

**Aus der Abteilung Humangenetik  
(Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Engel)  
Im Zentrum Hygiene und Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

# **Zur Rolle von Straß in pluripotenten Stammzellen**

**INAUGURAL- DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von  
Linda Kotzenberg  
aus Steinheim**

**Göttingen 2010**

**Dekan:** Prof. Dr. med. C. Frömmel

**I. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Engel

**II. Berichterstatter/in:** Priv.-Doz. Dr. rer. Nat. Behr

**Tag der mündlichen Prüfung:** 25.01.2011

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Materialien</b>	<b>5</b>
2.1.1 Chemikalien	5
2.1.2 Gebrauchswaren	7
2.1.2.1 Allgemeine Gebrauchswaren	7
2.1.2.2 Gebrauchswaren für die Zellkultur	7
2.1.3 Geräte	8
2.1.4 Sterilisation	9
2.1.5 Puffer und Lösungen	9
2.1.6 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	11
2.1.7 Vektoren	12
2.1.8 Bakterien	12
2.1.8.1 Medien für die Bakterienkultur	12
2.1.9 Mausstämme	13
2.1.10 Eukaryotische Zelllinien	13
2.1.10.1 Medien für die Zellkultur	13
2.1.11 Antikörper	15
2.1.12 Sonden	15
2.1.13 Oligonukleotide	15
2.1.13.1 Primer für RT- PCR	15
2.1.13.2 Primer für die Sequenzierung	16
2.1.13.3 Andere Primer	16
2.1.14 Molekulargewichtsstandard	16
2.1.15 Datenbanken	16

<b>2.2 Zellbiologische Arbeitsmethoden</b>	<b>17</b>
2.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	17
2.2.1.1 Kultivierung von murinen embryonalen Stammzellen (ES- Zellen)	17
2.2.1.2 Kultivierung von "multipotent adult Germline Stem Cells" (maGSCs)	17
2.2.1.3 Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten	17
2.2.2 Isolation von murinen embryonalen Fibroblasten	18
2.2.3 Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen	18
2.2.4 Passagieren von eukaryotischen Zellen	19
2.2.5 Gelatine- Behandlung von Kulturgefäßen	19
2.2.6 Mitomycin- Behandlung von embryonalen Fibroblasten	19
2.2.7 Induktion von eukaryotischen Zellen mit Retinsäure	20
2.2.8 Herstellung einer testikulären Zellsuspension	20
2.2.9 FACS- Sortierung	20
<b>2.3 Histologische Arbeitsmethoden</b>	<b>21</b>
2.3.1 Fixierung von Zellen und Geweben	21
2.3.1.1 Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd	21
2.3.1.2 Fixierung von Organen und Geweben	21
2.3.2 Färbung von Zellen und Gewebeschnitten	21
2.3.2.1 Immunzytochemische Färbung von eukaryotischen Zellen	21
2.3.2.2 Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten	22
<b>2.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden</b>	<b>22</b>
2.4.1 Klonierung von DNA- Fragmenten	22
2.4.1.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	22
2.4.1.2 Dephosphorylierungen von Plasmid- Vektoren	23
2.4.1.3 Ligation von PCR- Produkten in pGEM-T Easy	23
2.4.1.4 Ligation von PCR- amplifizierten DNA- Fragmenten	24
2.4.1.5 Transformation kompetenter <i>Escherichia- coli</i> - Zellen mittels Hitzeschock	24
2.4.2 Isolierung von Nukleinsäuren	24
2.4.2.1 Minipräparation von Plasmid- DNA aus <i>Escherichia coli</i>	24

2.4.2.2	Endotoxin- freie Maxipräparation von Plasmid- DNA aus <i>Escherichia coli</i>	25
2.4.2.3	Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	26
2.4.2.4	Isolierung von genomischer DNA aus Geweben	26
2.4.2.5	Isolierung von Gesamt- RNA	26
2.4.2.6	Isolierung von Gesamt- RNA aus eukaryotischen Zellen	27
2.4.2.7	Isolierung von RNA aus Geweben	27
2.4.2.8	Isolierung von RNA aus Embryonen	27
2.4.3	Herstellung von komplementärer DNA durch Reverse Transkription	28
2.4.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
2.4.5	Gelelektrophoretische Methoden	29
2.4.5.1	Agarosegelelektrophorese von DNA	29
2.4.5.2	Agarosegelelektrophorese von RNA	29
2.4.6	Aufreinigung von DNA	30
2.4.6.1	Linearisierung und Aufreinigung von Konstrukten vor der Transfektion	30
2.4.6.2	Isolierung von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.4.7	Polymerase- Kettenreaktion (PCR)	31
2.4.7.1	PCR an Plasmid- DNA	32
2.4.7.2	PCR an genomischer DNA	33
2.4.7.3	RT- PCR	33
2.4.7.4	Sequenzierung von PCR- Produkten	33
2.4.8	Radioaktive Markierung von DNA ("random prime labelling")	34
2.4.9	Transfertechniken und Hybridisierung	35
2.4.9.1	Transfer von RNA aus Agarosegelen: Northern- Blotting	35
2.4.9.2	Radioaktive Hybridisierung von Northern- Blots	35
2.4.9.3	"Strippen" von Membranen	36
<b>2.5</b>	<b>Embryologische Methoden</b>	<b>36</b>
2.5.1	Blastozysteninjektion	36

2.5.2	Superovulation von Mäusen und Gewinnung von Oozyten	37
2.5.3	Isolierung von Präimplantationsembryonen	37
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Expressionsanalyse von <i>Stra8</i></b>	<b>38</b>
3.1.1	Nachweis der <i>Stra8</i> - Expression im Ovar mittels RT- PCR	38
3.1.2	Immunhistologischer Nachweis der STRA8- Expression im Ovar und im Testis	39
3.1.3	Nachweis der <i>Stra8</i> - Expression in den ESC- und SSC- Zelllinien	42
3.1.4	<i>Stra8</i> - Expression in Embryonen	48
3.1.5	Immunhistochemischer Nachweis der STRA8- Expression in Präimplantationsembryonen	50
<b>3.2</b>	<b>Untersuchung der Rolle von <i>Stra8</i> bei der Pluripotenz</b>	<b>52</b>
<b>3.3</b>	<b>Bestimmung des prozentualen Anteils an <i>Stra8</i>- positiven Zellen im Testis der transgenen <i>Stra8/EGFP</i>- Maus</b>	<b>55</b>
<b>3.4</b>	<b><i>Stra8</i>- Überexpression</b>	<b>58</b>
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>62</b>
4.1	Das Gen <i>Stra8</i>	62
4.2	<i>Stra8</i> - Expressionsmuster und seine Rolle in der Meiose	63
4.3	<i>Stra8</i> - Expression in pluripotenten Zellen	65
4.4	Perspektiven	67
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>69</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>71</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abb.1:</b>	<i>Stra8</i> - RT- PCR mit cDNA aus 15 Tage alten und adulten WT- Ovarien .....	39
<b>Abb.2:</b>	STRA8- Antikörperfärbung auf Paraffinschnitten von WT- Testis.....	40
<b>Abb.3:</b>	STRA8- Antikörperfärbung auf Paraffinschnitten von WT- Ovarien verschiedenen Alters.....	41+42
<b>Abb.4:</b>	<i>Stra8</i> - RT-PCR mit cDNA aus vier SSC- Zelllinien und aus der ES- RI Zellline.....	43
<b>Abb.5:</b>	<i>Stra8</i> - RT- PCR mit cDNA aus sieben verschiedenen ES- Zelllinien.....	44
<b>Abb.6:</b>	Northern- Blot mit RNA aus den Zelllinien ES C57Bl und SSC C57Bl.....	44
<b>Abb.7:</b>	STRA8- Antikörperfärbung auf SSC- und ES- Zelllinien.....	45+46
<b>Abb. 8:</b>	RT- PCR- Expressionsanalyse für <i>Stra8</i> mit cDNA aus differenzierten und undifferenzierten Zellen.....	48
<b>Abb.9:</b>	RT- PCR- Expressionsanalyse für <i>Stra8</i> und <i>Zfp206</i> in Embryonen (50).....	49
<b>Abb.10:</b>	RT- PCR- Expressionsanalyse für <i>Stra8</i> und <i>Zfp206</i> in Embryonen (100).....	50
<b>Abb.11:</b>	STRA8- Antikörperfärbung auf Präimplantationsembryonen.....	51+52
<b>Abb.12:</b>	EGFP- Fluoreszenz der ES RI <i>Stra8/10</i> nach FACSsortierung.....	53
<b>Abb.13:</b>	Chimären entstanden aus den EGFP <sup>+</sup> - Zellen.....	53+54
<b>Abb.14:</b>	Genotypisierung- PCR der braunen Nachkommen (F1) der <i>Stra8/EGFP</i> - Chimären.....	55
<b>Abb.15:</b>	FACScanning EGFP- positiver Zellen aus der Testissuspension 14 Tage alter und adulter transgener <i>Stra8/EGFP</i> - Mäuse.....	56

<b>Abb.16:</b>	EGFP- Fluoreszenz in Testis und Ovar aus <i>Stra8/EGFP</i> - transgenen Mäusen.....	57
<b>Abb.17:</b>	Darstellung des pCMV- Myc- Vektors und der Ligations- Strategie für die Hygromycin- Resistenz- Kasette.....	59
<b>Abb.18:</b>	Amplifikation des <i>Stra8</i> - ORFs.....	59
<b>Abb.19:</b>	Verdau von Plasmidpräparationen von pGEM-T Easy- ORF- <i>Stra8</i> mit dem Restriktionsenzym <i>NotI</i> (1-10).....	60
<b>Abb.20:</b>	Verdau von Plasmidpräparationen von pCMV- Myc- Hyg- ORF- <i>Stra8</i> mit dem Restriktionsenzym <i>NotI</i> (1-10).....	60
<b>Abb.21:</b>	Struktur des STRA8- Proteins.....	66
<b>Tab.1:</b>	Aufzählung von Keimzell- spezifischen Genen, die im Zusammenhang mit den pluripotenten Eigenschaften von Zellen stehen.....	2
<b>Tab. 2:</b>	Ergebnisse der Blastozysteninjektionen.....	54



