6): 847 - 861
- Mitchell, P.J., Timmons, P.M., Hebert, J.M., Rigby, P.W. and Tjian, R., (1991) Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis, *Genes Dev.*, Jan; 5 (1): 105 - 119

- Mitchell, D.C., Abdelrahim, M., Weng, J., Stafford, L.J., Safe, S., Bar-Eli, M. and Liu, M., (2006) Regulation of KiSS-1 metastasis suppressor gene expression in breast cancer cells by direct interaction of transcription factors activator protein-2alpha and specificity protein-1, *J. Biol. Chem.*, Jan 6; 281 (1): 51 - 58
- Modugno, M., Tagliabue, E., Ardini, E., Berno, V., Galmozzi, E., De Bortoli, M., Castronovo, V. And Menard, S., (2002) p53-dependent downregulation of metastasis-associated laminin receptor, *Oncogene*, Oct 24; 21 (49): 7478 - 7487
- Mohibullah, N., Donner, A., Ippolito, J.A. and Williams, T., (1999) SELEX and missing phosphate contact analyses reveal flexibility within the AP-2[alpha] protein: DNA binding complex, *Nucleic Acids Res.*, Jul 1; 27 (13): 2760 - 2769
- Monge, I. and Mitchell, P.J., (1998) DAP-2, the Drosophila homolog of transcription factor AP-2, *Mech. Dev.*, Aug; 76 (1-2): 191 - 195
- Moon, A.M. and Capecchi, M.R., (2000) Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs, *Nat. Genet.*, Dec; 26 (4): 455 - 459
- Morris, K.M., Aden, D.P., Knowles, B.B. and Colten, H.R., (1982) Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line HepG2, *J. Clin. Invest.*, Oct; 70 (4): 906 - 913
- Moser, M., Imhof, A., Pscherer, A., Bauer, R., Amselgruber, W., Sinowatz, F., Hofstadter, F., Schule, R. and Buettner, R., (1995) Cloning and characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 beta, *Development*, Sep; 121 (9): 2779 - 2788
- Moser, M., Pscherer, A., Roth, C., Becker, J., Mucher, G., Zerres, K., Dixkens, C., Weis, J., Guay-Woodford, L., Buettner, R. and Fassler, R., (1997a) Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta, *Genes Dev.*, Aug 1; 11 (15): 1938 - 1948
- Moser, M., Ruschoff, J. and Buettner, R., (1997b) Comparative analysis of AP-2 alpha and AP-2 beta gene expression during murine embryogenesis, *Dev. Dyn.*, Jan; 208 (1): 115 - 124
- Muchardt, C., Seeler, J.S., Nirula, A., Gong, S. and Gaynor, R., (1992) Transcription factor AP-2 activates gene expression of HTLV-I., *EMBO J.*, Jul; 11 (7): 2573 - 2581
- Mullen, R.J., Buck, C.R. and Smith, A.M., (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates, *Development*, Sep; 116 (1): 201 - 211
- Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S., (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Mar; 2 (3): 202 - 210
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51 Pt 1 : 263 - 273
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. and Roder, J., (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 90 : 8424-8428
- Nakamura, H., Katahira, T., Matsunaga, E. and Sato, T., (2005) Isthmus organizer for midbrain and hindbrain development, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, Sep; 49 (2): 120 - 126
- Nottoli, T., Hagopian-Donaldson, S., Zhang, J., Perkins, A. and Williams, T., (1998) AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Nov 10; 95 (23): 13714 - 13719
- Nyborg, J.K. and Dynan, W.S., (1990) Interaction of cellular proteins with the human T-cell leukaemia virus type I transcriptional control region. Purification of cellular proteins that bind the 21-base pair repeat elements, *J. Biol. Chem.*, May 15; 265 (14): 8230 - 8236