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie, 1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Becquerel
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DAPI	4',6'- Diamidino- 2- Phenylindolhydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleosid- Triphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
dPBS	Destillierte Phosphatgepufferte Salzlösung
dpc	“days post coitum”
dpp	“days post partum“
dt	doppeltransgen
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGC	“Embryonic Germ Cell”
EGFP	“Enhanced Green Fluorescent Protein”
EmFi	Embryonale Fibroblasten
ESC	“Embryonic Stem Cell”
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
et al.	et alii
EtOh	Ethanol
FACS	“Fluorescence Activated Cell Sorting”
FB	Fibroblasten
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung (9,81m/s <sup>2</sup> )
h	Stunde
HBSS	Hank’s Balanced Salt Solution
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- Ethansulfonsäure
HLH	“Helix- loop- Helix”
H <sub>2</sub> O	Wasserstoffoxid
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
Hyg	Hygromycin
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneale (Injektion)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IU	international unit
kb	Kilobase
l	Liter
LB	Luria- Bertani (Medium)
LIF	Leukemia Inhibitory Factor

LSM	Laser- Scanning- Mikroskop
LW	Leerwert
M	Molar (mol/l)
m-	milli- ( $1 \times 10^{-3}$ )
maGSC	“multipotent adult Germline Stem Cell”
MCS	“mutiple cloning site”
MEF	Mitose- inhibierte Maus- Fibroblasten
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
μ-	mikro- ( $10^{-6}$ )
n-	nano- ( $10^{-9}$ )
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NES	“nuclear export signals“
NLS	“nuclear localisation signal“
Nr.	Nummer
ORF	“Open Reading Frame”
P..	Passage
p-	piko- ( $1 \times 10^{-12}$ )
Pa	Pascal
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH- Wert (negativ dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> - Ionenkonzentration)

---

PMSG	Pregnant Mare's Serum Gonadotropin
RA	Retinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT- PCR	Reverse Transkriptase- Polymerase- Kettenreaktion
s	Sekunde
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
sek.	sekundär
siRNA	“Small interfering RNA“
SSC	spermatogoniale Stammzellen
SSC (-Puffer)	“Standard Saline Citrat“ (-Puffer)
Stk.	Stück (Anzahl)
Stra8	“Stimulated by retinoic acid gene 8“
Tab.	Tabelle
Taq-	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris- Borat- EDTA (-Puffer)
TC	Teratokarzinom
TE	Tris- EDTA (-Puffer)
Tris	Tris- hydroxymethyl- aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UK	“United Kingdom“
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
üN	über Nacht
USA	“United States of America“
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp

w/v	Gewicht pro Volumen
www	“World Wide Web“
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
z.T.	zum Teil

**Code der Nukleinsäuren**

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Tymin
U	Uracil

## 1. Einleitung

*Stra8* (**S**timulated by retinoic acid gene **8**) ist ein testisspezifisches Gen, das in der prämeiotischen Phase der Spermatogenese exprimiert wird (Oulad-Abdelghani et al. 1996). Im Rahmen einer biologischen Doktorarbeit wurde in unserer Arbeitsgruppe eine transgene Maus generiert, die unter der Kontrolle des 1,4 kb- *Stra8*- Promotors *EGFP* (**E**nhanced **G**reen **F**luorescent **P**rotein) exprimiert (Jaroszynski 2005). Über die EGFP- Fluoreszenz im Testis der transgenen Mäuse ist es möglich, die *Stra8* exprimierenden Zellen der Spermatogenese zu identifizieren. Guan et al. (2006) nutzten diese Möglichkeit, um aus Testes dieser Mäuse Zellen der frühen Spermatogenese zu isolieren. Hierzu wurden die *Stra8/EGFP*- transgenen Mäuse zunächst mit *Rosa 26-LacZ*- transgenen Mäusen verpaart. In dieser transgenen Maus wird  $\beta$ -Gal unter der Kontrolle des *Rosa26*- Promotors ubiquitär exprimiert, womit eine spätere Detektion der Zellen über eine einfache LacZ- Färbung ermöglicht wird. Aus einer Testissuspension der entstandenen doppelt transgenen Mäuse wurden nun mittels EGFP- FACS Sortierung *Stra8* exprimierende Zellen isoliert und unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. Die Kultivierung dieser Zellen unter den Standard- ES- Zell- Bedingungen (mit Leukemia Inhibiting Factor und auf Mitose- inhibierten embryonalen Mausfibroblasten) brachte Kolonien hervor, die denen von embryonalen Stammzellen glichen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass diese Zellen *in vitro* in der Lage sind, in Derivate aller drei Keimblätter zu differenzieren. In immundefizienten Mäusen führten sie zu Teratombildung, und nach Blastozysteninjektion bildeten sie Chimären. Auch konnte gezeigt werden, dass diese Zellen Pluripotenzgene exprimieren (*Oct3/4*, *Nanog*, *Utf1*, *Esg1*, *Rex1*). Die kultivierten Zellen haben somit ähnliche Eigenschaften wie embryonale Stammzellen (ESC) und werden "multipotent adult Germline Stem Cells" (maGSCs) genannt. Die Isolierung und Kultivierung pluripotenter Zellen aus den Testes der transgenen Mäuse warf die Frage auf, welche Rolle das Gen *Stra8* in pluripotenten Zellen besitzt, und ob die Expression von *Stra8* eventuell einen Einfluss auf die pluripotenten Eigenschaften der

Zellen hat. Für diese Annahme spricht, dass *Stra8* sowohl in embryonalen Stammzellen als auch in spermatogonialen Stammzelllinien (maGCSs) auch nach mehreren Passagen noch exprimiert wird (Nolte 2008). Auch die kürzlich von Tedesco et al. (2009) veröffentlichten Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass es zu einem "shuttle" des STRA8- Proteins zwischen Zytoplasma und Nukleus kommt und STRA8 an DNA bindet, sprechen für eine eventuell regulatorische Funktion von *Stra8* in pluripotenten Zellen.

Wie Tabelle 1 zeigt, sind bereits mehrere Keimzell- assoziierte Gene identifiziert, die Einfluss auf die pluripotenten Eigenschaften von Zellen haben.

**Tabelle 1: Aufzählung von Keimzell- spezifischen Genen, die im Zusammenhang mit den pluripotenten Eigenschaften von Zellen stehen**

Keimzell- spezifische Gene	Referenz
<i>Oct4</i>	Pesce and Schöler 2001
<i>Nanog</i>	Chambers et al. 2003
<i>Dppa2</i>	Maldonado-Saldivia et al. 2007
<i>Dppa3</i>	Saitou et al. 2002
<i>Dppa4</i>	Maldonado-Saldivia et al. 2007
<i>Ifitm3</i>	Saitou et al. 2002
<i>Kit</i>	Horie et al. 1991
<i>DAZIL</i>	Clark AT et al. 2004
<i>Akp2</i>	Chiquoine 1954
<i>Sox2</i>	Western et al. 2005
<i>Zfp206</i>	Wang et al. 2007(a+b)

In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle von *Stra8* in pluripotenten Zellen genauer untersucht werden. Die von Wang et al. (2007a) veröffentlichten Untersuchungen über das testisspezifische Gen *Zfp206* und seine Rolle in pluripotenten Zellen sollen als Grundlage dienen. Wang et al. (2007a) konnten zeigen, dass eine Expression von *Zfp206* in Geweben von adulten Mäusen nur im Testis und in Präimplantationsembryonen nachzuweisen ist.

Durch eine stabile Überexpression von *Zfp206* in ES-Zellen wurde gezeigt, dass die Zellen eine geringere Tendenz haben unter Differenzierungsbedingungen (ohne LIF und Feeder Layer, mit Zugabe von Retinsäure) zu differenzieren als Wildtyp- ES- Zellen. Hingegen zeigten ES-Zellen, in denen *Zfp206* durch siRNA herunterreguliert wurde, eine schnellere Differenzierung als unbehandelte Zellen. Untersuchungen des Expressionsmusters in den *Zfp206* überexprimierenden Zellen zeigten, dass in diesen Zellen nicht nur *Zfp206*, sondern auch die Pluripotenzgene *Oct4* und *Nanog* verstärkt exprimiert werden. Hingegen wurden die Gene *Oct4* und *Nanog* beim Einsatz von *Zfp206* siRNA herunter reguliert. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass *Zfp206* eine regulatorische Funktion auf die Pluripotenzgene *Oct4* und *Nanog* hat.

Die bisher publizierten Untersuchungen über die Eigenschaften von *Stra8* beschäftigen sich überwiegend mit einer eventuellen Rolle in der Meiose. So ist es Menke et al. (2003) gelungen, neben der schon bekannten Expression von *Stra8* in frühen Phasen der Spermatogenese auch eine *Stra8*-Expression in sich entwickelnden Ovarien in den Embryonalstadien 12,5 dpc (days post coitum) bis 14,5 dpc zu detektieren. Diese Ergebnisse wurden von Zhou et al. (2008a) teilweise bestätigt. Durch Mikroarray- Analysen zeigte diese Arbeitsgruppe, dass im Embryonalstadium 14,5 dpc eine *Stra8*-Expression im Ovar zu detektieren ist, jedoch nicht in den Stadien 11,5 dpc und 12,5 dpc. Ein weiterer Hinweis dafür, dass *Stra8* eine Rolle in der Meiose spielen könnte, ist die Tatsache, dass sowohl weibliche als auch männliche homozygote *Stra8*- Knock- out- Mäuse infertil sind und die Keimzellen einem Meiosearrest unterliegen (Baltus et al. 2006).