- Nyormoi, O., Wang, Z., Doan, D., Ruiz, M., McConkey, D. and Bar-Eli, M., (2001) Transcription factor AP-2alpha is preferentially cleaved by caspase 6 and degraded by proteasome during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in breast cancer cells, *Mol. Cell. Biol.*, Aug; 21 (15): 4856 - 4867
- Oei, S.L., Griesenbeck, J., Schweiger, M., Babich, V., Kropotov, A. and Tomilin, N., (1997) Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Nov 7; 240 (1): 108 - 111
- Oei, S.L., Griesenbeck, J., Ziegler, M. and Schweiger, M., (1998) A novel function of poly(ADP-ribosyl)ation: silencing of RNA polymerase II-dependent transcription, *Biochemistry*, Feb 10; 37 (6): 1465 - 1469
- Ohlsson, C., Bengtsson, B.A., Isaksson, O.G., Andreassen, T.T. and Słotweg, M.C., (1998) Growth hormone and bone, *Endocr. Rev.*, Feb; 19 (1): 55 - 79
- Oliver, D.L. and Huerta, M.F., (1992) Inferior and superior colliculus. In: Webster, D.B., Popper, A.N. and Fay, R.R. (Eds), *The Mammalian Auditory Pathway: Neuroanatomy*. Springer, New York, 168 - 221
- Osoegawa, K., Tateno, M., Woon, P.Y., Frengen, E., Mammoser, A.G., Catanese, J.J., Hayashizaki, Y. and de Jong, P.J., (2000) Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis., *Genome Res.*, Jan; 10 (1) : 116 – 128
- Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Chazaud, C., Dolle, P. and Chambon P., (1996) AP-2.2: a novel AP-2-related transcription factor induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells, *Exp. Cell Res.*, Jun 15; 225 (2): 338 -347
- Oyama, N., Takahashi, H., Tojo, M., Iwatsuki, K., Iizuka, H., Nakamura, K., Homma, Y. and Kaneko, F., (2002) Different properties of three isoforms (alpha, beta, and gamma) of transcription factor AP-2 in the expression of human keratinocyte genes, *Arch. Dermatol. Res.*, Aug; 294 (6): 273 - 280
- Pan, H., O'Brien, M.J., Wigglesworth, K., Eppig, J.J. and Schultz, R.M., (2005) Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development in vitro, *Dev. Biol.*, Oct 15; 286 (2): 493 - 506
- Paria, B.C., Huet-Hudson, Y.M. and Dey, S.K., (1993) Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Nov 1; 90 (21): 10159 - 10162
- Park, K. and Kim, K.H., (1993) The site of cAMP action in the insulin induction of gene expression of acetyl-CoA carboxylase is AP-2, *J. Biol. Chem.*, Aug 25; 268 (24): 17811 - 17819
- Perkins, N.D., Agranoff, A.B., Duckett, C.S. and Nabel, G.J., (1994) Transcription factor AP-2 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression., *J. Virol.*, Oct; 68 (10): 6820 - 6823
- Petkova, V., Romanowski, M.J., Suljoadikusumo, I., Rohne, D., Kang, P., Shenk, T. and Usheva, A., (2001) Interaction between YY1 and the retinoblastoma protein, Regulation of cell cycle progression in differentiated cells, *J. Biol. Chem.*, Mar 16; 276 (11): 7932 - 7936
- Pfeffer, P.L., Bouchard, M. and Busslinger, M., (2000) Pax2 and homeodomain proteins cooperatively regulate a 435 bp enhancer of the mouse Pax5 gene at the midbrain-hindbrain boundary, *Development*, Mar; 127 (5): 1017 - 1028
- Plyte, S., Boncristiano, M., Fattori, E., Galvagni, F., Paccani, S.R., Majolini, M.B., Oliviero, S., Ciliberto, G., Telford, J.L. and Baldari, C.T., Identification and characterization of a novel nuclear factor of activated T-cells-1 isoform expressed in mouse brain., *J. Biol. Chem.*, Apr 27; 276 (17) : 14350 – 14358