## 1.2 Ziele der vorliegenden Arbeit

Folgende Themen werden in der vorliegenden Arbeit bearbeitet:

1. *Stra8*- Expression in Ovar und Testis post partum
2. Expressionsmuster in ES- Zelllinien und SSC- Zelllinien (maGSCs) auf RNA- und Proteinebene
3. Vergleich der *Stra8*- Expression in ES- Zellen unter verschiedenen Zellkultur- Bedingungen
4. Expression von *Stra8* in verschiedenen Präimplantationsembryonen
5. *Stra8* und seine Rolle in Bezug auf Pluripotenz.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

1 kb- DNA- Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Peqlap, Erlangen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
$\beta$ - Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
BSA	Biomol, Hamburg
Chloroform	T.J. Baker, Deventer, Niederlande
Collagenase	Sigma, Deisenhofen
DH5 $\alpha$ - kompetente- Zellen	Invitrogen, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisendorf
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
DMEM	PAN, Aidenbach
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DNase	Sigma, Deisenhofen
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Appllichem, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	T.J. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FKS	PAN, Aidenbach
Formaldehyd ( $\geq 37\%$ )	Merck, Darmstadt
Formamid (deionisiert)	Sigma, Deisenhofen
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
HBSS- Medium	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
IPTG	Biomol, Hamburg
Isopropanol	T.J. Baker, Deventer, Niederlande

---

Lachsspermien- DNA	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L- Glutamin	Gibco/ BRL, Eggenstein
LIF	Chemicon, Temecula, USA
M2- Medium	Sigma, Deisenhofen
Membran- Hybridisierungspuffer	KPL medac, Wedel
Mitomycin C	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Applichem, Darmstadt
nicht- essentielle Aminosäuren	Gibco/ BRL, Eggenstein
Orange G	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Applichem, Darmstadt
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin	PAN, Aidenbach
Pepton	Roth, Karlsruhe
Phenol	Biomol, Hamburg
Platinum- Taq- Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Applichem, Darmstadt
Radioaktiv markierte Reagenzien:	
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]- dCTP	Perkin, Elmer
Rapid- Hybridization- Puffer	Amersham, Freiburg
Restriktionsenzyme	Invitrogen, Karlsruhe
Retinsäure	Sigma, Deisenhofen
Reverse- Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
RNA- <i>Ladder</i>	Invitrogen, Karlsruhe
RNase- Inhibitor	Boehringer, Mannheim
SDS	Serva, Heidelberg
SOC- Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Sodium- Pyruvat	Gibco/ BRL, Eggenstein
TriReagent	MRC, Cincinnati
Tris	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/ EDTA	PAN, Aidenbach
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween20	Promega, Mannheim

Vector Shield with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame
X- Gal	Biomol, Hamburg
Xylol	Merck, Darmstadt

### 2.1.2 Gebrauchswaren

Gebrauchswaren, die nicht gesondert aufgeführt wurden, wurden von den Firmen Schütt bzw. Krannich, Göttingen, bezogen.

#### 2.1.2.1 Allgemeine Gebrauchswaren

Blottingpapier GB-003	Schleicher & Schüll, Dassel
Glaswaren	Schott, Mainz
Kühlzentrifugenbecher	Nalgene, Rochester, USA
Nitrocellulosefilter BA 85	Schleicher & Schüll, Dassel
Objektträger/ Deckgläschen	Schütt, Göttingen
Objektträger Superfrost	Menzel-Gläser, Braunschweig
PCR- Gefäße	Molecular BioProducts, San Diego, USA
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen ohne Filter	Eppendorf, Hamburg
Quarz- Küvetten	Hellma, Mühlheim
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (RNase- frei)	Brand, Wertheim
Röntgenfilme Hyperfilm™ MP	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
14- ml- Zentrifugenröhrchen	Corning, New York, USA

#### 2.1.2.2 Gebrauchswaren für die Zellkultur

Auslaufpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon- Filter	BD Biosciences, Heidelberg
Filtrationseinheit	Nalgene, Rochester, USA
Kryoröhrchen	Greiner, Nürtingen

Kulturschalen (6 cm und 10 cm)	Nunc, Wiesbaden
Objektträger für die Zellkultur	BD Biosciences, Heidelberg
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Spritzen (5 ml und 10 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
24- Well- Platte	Nunc, Wiesbaden
6- Well- Platte	Nunc, Wiesbaden
13- ml- Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen oder Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Greiner, Nürtingen

### 2.1.3 Geräte

Accu- Jet	Brand, Wertheim
Automated DNA- Sequencer ABI 377	Applied Biosystems, Foster City, USA
Brutschrank IR Autoflow	Sanyo, Tokyo, Japan
CO <sub>2</sub> Water- Jacketed- Incubator	
Fluoreszenzmikroskop BX60	Olympus, Planegg
Inversmikroskop IX81	Olympus, Planegg
Konvokalmikroskop	Olympus, Planegg
Lichtmikroskop	Zeiss, Göttingen
FACScan™ Durchflusszytometer	Becton- Dickinson, Heidelberg
Mikrotom	Leica, St. Gallen, Schweiz
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Primus Cyclor	MWG- Biotech, Ebersberg
PTC-100™ Peltier Thermal Cyclor	MJ Research, BioRad
Sterilbank HERAsafe	Heraeus, Hanau
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Osterode
Zentrifuge Hettich Universal	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Megafuge 1.OR	Heraeus, Osterode

Zentrifuge J2-21  
Zentrifuge 5415 D

Beckmann, München  
Eppendorf, Hamburg

#### 2.1.4 Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte im Dampfdruckautoklaven für 20 min bei 121°C und  $10^5$  Pa im oder durch Sterilfiltration (Porengröße: 0,2  $\mu$ m) bei hitzeempfindlichen Lösungen. Gebrauchswaren wurden autoklaviert oder für 8 - 12 h bei 180°C hitzesterilisiert.

#### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen, die für den routinemäßigen Laborbetrieb notwendig waren, wurden nach Sambrook et al. (1989) angesetzt. Entsprechend den Erfordernissen wurden die Chemikalien in deionisiertem ( $dH_2O$ ), in vollentsalztem (Millipore), in bidestilliertem Wasser ( $ddH_2O$ ) oder in Ampuwa gelöst. Die Lösungen wurden je nach Bedarf dampfdrucksterilisiert, steril filtriert, frisch angesetzt oder aliquotiert und bei -20°C bzw. 4°C aufbewahrt. Die Puffer für Enzyme und für gebrauchsfertige Kits wurden, wie vom Hersteller geliefert, angewendet. Aus den Beipackzetteln ist die Zusammensetzung der Puffer ersichtlich und wird hier nicht weiter aufgeführt.

<b>Blockierlösung</b>	0,2% BSA 0,1% Tween20 in PBS
<b>DNA- Probenpuffer</b>	15% Ficoll 400 200 mM EDTA 1% Orange G
<b>dNTP- Lösung (25 mM)</b>	100 mM dATP 100 mM dCTP 100 mM dGTP 100 mM dTTP

---

<b>IPTG</b>	100 mM in H <sub>2</sub> O
<b>Lysispuffer für Gewebe</b>	50 mM Tris / HCl (pH 8,0) 100 mM EDTA 0,5% SDS
<b>Lysispuffer für Zellen</b>	1 M Tris / HCl (pH 8,5) 0,5 M EDTA 10% SDS 5 M NaCl 10 mg / ml Proteinase K
<b>10x MOPS- Puffer (pH 7.0)</b>	0.2 M MOPS 50 mM NaAc 0.5 M EDTA in DEPC- H <sub>2</sub> O
<b>Paraformaldehydlösung (4%ig)</b>	8 g PFA 200 µl Tween-20 180 ml DEPC-H <sub>2</sub> O 20 ml 10x PBS
<b>SSC (20x)</b>	3 M NaCl 0,3 M Tri- Natriumcitrat (pH 7.0)
<b>Stop- Mix (5x)</b>	15% Ficoll 400 200 mM EDTA 10% Glycerin 0,1 % Orange G
<b>TE- Puffer</b>	1 mM EDTA 10 mM Tris/HCl (pH 8.0)

<b>TBE (5x)</b>	0,45 M Tris / HCl 0,45 M Borsäure 10 mM EDTA (pH 8,5)
<b>Waschlösung I</b>	2x SSC 0,2x SSC
<b>Waschlösung II</b>	0,1% SDS in 0,2x SSC
<b>X- Gal- Lösung</b>	2% X-Gal in Dimethylformamid

### 2.1.6 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Dynamic ET- Terminator Mix	Amersham Biosciences, Freiburg
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices System	Millipore Corporation, Bedford
pGEM®T- Easy Vector System I	Promega, Wisconsin, USA
Immolase- Taq- DNA- Polymerase- System	Bioline, Mannheim
PLATINUM® Taq- DNA- Polymerase- System	Gibco, BRL, Eggenstein
QIAquick® Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder™	Qiagen, Hilden
Rediprime™II Random Prime Labelling System	Amersham Biosciences, Freiburg
Rneasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
SUPERSCRIPT™II RNaseH Reverse- Transkriptase	Invitrogen, Groningen, Niederlande
TriReagent™	Sigma, Deisenhofen



### 2.1.7 Vektoren

pGEM-T Easy	Promega, Madison, USA
pCMV myc	Clontech, Franklin Lakes, USA
pTK hyg	Clontech, Franklin Lakes, USA

### 2.1.8 Bakterien

<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$ (Hanahan 1983) Invitrogen, Groningen, Niederlande
-------------------------	---

#### 2.1.8.1 Medien für die Bakterienkultur

Die Nährmedien für die Bakterienkulturen wurden mit einfach destilliertem Wasser angesetzt. Danach wurden sie autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt. Benötigte Zusätze wurden nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von 50- 60°C hinzugefügt. Agarplatten enthielten 1,5% (w/v) Agarose.

LB- Medium (pH 7,5)	Pepton 5 g Hefeextrakt 2,5 g NaCl 5 g 500 ml H <sub>2</sub> O
Zusätze zur Selektion	Ampicillin (0,1 mg / ml)
Zusätze für Oja- Platten	100 $\mu$ M IPTG 4% X-Gal
Stammlösungen	100 mg/ml Ampicillin in H <sub>2</sub> O 0.2 g/ml IPTG in H <sub>2</sub> O 8% X-Gal in Dimethylformamid

Die Lösungen wurden steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Alle Zusätze, wie Antibiotika, IPTG und X- Gal wurden nach dem Autoklavieren

den abgekühlten Medien (ca. 50°C) hinzugegeben. Flüssigmedien und Platten wurden bei 4°C gelagert.

### 2.1.9 Mausstämme

Die für diese Arbeit verwendeten Mäuse stammten aus Beständen des Institutes für Humangenetik Göttingen. Sie wurden mit einem zwölfstündigen Hell- Dunkel- Rhythmus bei 22°C und  $55 \pm 5\%$  relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Von der Firma ssniff- Spezialdiäten (Soest) wurde das Tierfutter bezogen. Futter und Wasser standen den Mäusen frei zur Verfügung.

### 2.1.10 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	isoliert aus	Referenz
ES RI	Embryonale Stammzellen	Nagy et al. 1993
SSC129SV	Spermatogoniale Stammzellen	Nolte 2008
ES FVB	Embryonale Stammzellen	Nolte 2008
SSC FVB	Spermatogoniale Stammzellen	Nolte 2008
ES C57Bl	Embryonale Stammzellen	Nolte 2008
SSC C57Bl	Spermatogoniale Stammzellen	Nolte 2008
ES dt Stra8	Embryonale Stammzellen	Nolte 2008
SSC15Nr12	Spermatogoniale Stammzellen	Nolte 2008
MEF	Embryonale Fibroblasten	Adham et al. 1997

#### 2.1.10.1 Medien für die Zellkultur

Die für die Anzucht eukaryotischer Zellen benötigten Medien und Zusätze wurden als sterile Lösungen bezogen (Gibco BRL, Eggenstein; PAN, Aidenbach).

#### ESC- Medium

#### DMEM

0,1 mM nicht- essentielle Aminosäuren

1 mM Natriumpyruvat

1  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol

2 mM L- Glutamin

	1 mM Penicillin/ Streptomycin 20% FKS (1 000 U / ml LIF)
<b>FB- Medium</b>	DMEM 2 mM L-Glutamin 1 mM Penicillin / Streptomycin 10% FKS
<b>M2- Medium</b>	5 ml 10 x Hanks 1,25 ml 40 x HEPES 165 µl 300 x Na-Pyruvat 0,25 ml 1 M NaOH 0,5 ml Penicillin (6 mg/ml) Streptomycin (5 mg/ml) 43 ml Ampuwa 0,2 g BSA

Folgende Einfriermedien wurden zur Langzeitlagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff verwendet:

<b>Zellen ohne "Feeder Layer"</b> (MEF- Zellen ("Feeder Layer" siehe 2.2.6))	30% FB- Medium 20% DMSO 50% FKS
<b>Zellen mit "Feeder Layer"</b> (ESC- bzw. SSC- Zellen)	30% ESC- Medium 20% DMSO 50% FKS

Die Einfriermedien wurden angesetzt, steril filtriert und anschließend bei -20°C gelagert.

### 2.1.11 Antikörper

Primärantikörper: anti- STRA8, polyklonaler Antikörper, IgG, Kaninchen (Abcam, Cambridge, UK)

Sekundärantikörper: anti- Kaninchen IgG, Cy3 konjugiert, Ziege (Sigma- Aldrich, Deisenhofen)

### 2.1.12 Sonden

- *Stra8* Als *Stra8*- Sonde wurde der 1,2 kb große ORF von *Stra8* verwendet. Dieser wurde mit den Primern m*Stra8*-ORF-Not1-F und m*Stra8*-ORF-Not1-R amplifiziert, isoliert, in pGEM-T Easy kloniert, sequenziert und ausgeschnitten.
- $\beta$ - Actin Clontech, Heidelberg

### 2.1.13 Oligonukleotide

Alle Primer, die für die Experimente eingesetzt wurden, stammten von der Firma Operon, Köln. Mit Ampuwa wurde eine Konzentration von 100  $\mu$ M (100 pmol /  $\mu$ l) eingestellt und bei -20°C als Stock gelagert. Die Konzentration der eingesetzten Primer lag bei 10 pmol /  $\mu$ l.

#### 2.1.13.1 Primer für RT- PCR (m= mouse):

- mHPRT-F1: 5' – CGTCGTGATTAGCGATGATG – 3'
- mHPRT-R1: 5' – TATGTCCCCCGTTGACTGAT – 3'
- m*Stra8*-F1: 5' – TCACAGCCTCAAAGTGGCAGG – 3'
- m*Stra8*-R1: 5' – GCAACAGAGTGGAGGAGGAGT – 3'
- mZfp206-F2: 5' – CAGTTCAAATTGGCAATGAGCC – 3'
- mZfp206-R2: 5' – GGTCTCCTGCCCTCAGTTTGCG – 3'

### 2.1.13.2 Primer für die Sequenzierung

- ORF-Stra8-Seq-F1: 5' – AACCAACCCAGTGATGATGGG – 3'
- ORF-Stra8-Seq-R1: 5' – CCCATCATCACTGGGTTGGTT – 3'
- ORF-Stra8-Seq-F2: 5' – AGAGAGGTAGAGGAGTACCAG – 3'
- ORF-Stra8-Seq-R2: 5' – CTGGTACTCCTCTACCTCTCT – 3'
- ORF-Stra8-Seq-F3: 5' – ATGTTGCTGAAGTGCCTGGAG – 3'
- ORF-Stra8-Seq-R3: 5' – CTCCAGGCACTTCAGCAACAT – 3'
- Sp6: 5' – TTAGGTGACACTATAGAATACTCAA  
GC – 3'
- T7: 5' – AATACGACTCACTATAGGGCGAATT  
GG – 3'

### 2.1.13.3 Andere Primer

- Stra8/EGFP-F5: 5' – CGTAGTGTGCCAAACTAGTGTGG – 3'
- Stra8/EGFP-R3: 5' – CAGGGTCAGCCTGCCGTAGGTGG – 3'
- mStra8-ORF-Not I-F: 5' – ACCGCGGCCGCAGGTATGGCCACCCC  
TGGAGAAGGCAACCAACCCAGT – 3'
- mStra8-ORF-Not I-R: 5' – TTGCCGCGCCTACCACCTTACAGATC  
GTCAAAGGTCTCCAGGCACTT – 3'

### 2.1.14 Molekulargewichtsstandard

DNA- Längenstandard (1 µg / µl): 1 kb- Leiter (0,12 - 12,2 kb)

Der DNA- Längenstandard wurde nach Herstellerangaben verdünnt und DNA- Probenpuffer hinzugefügt.

### 2.1.15 Datenbanken

Nukleotidsequenzen wurden mit den Sequenzdatenbanken EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>) und GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mit Hilfe des BLAST- Programms (Altschul et al. 1990) analysiert.

## **2.2 Zellbiologische Arbeitsmethoden**

### **2.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen**

Die verwendeten Zellen, welche ausschließlich adhärent wachsen, wurden im entsprechenden Medium bei 37°C kultiviert und zur Einstellung eines günstigen pH-Wertes (alle Medien enthielten NaHCO<sub>3</sub>) mit 5% CO<sub>2</sub> begast. Kurz vor Erreichen einer 100%igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert.

#### **2.2.1.1 Kultivierung von murinen embryonalen Stammzelllinien (ES-Zellen)**

Embryonale Stammzellen sind aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnene pluripotente Zellen, die in der Lage sind, in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren (Beddington und Robertson 1989). Um eine Ausdifferenzierung von ES-Zellen zu verhindern, werden diese auf Mitoseinhibierten Maus- Fibroblasten (Feederzellen) ausplattiert und dem ES-Medium das Zytokin LIF (Leukemia Inhibitory Factor) zugegeben.

#### **2.2.1.2 Kultivierung von “multipotent adult Germline Stem Cells“ (maGSCs)**

Spermatogoniale Stammzelllinien werden aus dem Hoden adulter Mäuse generiert, indem man durch bestimmte Kulturbedingungen die spermatogonialen Stammzellen (SSCs) reprogrammiert. Die so erhaltenen SSC- Zelllinien (auch maGSCs genannt; Guan et al. 2006) besitzen die gleichen Eigenschaften wie ES- Zellen und sind damit als pluripotent anzusehen (z.B. Zovoilis et al. 2008; Zechner et al. 2009; Dressel et al. 2009; Dihazi et al. 2009; Dressel et al. 2010). Auch die Kultur der SSC- Zelllinien erfolgt analog zu ES- Zellen (2.2.1.1).

#### **2.2.1.3 Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten**

Für die Routinekultur der maGSC- und ES- Zellen wurden mitotisch inaktivierte embryonale Fibroblasten (MEFs) verwendet, die einen sogenannten “Feeder- layer“ bilden. Um die mitotische Teilung der Zellen zu verhindern, erfolgt eine Behandlung mit dem Spindelgift Mitomycin C (Martin

und Evans 1975). Anschließend werden die Fibroblasten in einer gleichmäßigen Zellschicht plattiert und die anderen Zellen darauf ausgesät.

### **2.2.2 Isolation von murinen embryonalen Fibroblasten**

Zur Isolation der embryonalen Fibroblasten wurden 14,5 Tage alte Maus-Embryonen (errechnet nach Vaginal Plug- Check) isoliert und in PBS gewaschen. Die Abdomina der Embryonen wurden zur Entnahme der inneren Organe eröffnet. Die Extremitäten und Köpfe der Embryonen wurden abgetrennt und verworfen. Die ausgeräumten Rümpfe wurden dann zerkleinert und in einen Kolben mit Glaskügelchen überführt. Die Suspension wurde nach Zugabe von 20 ml Trypsin/EDTA und 1 ml DNase 30 min bei 37°C unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 10 min bei 270 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in FB-Kulturmedium resuspendiert sowie in geeignete Kulturgefäße überführt. Um nicht adhärente Zellen zu entfernen, wurde etwa 24 h später das Kulturmedium gewechselt.

### **2.2.3 Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen**

Um Zellen zu kryokonservieren, wurde eine konfluent bewachsene Platte mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Durch Zugabe des in dem entsprechenden Kulturmedium enthaltenen FKS wurde das Trypsin wieder inaktiviert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 270 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl Kulturmedium resuspendiert und in ein mit 500 µl Gefriermedium gefülltes Kryoröhrchen überführt. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Zellen langsam eingefroren.

Da das Auftauen von eingefrorenen Zellen rasch erfolgen muss, wurden diese in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Zur schnellen Inaktivierung des DMSO- enthaltenden Gefriermediums wurden die Zellen anschließend in möglichst kurzer Zeit in einer größeren Menge Kulturmedium aufgenommen und für 5 min bei 270 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das übrig gebliebene Pellet in der für das Ausplattieren

benötigten Menge Kulturmedium resuspendiert und in ein Kulturgefäß überführt.