- Popa, C., Dahler, A.L., Serewko-Auret, M.M., Wong, C.F., Smith, L., Barnes, L.M., Strutton, G.M. and Saunders, N.A., (2004) AP-2 transcription factor family member expression, activity, and regulation in human epidermal keratinocytes in vitro, *Differentiation*, Jun; 72 (5): 185 - 197
- Prakash, N. and Wurst W., (2004) Specification of midbrain territory, *Cell Tissue Res.*, Oct; 318 (1): 5 - 14
- Rath, P.C. and Aggarwal, B.B., (1999) TNF-induced signaling in apoptosis, *J. Clin. Immunol.*, Nov; 19 (6): 350 - 364
- Reimer, K., Urbanek, P., Busslinger, M. and Ehret, G., (1996) Normal brainstem auditory evoked potentials in Pax5-deficient mice despite morphologic alterations in the auditory midbrain region, *Audiology*, Jan-Feb; 35 (1): 55 - 61
- Rhinn, M. and Brand, M., (2001) The midbrain--hindbrain boundary organizer, *Curr. Opin. Neurobiol.*, Feb; 11 (1): 34 - 42
- Roychoudhury, R., Jay, E. and Wu, R., (1976) Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase, *Nucleic Acids Res.*, Apr; 3 (4): 863 - 877
- Ruiz, M., Pettaway, C., Song, R., Stoeltzing, O., Ellis, L. and Bar-Eli, M., (2004) Activator protein 2alpha inhibits tumorigenicity and represses vascular endothelial growth factor transcription in prostate cancer cells, *Cancer Res.*, Jan 15; 64 (2): 631 - 638
- Ryan, A. and Miller, J., (1987) Single unit responses in the inferior colliculus of the awake and performing rhesus monkey, *Exp. Brain. Res.*, Jul 14; 32 (3): 389 - 407
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Dec; 74 (12): 5463 - 5467
- Sapin, V., Bouillet, P., Oulad-Abdelghani, M., Dastugue, B., Chambon, P. and Dolle, P., (2000) Differential expression of retinoic acid-inducible (Stra) genes during mouse placentation, *Mech. Dev.*, Apr; 92 (2): 295 - 299
- Satoda, M., Pierpont, M.E., Diaz, G.A., Bornemeier, R.A. and Gelb, B.D., (1999) Char syndrome, an inherited disorder with patent ductus arteriosus, maps to chromosome 6p12-p21, *Circulation*, Jun 15; 99 (23): 3036 - 3042
- Satoda, M., Zhao, F., Diaz, G.A., Burn, J., Goodship, J., Davidson, H.R., Pierpont, M.E. and Gelb, B.D., (2000) Mutations in TFAP2B cause Char syndrome, a familial form of patent ductus arteriosus, *Nat. Genet.*, May; 25 (1): 42 - 46
- Scherer, W.F., Syverton, J.T. and Gey, G.O., (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix, *J. Exp. Med.*, May; 97 (5): 695 - 710
- Scholer, H.R., (1991) Octamania: the POU factors in murine development, *Trends Genet.*, Oct; 7 (10): 323 - 329
- Schorle, H., Meier, P., Buchert, M., Jaenisch, R. and Mitchell, P.J., (1996) Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development, *Nature*, May 16; 381 (6579): 235 - 238
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M. and Schaffner, W., (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells, *Nucleic Acids Res.*, Aug 11; 17 (15): 6419