#### **2.2.4 Passagieren von eukaryotischen Zellen**

Für das Passagieren der kultivierten Zellen wurden die konfluent bewachsenen Platten zunächst mit PBS gewaschen. Je nach Größe des Kulturgefäßes wurden danach 1-5 ml Trypsin hinzugefügt. Unter dem Lichtmikroskop wurde nach circa 5- minütiger Inkubation bei 37°C das Ablösen der Zellen beurteilt. Hatten sich die Zellen vom Kulturgefäß gelöst, wurde zur Inaktivierung des Trypsins das gleiche Volumen (1-5 ml) des FKS-enthaltenden Kulturmediums zugegeben und gut resuspendiert. Nun wurden die Zellen für 5 min bei 270 x g abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes das Zellpellet in entsprechender Menge (2-10 ml) Kulturmedium aufgenommen und anschließend in geeigneten Kulturgefäßen ausplattiert. Zur Entfernung der nicht adhärenen Zellen erfolgte ein Mediumwechsel etwa 24 h später.

#### **2.2.5 Gelatine- Behandlung von Kulturgefäßen**

Abhängig von der Kulturgefäßgröße wurden zur Beschichtung etwa 1-10 ml sterile 0,1%ige Gelatine genutzt. Vor der weiteren Verwendung wurden die gelatinebeschichteten Kulturgefäße für mindestens 2 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, inkubiert und die überstehende Gelatine entfernt.

#### **2.2.6 Mitomycin- Behandlung von embryonalen Fibroblasten**

Zur Mitomycin- Behandlung von embryonalen Fibroblasten wurde Mitomycin C in einer Endkonzentration von 10 µg / ml eingesetzt. Dieses wurde zu einer mit embryonalen Fibroblasten konfluent bewachsenen Platte hinzugegeben. Nach etwa dreistündiger Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wurden die Fibroblasten zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert und in Gelatinebeschichteten Kulturgefäßen ausplattiert (Fibroblasten, die mit Mitomycin behandelt wurden, können nicht mehr anwachsen, sie werden nur durch die Gelatine am Boden des Kulturgefäßes fixiert).



### **2.2.7 Induktion von eukaryotischen Zellen mit Retinsäure**

Die hoch wirksame aktive Form des Vitamin A, Retinsäure, beeinflusst die Proliferation und Differenzierung von Zellen.

Für die Induktion der Zellen zur Differenzierung wurde  $10^{-6}$  M Retinsäure eingesetzt und die Zellen für 24 h bis zu 15 Tagen inkubiert. Nach dem Mediumwechsel wurde dem Kulturmedium die Retinsäure direkt aus der Stocklösung ( $10^{-3}$  M) beigemischt.

### **2.2.8 Herstellung einer testikulären Zellsuspension**

Die frisch isolierten Testes wurden zunächst in PBS gewaschen und in Kollagenase (1 mg / ml in HBSS) gegeben. Anschließend wurde die Tunica albuginea entfernt, die Tubuli seminiferi mechanisch zerkleinert und für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde in HBSS- Medium gewaschen und für 5 min bei 270 x g abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Danach erfolgte die Aufnahme des Pellets in 1 M EDTA mit 0,25% Trypsin. Nach 5- minütiger Inkubation bei 37°C wurden 20% des Gesamtvolumens an FKS zugegeben um die Reaktion zu stoppen. Die Suspension wurde zur Entfernung größerer Stücke durch Falcon- Filter mit 70 µm Porengröße filtriert. Abschließend wurde das Filtrat 5 min bei 270 x g zentrifugiert und das Pellet in 100 µl PBS aufgenommen.

### **2.2.9 FACS- Sortierung**

Die FACS- Sortierung ermöglicht die Identifizierung bestimmter Zelltypen aufgrund ihrer Größe, Granularität, oder Fluoreszenzen. Bei der vorliegenden Arbeit erfolgte die Sortierung mittels der EGFP- Expression. EGFP- exprimierende Zellen exzitieren Fluoreszenzlicht bei 510 nm.

Die zu sortierende Zellsuspension wurde vor der Messung zunächst mit PBS gewaschen, trypsiniert, abzentrifugiert und dann erneut mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Sortierung der Zellen im Durchflusszytometer. Als Negativkontrolle dienten nicht- EGFP- exprimierende Zellen. Nach der Sortierung wurden die EGFP- positiven Zellen abzentrifugiert. Sie wurden

mit PBS gewaschen und zur Ausplattierung in ein passendes Kulturgefäß mit der entsprechenden Menge Kulturmedium aufgenommen.

## **2.3 Histologische Arbeitsmethoden**

### **2.3.1 Fixierung von Zellen und Geweben**

#### **2.3.1.1 Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd**

Für die Fixierung wurden die Zellen auf Zellkulturobjektträger mit zwei Kammern überführt und bis zur benötigten Konfluenz bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Vor der eigentlichen Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und dann 15 min mit 4%igem Paraformaldehyd bei 4°C inkubiert. Vor der jeweiligen Untersuchung der fixierten Zellen wurden diese erneut dreimal mit PBS gewaschen.

#### **2.3.1.2 Fixierung von Organen und Geweben**

Die Organe wurden in Paraformaldehyd gelegt und für zwei Tage bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden sie in 70% EtOH gelegt und üN unter Schütteln gewaschen. Zur Entwässerung wurden die Organe nun in eine aufsteigende Ethanolreihe (1x 15 min 70% EtOH, 3x 20 min 80% EtOH, 4x 30 min 90% EtOH, 4x 30 min 96% EtOH, 5x 20 min 100% EtOH) gelegt und üN in Isopropanol gegeben und geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Gewebe für jeweils 30 min in verschiedenen Isopropanol- Xylol- Gemischen (75:25, 50:50, 25:75) inkubiert, nachfolgend in 100% Xylol überführt und üN geschüttelt. Die Gewebe wurden in Paraffin eingebettet und zur Übertragung auf die Objektträger mit dem Mikrotom in 5 µm dünne Schnitte geschnitten.

### **2.3.2 Färbung von Zellen und Gewebeschnitten**

#### **2.3.2.1 Immunzytochemische Färbung von eukaryotischen Zellen**

Die in Paraformaldehyd fixierten Zellen wurden zur Blockierung der unspezifischen Antikörperbindungsstellen mit 1 ml Blockierlösung je Kammer versetzt und 1-4 h bei RT inkubiert. Nach dem Blocken wurde der primäre Antikörper in einer 1:200 Verdünnung in PBS auf die Zellen gegeben und in eine Feuchtkammer bei 4 °C üN inkubiert. Die dort herrschende Feuchtigkeit

verhindert die Austrocknung der Zellen. Am nächsten Tag erfolgte die Abnahme der primären Antikörper, anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde in einer 1:500-Verdünnung in PBS zu den Zellen gegeben und in der Feuchtkammer für 2-3 h bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit DAPI-haltigem VectaShield versehen, mit einem Deckgläschen eingedeckelt und dieser mit Nagellack versiegelt. Die Objektträger wurden bei -20°C aufbewahrt.

### **2.3.2.2 Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten**

Für die immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten mussten diese zunächst rehydriert werden. Hierfür wurden die Schnitte zunächst zur Entfernung des Paraffins dreimal für 3 min in 100% Xylol gegeben. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (je 2 min 100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50% EtOH) gewaschen und in dH<sub>2</sub>O gegeben. Die immunozytochemische Färbung der Gewebe wurde nach der Rehydrierung wie bei den eukaryotischen Zellen vorgenommen.

## **2.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

Die Durchführung der molekularbiologischen Methoden erfolgte nach den Standardprotokollen von Sambrook et al. (1989).

### **2.4.1 Klonierung von DNA- Fragmenten**

#### **2.4.1.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Die Spaltung der DNA wurde mithilfe von Restriktionsenzymen verschiedener Hersteller in einem Volumen von 10 oder 20µl bei enzymespezifischer Temperatur für 45 bis 150 min durchgeführt. Von dem benötigten Enzym wurden standardmäßig 10 U pro µg eingesetzt und die vom Hersteller angegebene Menge des optimalen Puffers hinzugefügt. Die "Insert"-Isolierung erfolgte unter Verwendung von 10 µg Plasmid- DNA mit 100 U Enzym (10 U/µl) in Reaktionsansätzen von 100-200 µl.

Für die gleichzeitige restriktionsenzymatische Spaltung mit zwei unterschiedlichen Enzymen wurde, soweit möglich, ein mit beiden Enzymen kompatibler Puffer eingesetzt. Zur Verhinderung von unspezifischen Reaktionen der Restriktionsenzyme wurde dem Restriktionsansatz 1 µg BSA (10 mg/ml) zugegeben. Zur Vollständigkeitskontrolle des Verdau wurde eine Agarosegelelektrophorese (siehe auch 2.4.5.1) mit einem Aliquot durchgeführt.

#### **2.4.1.2 Dephosphorylierung von Plasmid- Vektoren**

Die mittels Restriktionsendonukleasen linearisierten Plasmid- Vektoren wurden an ihren 5'- Phosphatgruppen hydrolysiert, um eine Rezirkulation unter Ligationsbedingungen zu verhindern. Zur Hydrolyse der 5'- Phosphatgruppen wurden zu 16,5 µl linearisiertem Plasmid 1,5 µl Antarktische- Phosphatase und 2 µl Antarktische- Phosphatase- Puffer gegeben. Der 20 µl Ansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Antarktischen- Phosphatase wurde der Ansatz anschließend 5 min bei 65°C erhitzt.

#### **2.4.1.3 Ligation von PCR- Produkten in pGEM-T Easy**

Die PCR- Produkte wurden mittels des pGEM-T Easy Vektorsystems (Promega) kloniert. Durch pGEM-T Easy können aufgereinigte PCR- Produkte in den im System enthaltenen linearisierten Vektor integriert werden. Möglich ist dies durch den artifiziellen 3'- Thyminüberhang des Vektors, der komplementär zum 3'- Adeninüberhang der PCR- Produkte ist, den die meisten DNA- Polymerasen erzeugen (Clark JM 1988).

Die Ligation erfolgte in einem 10 µl Ansatz. Hierzu wurden 50 ng des Vektors in drei- bis fünffachem molarem Überschuss mit dem aus dem Agarosegel isolierten Insert gegeben und mit 1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl) und 5 µl 2x Ligasepuffer gemischt. Der Ansatz wurde üN bei 16°C inkubiert.

#### **2.4.1.4 Ligation von PCR- amplifizierten DNA- Fragmenten**

Die Restriktionsschnittstellen der geschnittenen und aufgereinigten DNA-Fragmente waren komplementär zu denen des linearisierten und dephosphorylierten Plasmid- Vektors und konnten so direkt ligiert werden.

In einen 10 µl Ansatz wurden Vektor und Insert im Verhältnis eins zu zwei zu 1 µl 10x Ligasepuffer gegeben. Zunächst wurde der Ansatz für 5 min bei 65°C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt bevor 1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl) hinzugegeben wurde. Die Reaktion erfolgte üN bei 16°C.

#### **2.4.1.5 Transformation kompetenter *Escherichia- coli*- Zellen mittels Hitzeschock**

50 µl einer *Escherichia- coli*- DH5α- Suspension wurden auf Eis langsam aufgetaut. Die Bakterien wurden anschließend vorsichtig gemischt und 2 µl des zu transformierenden Vektors zugegeben. Anschließend erfolgte eine 20 minütige Inkubation des Ansatzes auf Eis. Um die Bakterien zu stimulieren, die DNA aufzunehmen, wurden sie einem Hitzeschock für 1 min bei 42°C ausgesetzt. Der Ansatz wurde danach für 5 min auf Eis gegeben. Nach Zugabe von 950 µl SOC- Medium wurde für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden nun auf den entsprechenden Selektivplatten ausplattiert und bei 37°C üN inkubiert.

### **2.4.2 Isolierung von Nukleinsäuren**

#### **2.4.2.1 Minipräparation von Plasmid- DNA aus *Escherichia coli***

Die Isolierung von Plasmid- DNA im analytischen Maßstab (Minipräparation) wurde mit den Lösungen P1, P2 und P3 von Qiagen mittels einer modifizierten Form der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) vorgenommen. Zur Anzucht einzelner *Escherichia- coli*- Kolonien wurden diese in 5 ml LB- Medium, welches mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, gegeben und üN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Sicherung des angezüchteten Bakterienstocks wurden 700 µl der Gesamtmenge abgenommen und mit 300 µl sterilem Glycerin gut durchmischt. Der Stock wurde bei -80°C gelagert.

Für die eigentliche Minipräparation der Kulturen wurden diese bei 4°C und 4.000 x g für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl kaltem Puffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl Puffer P2 die alkalische Lyse der Bakterienzellen eingeleitet. Der Ansatz wurde nach vorsichtiger Mischung 5 min bei RT inkubiert. Um die alkalischen Lyse zu stoppen, wurden nun 150 µl Puffer P3 zugegeben. Die Trennung der Proteine und genomischen DNA vom Plasmid erfolgte durch 20minütige Zentrifugation bei 15.000 x g. Der Plasmid- haltige Überstand wurde durch Zugabe von 1000 µl Isopropanol gefällt und 15 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 70% EtOH gewaschen, bei RT getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **2.4.2.2 Endotoxin- freie Maxipräparation von Plasmid- DNA aus *Escherichia coli***

Zur Präparation qualitativ hochreiner Plasmid- DNA in größeren Mengen für Transfektionen wurde das Maxi- Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzelle (Birnboim und Doly 1979). Zur Anzucht der *Escherichia- coli*- Kolonien wurden diese in 5 ml mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten LB- Medium für 10 h bei 37°C geschüttelt. Die angezüchteten Bakterien wurden anschließend in 250 ml des LB- Mediums überführt und bei 37°C üN unter Schütteln inkubiert.

Die Kulturen wurden am nächsten Tag für 15 min bei 4000 x g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml kaltem Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer P2 wurde die alkalische Lyse eingeleitet. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei RT. Durch die Zugabe von 10 ml Puffer P3 wurde die Lyse gestoppt und das Lysat durch den QIAfilter- Maxi- Cartridge gedrückt. Die Filtration diente der Entfernung der Zelltrümmer, Proteine und Salzkomplexe. Dem Lysat wurden 2 ml Puffer ER beigemischt. Es folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis. Die Äquilibration der Anionenaustauschersäule mit 10 ml Puffer QBT erfolgte während der Inkubationszeit. Das Lysat wurde anschließend auf die Säule gegeben. Die gebundene DNA wurde anschließend zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen und mittels 15 ml Puffer QN in ein steriles Endotoxin- freies

Zentrifugenröhrchen aus Glas eluiert. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol kam es zur Fällung der DNA. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 10.000 x g bei 4°C. Das Pellet wurde in 5 ml 70% EtOH in Endotoxin– freiem Wasser gewaschen, getrocknet und in 100-150 µl Ampuwa aufgenommen.

#### **2.4.2.3 Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen**

(nach Laird et al. 1991)

Für die Isolierung genomischer DNA aus Zellen wurden konfluent bewachsene 6- oder 24- Well- Kulturplatten zunächst mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von Lysispuffer für Zellen und Proteinase K in einem Volumen von 1/100 erfolgte die Inkubation bei 37°C üN. Am nächsten Tag wurde zunächst zentrifugiert und der Überstand mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, um die DNA zu fällen. Anschließend wurde bei 15.000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal in 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA in 80 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **2.4.2.4 Isolierung von genomischer DNA aus Geweben**

(nach Laird et al. 1991)

Für die Genotypisierung von Mäusen wurde diesen ein 1 cm langes Stück der Schwanzspitze abgetrennt. Dieses wurde in 700 µl Lysispuffer für Gewebe und 35 µl Proteinase K (10 µg / µl) überführt und dann üN bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, um die DNA zu fällen. Nach 5 minütigem Zentrifugieren bei 15.000 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend in 80 µl Ampuwa aufgenommen.

#### **2.4.2.5 Isolierung von Gesamt- RNA**

Um die Glaswaren von RNasen zu befreien, wurden diese für die Experimente mit RNA bei ca. 200 °C für mehrere Stunden sterilisiert. Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurde bei der

Gewebepräparation und in der Zellkultur stets mit Handschuhen gearbeitet. Das frisch präparierte Gewebe und die Zellen wurden bis zur RNA- Isolierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und die anschließenden Arbeitsschritte auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt.

#### **2.4.2.6 Isolierung von Gesamt- RNA aus eukaryotischen Zellen**

Für die Isolierung von RNA wurde TriReagent von Sigma genutzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, anschließend wurde der Lysispuffer hinzugeben und 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und die Zellsuspension in ein RNase- freies Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,2 Volumen Chloroform, wurde der Ansatz gut gemischt, 15 min bei RT inkubiert und dann 15 min bei  $15.000 \times g$  bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Es folgte die Abnahme der oberen RNA- enthaltenden Phase und deren Überführung in ein neues Reaktionsgefäß. Zur Fällung der RNA wurden 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation ( $15.000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und das Waschen des Pellets in 70% EtOH. Das Pellet wurde bei RT getrocknet bevor es in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und 10 min bei  $55^{\circ}\text{C}$  inkubiert wurde.

#### **2.4.2.7 Isolierung von RNA aus Geweben**

Zur Isolierung von RNA aus Geweben wurde 100 mg frisches Gewebe in 1 ml Lysispuffer (TriReagent von Sigma) gegeben. Es erfolgte die Homogenisierung. Die Suspension wurde für 5 min bei RT inkubiert bevor 200  $\mu\text{l}$  Chloroform hinzugegeben wurden. Die Folgeschritte entsprachen der Methode 2.4.2.6.

#### **2.4.2.8 Isolierung von RNA aus Embryonen**

Zur Isolierung von Gesamt- RNA aus Embryonen wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Zunächst wurden die isolierten Embryonen (50 bzw. 100). mit 250  $\mu\text{l}$  RLT- Puffer (beinhaltet  $\beta$ -Mercaptoethanol) gut gemischt und der Ansatz auf eine QIASHredder- Säule mit Sammelgefäß überführt. Nach 2-



minütiger Zentrifugation mit 12000x g bei RT wurde dem Ansatz 1 Volumen 70%iges Ethanol zugeführt. Die Lösung wurde auf die RNeasy- mini- Spin-Säule gegeben und für 15 s mit 8000x g bei RT zentrifugiert. Die RNA, die im Filter gebunden wurde, wurde mit 700 µl RW1- Puffer und anschließend 2x mit 500 µl RPE- Puffer durch 15- sekundige Zentrifugation gewaschen. Zur Trocknung der Membran wurde diese 2 min mit 8000x g bei RT zentrifugiert. Die gewonnene RNA wurde mit 30 µl RNase- freiem H<sub>2</sub>O aus dem Filter eluiert.

### **2.4.3 Herstellung von komplementärer DNA durch Reverse Transkription**

Die Reverse- Transkriptase- PCR (RT- PCR) wurde für Genexpressionsuntersuchungen verwendet. Sie benötigt eine DNA- Matrize als Substrat, so dass die isolierte RNA zunächst einmal mittels Reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden muss. Die benötigte doppelsträngige Ansatzstelle für die SuperScript- II- Reverse- Transkriptase wird durch den Oligo- dT- Primer und die PolyA- Sequenz der mRNA gebildet.

Für die Reverse Transkription wurden 5 µg RNA, 1 µl dNTP- Mix und 1 µl Oligo-dT- Primer mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 13 µl aufgefüllt. Die Lösung wurde für 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend 4 µl 5x First- Strand- Puffer und 2 µl 0,1 M DTT beigemischt. Nach Inkubation für 2 min bei 42°C erfolgte die Zugabe von 1 µl (200 U) SuperScript- II- Reverse- Transkriptase. Die cDNA- Synthese wurde gestartet. Nach 50 min wurde die Reaktion durch eine 15- minütige Inkubation bei 70°C gestoppt.