- Schwarz, M., Alvarez-Bolado, G., Urbanek, P., Busslinger, M. and Gruss, P., (1997) Conserved biological function between Pax-2 and Pax-5 in midbrain and cerebellum development: evidence from targeted mutations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Dec 23; 94 (26): 14518 - 14523
- Shi, Y., Lee, J.S. and Galvin, K.M., (1997) Everything you have ever wanted to know about Yin Yang1, *Biochim. Biophys. Acta*, Apr 18; 1332 (2): F49 - 66
- Shi, D. and Kellems, R.E., (1998) Transcription factor AP-2gamma regulates murine adenosine deaminase gene expression during placental development, *J. Biol. Chem.*, Oct 16; 273 (42): 27331 - 27338
- Shimada, M., Konishi, Y., Ohkawa, N., Ohtaka-Maruyama, C., Hanaoka, F., Makino, Y. and Tamura, T., (1999) Distribution of AP-2 subtypes in the adult mouse brain, *Neurosci. Res.*, Apr; 33 (4): 275 - 280
- Shrivastava, A., Yu, J., Artandi, S. and Calame, K., (1996) YY1 and c-Myc associate in vivo in a manner that depends on c-Myc levels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 10638 - 10641
- Sinha, S., Degenstein, L., Copenhaver, C. and Fuchs, E., (2000) Defining the regulatory factors required for epidermal gene expression, *Mol. Cell. Biol.*, Apr; 20 (7): 2543 - 2555
- Sivak, J.M., Mohan, R., Rinehart, W.B., Xu, P.X., Maas, R.L. and Fini, M.E., (2000) Pax-6 expression and activity are induced in the reepithelializing cornea and control activity of the transcriptional promoter for matrix metalloproteinase gelatinase B, *Dev. Biol.*, Jun 1; 222 (1): 41 - 54
- Sivak, J.M., West-Mays, J.A., Yee, A., Williams, T. and Fini, M.E., (2004) Transcription Factors Pax6 and AP-2alpha Interact To Coordinate Corneal Epithelial Repair by Controlling Expression of Matrix Metalloproteinase Gelatinase B, *Mol. Cell. Biol.*, Jan; 24 (1): 245 - 257
- Slavotinek, A., Clayton-Smith, J. and Super, M., (1997) Familial patent ductus arteriosus: a further case of CHAR syndrome, *Am. J. Med. Genet.*, Aug 8; 71 (2): 229 - 232
- Smale, S.T., (1994) Core promoter architecture for eukaryotic protein-coding genes, in: Conaway, R.C. and Conaway, J.W. (eds) *Transcription, Mechanisms and Regulation*. Raven Press Ltd., NY, 63 - 81
- Smith, J.L. and Schoenwolf, G.C., (1997) Neurulation: coming to closure, *Trends Neurosci.*, Nov; 20 (11): 510 - 517
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C., (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, 150: 76 - 85
- Snape, A.M., Winning, R.S. and Sargent, T.D., (1991) Transcription factor AP-2 is tissue-specific in *Xenopus* and is closely related or identical to keratin transcription factor 1 (KTF-1), *Development*, Sep; 113 (1): 283 - 293
- Southern, E.M., (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, Nov 5; 98 (3) : 503 - 517
- Suzuki, T., Kurahashi, H. and Ichinose, H., (2004) Ras/MEK pathway is required for NGF-induced expression of tyrosine hydroxylase gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Mar 5; 315 (2): 389 - 396.
- Thaller, C. and Eichele, G., (1987) Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud, *Nature*, Jun 18-24; 327 (6123): 625 - 628
- Thomas, K.R. and Capecchi, M.R., (1986) Targeting of genes to specific sites in the mammalian genome., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51 Pt 2: 1101 - 13