### **2.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Durch die photometrische Messung der Absorption wurde die Konzentration der Nukleinsäuren bestimmt. 2 µl der zu messenden Probe wurden hierzu mit 398 µl sterilem H<sub>2</sub>O gemischt. Die Messung erfolgte bei 260 nm und 320 nm in einer Quarzküvette gegen 400 µl steriles H<sub>2</sub>O. Mit folgender Formel wurde die Konzentration berechnet:

$$C = (E_{260} - E_{320}) \times f \times c$$

C = Konzentration der Probe in  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$

E<sub>260</sub> = Absorption der Probe bei 260 nm

E<sub>320</sub> = Absorption der Probe bei 320 nm

f = Verdünnungsfaktor

c = Konzentration / Absorption

## **2.4.5 Gelelektrophoretische Methoden**

### **2.4.5.1 Agarosegelelektrophorese von DNA**

Für die Auftrennung von DNA- Fragmenten wurden Agarosegele verwendet. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden die Gele in einer 0,8% bis 1,5%igen Agarosekonzentration in 0,5fachem TBE- Puffer hergestellt. Zur vollständigen Auflösung der Agarose wurde der Ansatz aufgeköcht und anschließend Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hinzugegeben. Nachdem die Gele in eine Gelkammer gegossen worden waren, erfolgte die Abkühlung bei 4°C bis zur Aushärtung. Die Gele wurden mit 0,5fachem TBE- Puffer überschichtet. Nach Auftragung der mit Stop- Mix vermischten DNA wurde im Spannungsbereich von 60 bis 120 V die Elektrophorese durchgeführt. Die DNA- Fragmente wurden durch das interkalierende Ethidiumbromid unter UV- Licht bei 354 nm als Banden sichtbar. Dadurch wurden die Analyse sowie die photographische Dokumentation der Elektrophorese auf dem UV- Transilluminator möglich. Durch den Vergleich mit einer 1- kb- DNA- Leiter als Längenstandard erfolgte die Größenbestimmung der DNA- Fragmente.

### **2.4.5.2 Agarosegelelektrophorese von RNA**

(Hodge 1994)

Dem 1%igen Agarosegel (gelöst in 1x MOPS- Puffer, angesetzt mit DEPC- H<sub>2</sub>O) wurde eine Formaldehyd-Lösung hinzugegeben (Endkonzentration: 6.6%), um die Rückbildung der Sekundärstruktur der RNA während der Gelelektrophorese zu vermeiden. Für die Auftrennung der RNA wurden folgende Reagenzien zu einem Gesamtansatz von 20  $\mu\text{l}$  zusammengegeben:

x µl	10-20 µg Gesamt- RNA
2 µl	10x MOPS- Puffer
8 µl	deionisiertes Formamid
3 µl	Formaldehyd (37%ige Lösung)
1.5 µl	Ethidiumbromid
20 µl	Gesamtansatz, aufgefüllt mit DEPC- H <sub>2</sub> O.

Zur Denaturierung wurde der Ansatz für 10 min auf 65°C erhitzt und anschließend zur Abkühlung 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 0.2 Volumen Stop- Mix zu den RNA- Proben erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von 20 V bei 4°C üN.

## **2.4.6 Aufreinigung von DNA**

### **2.4.6.1 Linearisierung und Aufreinigung von Konstrukten vor der Transfektion**

Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurden die Konstrukte vor der Transfektion linearisiert. Es wurden ca. 100 µg der DNA in einem Gesamtansatz von 100 µl mit 80-100 U eines geeigneten Restriktionsenzymen angesetzt und üN bei 37°C verdaut. Zur Kontrolle der Restriktion wurden anschließend 3 µl des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach Sicherstellung einer erfolgreichen Linearisierung der DNA wurde eine Phenol- Chloroform- Extraktion des Ansatzes durchgeführt. Um die Sterilität gewährleisten zu können, wurde unter der Sterilbank gearbeitet. Für die Phenol- Chloroform- Extraktion wurde der Ansatz zunächst mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 400 µl aufgefüllt. Anschließend wurden jeweils 200 µl Phenol und Chloroform zugegeben und sorgfältig gemischt. Nach 15- minütiger Zentrifugation bei 15.000 x g wurde die wässrige obere Phase in ein neues Reagenzgefäß, welches 400 µl Chloroform enthielt, überführt. Nach sorgfältigem Mischen wurde nochmals für 15 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Sodann erfolgte erneut die Abnahme und Überführung der oberen Phase in ein neues, steriles Reaktionsgefäß und die Zugabe von 350 µl Isopropanol

zur Fällung der DNA. Der Ansatz wurde für 15 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das DNA- enthaltende Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl PBS aufgenommen. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde photometrisch gemessen und zusätzlich zur Kontrolle eine Agarosegelelektrophorese (2.4.5.1) mit 2 µl der DNA durchgeführt.

#### **2.4.6.2 Isolierung von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen**

Um DNA- Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren, wurde das QIAquick® Gel Extraktion Kit verwendet. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA wurde das Gel auf einen Transilluminator unter UV- Licht (354 nm) gelegt, das entsprechende DNA- Fragment mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten und in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde das DNA- Fragment gewogen, die entsprechende Menge des im Kit enthaltenen QG- Puffers hinzugegeben und für 10 min bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde auf eine der im Kit enthaltenen Säulen gegeben und für 1 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Die nun in der Säule gebundene DNA wurde dann mit 750 µl Puffer PE gewaschen und zur Entfernung der restlichen Flüssigkeit erneut für 1 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Zur Eluierung der DNA wurden 50 µl EB Puffer auf die Säule gegeben und nach kurzer Inkubation erneut zentrifugiert.

#### **2.4.7 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR- Technik ist eine enzymatische Methode für die *in- vitro*- Amplifikation spezifischer DNA- Fragmente (Saiki et al. 1988). Ausschlaggebend für die Spezifität dieser Amplifikation sind zwei Oligonukleotidprimer, welche das zu amplifizierende DNA- Fragment flankieren und nach einer Denaturierung durch Hitze an den komplementären Strängen binden. Die Synthese des gewünschten DNA- Fragments erfolgt entlang der Sequenz zwischen den Oligonukleotidprimern durch die hitzestabile DNA- Polymerase des Archaeobakteriums *Thermus aquaticus*

(Taq- Polymerase) (Chien et al. 1976). Die optimale Temperatur der Taq- Polymerase liegt bei 72°C. Die exponentielle Vermehrung des entsprechenden DNA- Fragments wird durch wiederholte Zyklen von Denaturierung der DNA- Stränge, Anlagerung der Primer ("Annealing") und DNA- Synthese ("Elongation") erreicht. Die Automatisierung der PCR in Thermocyclern wird durch den Einsatz der hitzestabilen Taq- Polymerase ermöglicht.

#### 2.4.7.1 PCR an Plasmid- DNA

Um nach Transformation und Minipräparation die Integration der richtigen Sequenz zu bestätigen und anschließend zu sequenzieren, wurde eine PCR an Plasmid- DNA durchgeführt. Hierfür kam das Immolase- Taq- DNA- Polymerase- System zum Einsatz. Für einen Gesamtansatz von 25 µl wurden folgende Reagenzien benötigt:

x µl Plasmid- DNA (30 - 50 ng)  
 0,5 µl Primer 1 (10 pmol / µl)  
 0,5 µl Primer 2 (10 pmol / µl)  
 1 µl dNTP- Mix (je 10 mM)  
 2,5 µl 10x PCR- Puffer  
 1,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,5 µl Immolase- Taq- DNA- Polymerase (5 U / µl)  
 auf 25 µl mit sterilem H<sub>2</sub>O.

Für die PCR wurden die Ansätze in einem Thermocycler mit nachfolgend aufgeführtem Programm inkubiert:

5 min	95°C	Vordenaturierung	} 30 - 35 Zyklen
30 sec	95°C	Denaturierung	
45 sec	55 - 68°C	Annealing	
1 - 2 min	72°C	Elongation	
7 min	72°C	Auffüllreaktion	

Die jeweilige spezifische Annealing-Temperatur wurde je nach Kombination der Primer verändert, um die für die verwendeten Primerpaare optimale Temperatur zu finden. Mittels Agarose- Gelelektrophorese wurde das Produkt der PCR nach der Amplifikation überprüft.

#### **2.4.7.2 PCR an genomischer DNA**

Zur Amplifizierung von Sonden für die Hybridisierung und für die Genotypisierung von Mäusen und Zellen wurde eine PCR an genomischer DNA durchgeführt. Die Vorgehensweise bezüglich der Ansätze und PCR-Programme entsprach der unter 2.4.8.1 beschriebenen.

#### **2.4.7.3 RT- PCR**

Die RT- PCR (Reverse Transkriptions- PCR) wird zur Amplifikation von cDNA- Sequenzen genutzt. Die cDNA- Sequenzen werden zuvor durch *in-vitro*- Transkription mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus mRNA erzeugt. Kleinste Transkriptmengen von bestimmten Genen in Organen und Zellen können so mittels RT- PCR detektiert werden. Es wurde wie unter 2.4.8.1 verfahren. Die Ansätze und Programme wurden auch hier für jedes Primerpaar spezifisch durchgeführt.

#### **2.4.7.4 Sequenzierung von PCR- Produkten**

(nach Sanger et al. 1977)

Die Sequenzierung von PCR- Produkten nach dem Kettenabbruchverfahren beruht auf dem Prinzip statistisch unterbrochener DNA- Neusynthese durch den Einbau von Didesoxynukleosiden (ddNTPs). Bei dieser Methode bindet sich analog zu einer PCR ein sequenzspezifischer Primer an die denaturierte DNA. Eine hitzestabile DNA- Polymerase kann so einen komplementären DNA- Strang synthetisieren. Anders als bei der PCR werden nun jedoch nicht nur dNTPs verwendet, sondern zusätzlich vier unterschiedliche ddNTPs. Diese sind mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Nach Einbau der ddNTPs bei der Synthese kommt es zu einem Strangabbruch, so dass per Zufall unterschiedlich große DNA- Fragmente

entstehen. Die Position des Kettenabbruchs kann nach einer elektrophoretischen Auftrennung durch Fluorographie sichtbar gemacht werden. Ein Rückschluss auf die Sequenz wird hierdurch möglich.

Folgender Reaktionsansatz wurde für die Sequenzanalyse verwendet:

0,5 - 2 µl PCR- Produkt (1 - 1,5 µg)  
1 µl Primer (10 pmol / µl)  
4 µl DYEnamic™ ET-Mix (dNTPs, ddNTPs, Taq- DNA- Polymerase,  
Reaktionspuffer)  
auf 10 µl mit sterilem H<sub>2</sub>O.

Folgendes Programm wurde für die Kettenabbruchreaktion in einem automatischen Thermocycler verwendet:

40 sec	95°C	Vordenaturierung	} 25 Zyklen
20 sec	95°C	Denaturierung	
25 sec	55 - 68°C	Annealing	
1 min	72°C	Elongation	

Für die automatische Sequenzierung mit dem Sequenzierer MegaBace1000 wurden die Proben mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Durch den Vergleich mit der Referenzsequenz ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) erfolgte die Sequenzanalyse.