- Trainor, P.A., (2005) Specification of neural crest cell formation and migration in mouse embryos, *Semin. Cell. Dev. Biol.*, Dec; 16 (6): 683 - 693
- Trudel, M., D'Agati, V. and Costantini, F., (1991) C-myc as an inducer of polycystic kidney disease in transgenic mice, *Kidney Int.*, Apr; 39 (4): 665 - 671
- Tsytsykova, A.V. and Goldfeld, A.E., (2000) Nuclear factor of activated T cells transcription factor NFATp controls superantigen-induced lethal shock, *J. Exp. Med.*, Aug 21; 192 (4): 581 - 586
- Tummala, R., Romano, R.A., Fuchs, E. and Sinha, S., (2003) Molecular cloning and characterization of AP-2 epsilon, a fifth member of the AP-2 family, *Gene*, Dec 4; 321: 93 - 102
- Tuttle, R., Nakagawa, Y., Johnson, J.E., O'Leary, D.D., (1999) Defects in thalamocortical axon pathfinding correlate with altered cell domains in Mash-1-deficient mice, *Development*, May; 126 (9): 1903 - 1916
- Urbanek, P., Wang, Z.Q., Fetka, I., Wagner, E.F. and Busslinger, M., (1994) Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP, *Cell*, Dec 2; 79 (5): 901 - 912
- van der Lee, S. and Boot, L.M., (1955) Spontaneous pseudopregnancy in mice, *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.*, Nov; 4 (3): 442 - 444
- van der Lee, S. and Boot, L.M., (1956) Spontaneous pseudopregnancy in mice II, *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.*, Dec; 5 (2): 213 - 215
- Vaudry, D., Stork, P.J., Lazarovici, P. and Eiden, L.E., (2002) Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections, *Science*, May 31; 296 (5573): 1648 - 1649
- Vaziri, H., West, M.D., Allsopp, R.C., Davison, T.S., Wu, Y.S., Arrowsmith, C.H., Poirier, G.G. and Benchimol, S., (1997) ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase, *EMBO J.*, Oct 1; 16 (19): 6018 - 6033
- Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R. and Korsmeyer, S.J., (1993) Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair, *Cell*, Oct 22; 75 (2): 229 - 240
- Vernimmen, D., Begon, D., Salvador, C., Gofflot, S., Grooteclaes, M. and Winkler, R., (2003) Identification of HTF (HER2 transcription factor) as an AP-2 (activator protein-2) transcription factor and contribution of the HTF binding site to ERBB2 gene overexpression, *Biochem. J.*, Feb 15; 370 (Pt 1): 323 - 329
- Wajapeyee, N. and Somasundaram, K., (2003) Cell cycle arrest and apoptosis induction by activator protein 2alpha (AP-2alpha) and the role of p53 and p21WAF1/CIP1 in AP-2alpha-mediated growth inhibition, *J. Biol. Chem.*, Dec 26; 278 (52): 52093 - 52101
- Wajapeyee, N., Britto, R., Ravishankar, H.M. and Somasundaram, K., (2006) Apoptosis induction by AP-2alpha involves transcriptional repression of Bcl-2, *J. Biol. Chem.*, Mar 13; [Epub ahead of print]
- Wang, D., Shin, T.H. and Kudlow, J.E., (1997) Transcription factor AP-2 controls transcription of the human transforming growth factor-alpha gene, *J. Biol. Chem.*, May 30; 272 (22): 14244 - 14250
- Wang, Q.T., Piotrowska, K., Ciemerych, M.A., Milenkovic, L., Scott, M.P., Davis, R.W. and Zernicka-Goetz, M., (2004a) A genome-wide study of gene activity reveals developmental signalling pathways in the preimplantation mouse embryo, *Dev. Cell*, Jan; 6 (1): 133 - 144
- Wang, H.V., Vaupel, K., Buettner, R., Bosserhoff, A.K. and Moser, M., (2004b) Identification and embryonic expression of a new AP-2 transcription factor, AP-2 epsilon, *Dev. Dyn.*, Sep; 231 (1): 128 - 135

- Wang, X., Bolotin, D., Chu, D.H., Polak, L., Williams, T. and Fuchs, E., (2006) AP-2alpha: a regulator of EGF receptor signaling and proliferation in skin epidermis, *J. Cell Biol.*, Jan 30; 172 (3): 409 - 421
- Wang, H. and Dey, S.K., (2006) Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models, *Nat. Rev. Genet.*, Mar; 7 (3): 185 - 199
- Wankhade, S., Yu, Y., Weinberg, J., Tainsky, M.A. and Kannan, P., (2000) Characterization of the Activation Domains of AP-2 Family Transcription Factors, *J. Biol. Chem.*, Sep 22; 275 (38): 29701 - 29708
- Wassarman, K.M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A.L., Rubenstein, J.L., Martinez, S., Martin, G.R., (1997) Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function, *Development*, Aug; 124 (15): 2923 - 2934
- Wehr, R., Mansouri, A., de Maeyer, T. and Gruss, P., (1997) Fkh5-deficient mice show dysgenesis in the caudal midbrain and hypothalamic mammillary body, *Development*, Nov; 124 (22): 4447 - 4456
- Werling, U. and Schorle, H., (2002) Transcription Factor Gene AP-2γ Essential for Early Murine Development, *Mol. Cell. Biol.*, May; 22 (9): 3149 - 3156
- West-Mays, J.A., Zhang, J., Nottoli, T., Hagopian-Donaldson, S., Libby, D., Strissel, K.J. and Williams, T., (1999) AP-2alpha transcription factor is required for early morphogenesis of the lens vesicle, *Dev. Biol.*, Feb 1; 206 (1): 46 - 62
- Whitten, W.K., (1956) Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male, *J. Endocrinol.*, Jul; 13 (4): 399 - 404
- Whitten, W.K., (1958) Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male; changes in the oestrous cycle determined by vaginal smears, *J. Endocrinol.*, Sep; 17 (3): 307 - 313
- Williams, T., Admon, A., Luscher, B. and Tjian, R., (1988) Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements, *Genes Dev.*, Dec; 2 (12A): 1557 - 1569
- Williams, T. and Tjian, R., (1991a) Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2, *Genes Dev.*, Apr; 5 (4): 670 - 682
- Williams, T. and Tjian, R., (1991b) Characterization of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins., *Science*, Mar 1; 251 (4997): 1067 - 1071.
- Williamson, J.A., Boshier, J.M., Skinner, A., Sheer, D., Williams, T. and Hurst, H.C., (1996) Chromosomal mapping of the human and mouse homologues of two new members of the AP-2 family of transcription factors, *Genomics*, Jul 1; 35 (1): 262 - 264
- Winger, Q., Huang, J., Auman, H.J., Lewandoski, M. and Williams, T., (2006) Analysis of Transcription Factor AP-2 Expression and Function during Mouse Pre-implantation Development, *Biol. Reprod.*, May 3; [Epub ahead of print]
- Winning, R.S., Shea, L.J., Marcus, S.J. and Sargent, T.D., (1991) Developmental regulation of transcription factor AP-2 during *Xenopus laevis* embryogenesis, *Nucleic Acids Res.*, Jul 11; 19 (13): 3709 - 3714
- Wu, F. and Lee, A.S., (2001) YY1 as a regulator of replication-dependent hamster histone H3.2 promoter and an interactive partner of AP-2, *J. Biol. Chem.*, Jan 5; 276 (1): 28 - 34
- Wurst, W., Auerbach, A.B. and Joyner, A.L., (1994) Multiple developmental defects in *Engrailed-1* mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum, *Development*, Jul; 120 (7): 2065 - 2075

- Wurst, W. and Bally-Cuif, L., (2001) Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer, *Nat. Rev. Neurosci.*, Feb; 2 (2): 99 - 108
- Xuan, S., Baptista, C.A., Balas, G., Tao, W., Soares, V.C. and Lai, E., (1995) Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres, *Neuron*, Jun; 14 (6): 1141 - 1152
- Yagi, R., Chen, L.F., Shigesada, K., Murakami, Y. and Ito, Y., (1999) A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator, *EMBO J.*, May 4; 18 (9): 2551 - 2562.
- Ye, W., Bouchard, M., Stone, D., Liu, X., Vella, F., Lee, J., Nakamura, H., Ang, S.L., Busslinger, M. and Rosenthal, A., (2001) Distinct regulators control the expression of the mid-hindbrain organizer signal FGF8, *Nat. Neurosci.*, Dec; 4 (12): 1175 - 1181
- Zeng, Y.X., Somasundaram, K. and el-Deiry, W.S., (1997) AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21WAF1/CIP1 expression, *Nat. Genet.*, Jan; 15 (1): 78 – 82
- Zeng, F., Baldwin, D.A. and Schultz, R.M., (2004) Transcript profiling during preimplantation mouse development, *Dev. Biol.*, Aug 15; 272 (2): 483 - 496
- Zhang, J., Hagopian-Donaldson, S., Serbedzija, G., Elsemore, J., Plehn-Dujowich, D., McMahon, A.P., Flavell, R.A. and Williams, T., (1996) Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2, *Nature*, May 16; 381 (6579): 238 – 241
- Zhang, J. and Williams, T., (2003) Identification and regulation of tissue-specific cis-acting elements associated with the human AP-2alpha gene, *Dev. Dyn.*, Oct; 228 (2): 194 – 207
- Zhao, F., Satoda, M., Licht, J.D., Hayashizaki, Y. and Gelb, B.D., (2001a) Cloning and characterization of a novel mouse AP-2 transcription factor, AP-2delta, with unique DNA binding and transactivation properties, *J. Biol. Chem.*, Nov 2; 276 (44): 40755 – 40760
- Zhao, F., Weismann, C.G., Satoda, M., Pierpont, M.E., Sweeney, E., Thompson, E.M. and Gelb, B.D., (2001b) Novel TFAP2B mutations that cause Char syndrome provide a genotype-phenotype correlation, *Am. J. Hum. Genet.*, Oct; 69 (4): 695 - 703
- Zhao, F., Lufkin, T. and Gelb, B.D., (2003) Expression of Tfp2d, the gene encoding the transcription factor Ap-2 delta, during mouse embryogenesis, *Gene Expr. Patterns*, May; 3 (2): 213 – 217
- Zhong, L., Wang, Y., Kannan, P. and Tainsky, M.A., (2003) Functional characterization of the interacting domains of the positive coactivator PC4 with the transcription factor AP-2alpha, *Gene*, Nov 27; 320: 155 - 164

7 Anhang

7.1.1 AP-2 Isoformen

AP-2 Isoform	cDNA		Protein	
	Genbank Acc. No.	Länge (bp)	Genbank Acc. No.	Länge (AS)
mAP-2 α	X74216	1596	CAA52292	437
mAP-2 β	X78197	1731	CAA55036	448
mAP-2 γ	X94694	2804	CAA64357	449
mAP-2 δ	NM_153154	1788	NP_694794	452
mAP-2 ϵ	NM_198960	1958	NP_945198	442
hAP-2 α	NM_003220	1636	NP_003211	437

7.1.2 Ermittelte Sequenzen und Leserahmen der Interaktoren

FoxG1

Sequenz: 913 bp

```
TAACCTTCTATTCCGATGATGAAGATACCCACAAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCC
ATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCCGA
ATTCGCGGCCGCGTTCGACAACCTGTCCCTCAACAAGTGCTTCGTGAAGGTACCGCGCCACTACG
ACGACCCGGGCAAGGGCAACTACTGGATGCTCGACCCGTCGAGCGACGACGTGTTTCATCGGCG
GCACGACCGGCAAGCTGCGGGCGCCGCTCCACCACGTCTCGGGCCAAGCTGGCCTTTAAGCGCG
GGGCGCGCCTCACCTCCACCGGCCTCACCTTCATGGACCGCGCCGGCTCCCTCTACTGGCCCA
TGTCGCCCTTCTGTCCCTGCACCACCCCGCGCCAGCAGCACTTTGAGTTACAACGGGACCAC
GTCGGCCTACCCAGCCACCCCATGCCCTACAGCTCCGTGTTGACTCAAACTCGCTGGGCAAC
AACCACTCCTTCTCCACCGCCAACGGGCTGAGTGTGGACCGGCTGGTCAACGGGGAGATCCCG
TACGCCACGCACCACCTCACGGCCGCTGCGCTCGCCGCCTCGGTGCCCTGCGGCCTGTCGGT
CCCTGCTCCGGGACCTACTCCCTCAACCCTGCTCCGTCAACCTGCTCGCGGGCCAGACCAGTT
ACTTTTTCCCCACGTCCCGCACCCGTCAATGACTTCGCAGACCAGCACGTNCATGAGCGCCCG
GGCCGCGTCTCCTCTACGTCGCCGCAGGCCCCCTCGACCCTGNCCTGTGAGTCTTTAAGACCC
TCTTTGCCAANTTTACGACAGGACTGTCCNGGGGACTGTCTGATTATTTACACATCAAATCAGG
GTCTTTTTTCAACCCTT
```

Längster ORF: 286 Aminosäuren (31.7 kDa)

```
MAYPYDVPDYASLGGHMAMEAPGIRIRGRVDNLSLNKCFVKVPRHYDDPGKGNWMLDPSSDDVFI
GGTTGKLRRTTSRAKLAFKRGARLTSTGLTFMDRAGSLYWPMSPFSLHHPRASSTLSYNGTTSA
YPSHPMPYSSVLTQNSLGNNHSFSTANGLSVDRLVNGEIPYATHHLTAAALAASVPCGLSVPCSGTY
SLNPCSVNLLAGQTSYFFPHVPHPSMTSQTSTXMSARAASSSTSPQAPSTLXCESLRPSLPXLRQDC
PGDCLIIISHIKIRGLFSTL
```

NFAT1-D (NFATc2)

Sequenz: 920 bp

```
TATAACCTaTCTATTCCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTA
CCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATC
CGAATTCGCGGCCGCGTTCGACATCGTCTCCCTGCAGGCTGCGTCCAACCCCATCGAGTGCTCTC
AGCGCTCTGCCACGAGCTGCCCATGGTGGAGAGACAAGACATGGACAGCTGCCTGGTCTACG
```

GGGGCCAGCAGATGATCCTCACGGGCCAGAACTTCACAGCGGAGTCCAAGGTTGTGTTTCATGGA
GAAGACTACAGGACCTGCAGGGACCTGTGAGACTCGGCCTTTGCCCATCTCTCTGATCTCAGCT
GACCGTCTCTCCCCCTGGCTTTCCCGGCTGCAGAGAAACCCTCCTGGCTCTGTCTTCAGATGCT
CCGTGCTCCTTCCCTGCCCCAGGATCTTCGCTTGTGCTGCTGGCTCTGTAACATTCTGCCCTTGT
CCCTCGCATACTGTGTCTCCTCTTACTGGGAAGCCATTCTCCCTGAGTGGTGTTCGTGTTCAAAG
GTCATGGCTCAACTGTCCAGCCCAATGTCACCTTTGCCTGTCCCTTTCCACGCTTTATTCTCCAG
GTGACACTCAGTGTTCACCTGTCTGTCTGCTCTCTCTTGGGTCCTCTGGTTCCCATACTAGACTG
TCGGTTCCTTGGGAGCAGGGATACTGTTTGTGCTGCACTCACAATTATAGAATTATATCTGTG
CGTACTANANAAAAANANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNACCTCGAGAGATCTATGAATCGTAGATACT
GAAAACCCCGCANGTTCACCTCAACTGGGCATCGNGCACCATCTCAATTTCTTTATTTATACATC
GTTTNGCCTTT

Längster ORF: 146 Aminosäuren (16.2 kDa)

MAYPYDVPDYASLGGHMAMEAPGIRIRGRVDIVSLQAASNPIECSQRSHELPMVERQDMDSCLVYG
GQQMILTGQNFTAESKVVFMKTTGPAGTCETRPLPISLISADRLSPWLSRLQRNPPGVSFRCVLLP
APGSSLVLLAL

8 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
BrdU	5-Bromo-2'-deoxy-Uridine
BSA	Bovine Serum Albumine
CBP	CREB-Bindeprotein
cDNA	complementary DNA
CITED	CBP/p300 interacting transactivators with ED-rich termini
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)
DBD	DNA-Bindedomäne
ddNTP	Dideoxy-Nukleosid-Triphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxy-Nukleosid-Triphosphate
dpc	dies post coitum
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGTA	Ethyleneglycoltetraacetic Acid
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikel Stimulierendes Hormon
β-Gal	β-Galaktosidase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GH	Growth Hormone
H (h)	Human
HA	Influenza Virus Hemagglutinin
hCG	humanes Choriongonadotropin
H&E	Hämalaun&Eosin
HRP	Horseradish Peroxidase
IRES	Internal Ribosome Entry Site
LB	Luria Bertani
LH	Luteinisierendes Hormon
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LHRH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
M (m)	Maus
min	Minute
mRNA	messenger RNA

Neo	Neomycin
NGF	Nerve Growth Factor
NTR	Nicht-translatierte Region
NIDDK	National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
ORF	open reading frame
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
PP	Polypropylen
RA	Retinoic Acid
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomal RNA
RT	Raum-Temperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
TAD	Transaktivierungs-Domäne
TE	Tris-EDTA pH 8.0
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
tRNA	transfer RNA
TSH	Thyrotropin Stimulierendes Hormon
U	Unit
üN	über Nacht
W	Woche