#### **2.4.8 Radioaktive Markierung von DNA ("random prime labelling")**

(Feinberg und Vogelstein 1983)

Die DNA- Fragmente wurden durch die "random prime labelling"- Methode für Hybridisierungsexperimente radioaktiv markiert (Feinberg und Vogelstein 1983). Das Ready prime™ II-random prime labelling- System wurde zum Einbau von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP für die Markierungsreaktion genutzt. Für die Denaturierung der DNA wurden 2,5–25 ng DNA in 46 µl TE- Puffer gegeben und für 2 min bei 95 °C inkubiert. Nach Abkühlung wurde der Ansatz in das

Reaktionsgefäß mit dem Ready- prime- Pellet (dATP, dGTP, dTTP, Klenow Fragment 4-8 U) überführt und 40 µCi [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz zur Entfernung der nicht eingebauten Nukleotide (dNTPs und [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP) auf eine MicroSpin- Säule (Amersham Pharmacia) gegeben. Anschließend konnte die so gereinigte und markierte Sonde entweder bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert oder aber nach 10- minütiger Denaturierung bei 95°C sofort eingesetzt werden.

## **2.4.9 Transfertechniken und Hybridisierung**

### **2.4.9.1 Transfer von RNA aus Agarosegelen: Northern- Blotting**

Der Transfer von RNA auf nukleinsäurebindende Membranen wird als Northern- Blotting bezeichnet. Für das modifizierte Kapillarblotting- Verfahren wurde der Turbo Blotter™ der Firma Schleicher & Schüll verwendet, mit dessen Hilfe man RNA auf eine Hybond- C- Nitrozellulose- Membran mit nukleinsäurebindenden Eigenschaften übertragen kann. Der Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten RNA auf die Hybond- C- Nitrozellulose- Membran erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Positionen der Geltaschen wurden auf der Membran markiert und das Gel anschließend entfernt. Bevor die Membran zur Fixierung der RNA für 2-3h bei 80°C gebacken wurde, wurde die Spur des RNA- Längenstandards abgeschnitten.

### **2.4.9.2 Radioaktive Hybridisierung von Northern- Blots**

(Denhardt 1966)

Für die radioaktive Hybridisierung der Hybond- C- Nitrozellulose- Membran wurde diese für 10 min in 2x SSC- Lösung eingeweicht. Anschließend wurde die Membran in ein mit 2x SSC gefülltes Hybridisierungstube überführt. Die Membran legte sich an die Wand des Tubes, das SSC wurde abgegossen. Nun wurden 10 ml Rapid- hyp- Puffer (Amersham) bzw. Hybridisierungspuffer (KPL) und 200 µl Lachsspermien- DNA (10 mg/ml, geschert durch Ultraschall) in das Tube gegeben. Zur Vorhybridisierung wurde das Tube für mindestens 2 h bei 65°C in den Rollerofen (Bachofer, Reutlingen) gegeben,



um unspezifische Bindungsstellen an der Membran abzusättigen. Nach der Vorhybridisierung wurde die radioaktiv markierte DNA- Sonde, die zuvor für 10 min bei 95°C denaturiert und auf Eis wieder abgekühlt wurde, hinzugegeben. Zur Hybridisierung wurde das Tube ün wieder in den 65 °C warmen Rollerofen gegeben. Am nächsten Tag wurde die Hybond- C- Nitrozellulose- Membran für 10 min mit 2x SSC bei 65°C gewaschen. Für die Reduktion der Stringenz bis zur gewünschten Stärke erfolgte das Waschen in den Waschlösungen I, II und III für jeweils ca. 10 min. Anschließend wurde die Membran mit der radioaktiv markierten RNA luftgetrocknet und in Folie eingeschweißt. So präpariert wurde sie in einer Röntgenfilmkassette befestigt und ein Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup>- MP) eingelegt. Über einen Zeitraum von wenigen Minuten bis zu mehreren Tagen wurde der Röntgenfilm bei -80°C exponiert, bevor er in einem Entwicklungsgerät entwickelt wurde.

#### **2.4.9.3 “Strippen“ von Membranen**

Für die Entfernung einer Hybridisierungssonde von der Hybond- C- Nitrozellulose- Membran wurde diese je nach gewünschter Stringenz in Waschlösung I bzw. II bei 65°C gewaschen. Bis zu nachfolgenden Hybridisierungen wurde die Membran feucht gehalten.

## **2.5 Embryologische Methoden**

### **2.5.1 Blastozysteninjektion**

Für die Blastozysteninjektion wurden zunächst die zu injizierenden Zellen mit Hilfe von Trypsin von den Kulturgefäßen gelöst und vereinzelt. Durch die Zugabe des FKS- haltigen Kulturmediums wurde das Trypsin inaktiviert. Die entstandene Zellsuspension wurde auf Eis in die Tierhaltung des MPI für experimentelle Medizin, Göttingen, gebracht. Dort erfolgte die Blastozysteninjektion. Pro Blastozyste wurden ca. 15 bis 25 Zellen injiziert, und die Blastozysten wurden anschließend in pseudoschwangere Mäuse transferiert.

### **2.5.2 Superovulation von Mäusen und Gewinnung von Oozyten**

Die weiblichen Mäuse ovulieren alle 4-5 Tage in etwa 3-5 Stunden nach Einsetzen der Dunkelperiode bei einem vorgegebenen Hell- Dunkel-Rhythmus (7-18, 18-7 Uhr) im Tierstall. Zur Erhöhung der Ausbeute an reifen Eizellen zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde eine hormonelle Behandlung der Tiere des Stammes CD1 durchgeführt. Für die Superovulation der Weibchen wurde diesen um 15 Uhr 10 U PMSG i.p. und nach 48 Stunden 10 U hCG i.p. injiziert. PMSG entspricht dem follikelstimulierenden Hormon und hCG dem luteinisierenden Hormon des weiblichen Zyklus. 12 Stunden nach der hCG- Injektion konnten pro Weibchen etwa 10- 20 Oozyten aus den Ovedukten ausgespült werden.

### **2.5.3 Isolierung von Präimplantationsembryonen**

Die Isolierung der verschiedenen Embryonalstadien aus den superovulierten Mäusen wurde an den entsprechenden Tagen, errechnet nach dem Vaginal Plug- Check, vorgenommen (0,5dpc→2-Zeller, 2,5dpc→4-8-Zeller; 3,5dpc→Morula- Blastozyste). Bei den zur Entnahme getöteten Tieren wurde die Bauchdecke geöffnet, der Uterus mit den Eileitern entnommen und in M2-Medium gegeben. Um eine präzisere Präparation zu ermöglichen, wurde die weitere Arbeit unter einem Stereomikroskop (Stemi SV 11, Fa. Zeiss) unter Durchlicht durchgeführt. Die geschwollenen Ampullen bzw. die Uteri wurden mit Hilfe von spitz ausgeschmiedeten Pinzetten angerissen, so dass die frühen Embryonalstadien aufgrund des vorliegenden Überdrucks herausgepresst wurden. Nach dem Herauspräparieren der restlichen Embryonen wurden die leeren Uteri aus den Kulturschalen verworfen. Anschließend wurden mit einem Mundschlauch und einer über dem Bunsenbrenner ausgezogenen Pasteurpipette die frühen Embryonalstadien eingesaugt und mit möglichst wenig Geweberesten in frisches M2- Medium überführt. Auf diese Weise wurde solange weitergewaschen, bis die Präimplantationsembryonen frei von Geweberesten waren.

### 3. Ergebnisse

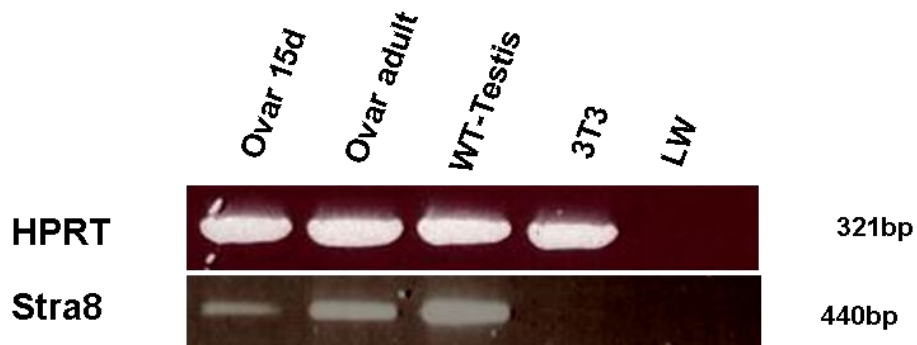
Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die *Stra8*- Expression im Ovar, in verschiedenen ES- und SSC- Zelllinien und in der frühen Embryonalentwicklung untersucht werden. Auch sollte untersucht werden, ob *Stra8* eine Rolle bezüglich der Pluripotenz spielt. **Einige Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in enger Zusammenarbeit mit Frau Dr. Nolte generiert (Nolte 2008).**

#### 3.1 Expressionsanalyse von *Stra8*

##### 3.1.1 Nachweis der *Stra8*- Expression im Ovar mittels RT- PCR

Aus der Literatur ist bekannt, dass *Stra8* ein Testis- spezifisches Gen ist, welches in der prämeiotischen Phase der Spermatogenese exprimiert wird (Oulad- Abdelghani et al. 1996). Da *Stra8* aber auch in sich entwickelnden Ovarien in den Embryonalstadien 12,5 dpc (days post coitum) bis 14,5 dpc nachgewiesen wurde (Menke et al. 2003) und männliche sowie weibliche homozygote *Stra8*- defiziente Mäuse infertil sind (Baltus et al. 2006), war von großem Interesse, ob *Stra8* auch im Ovar der adulten Maus nachzuweisen ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *Stra8*- Expression in Ovarien von 15 Tage alten und adulten WT- Mäusen untersucht.

Die Gesamt- RNA wurde aus den Ovarien isoliert und in cDNA umgeschrieben. Um sicherzustellen, dass die cDNA- Synthese erfolgreich war, wurde zunächst die *HPRT*- Kontroll- PCR durchgeführt.



**Abbildung 1: *Stra8*- RT- PCR mit cDNA aus 15 Tage alten und adulten WT- Ovarien**

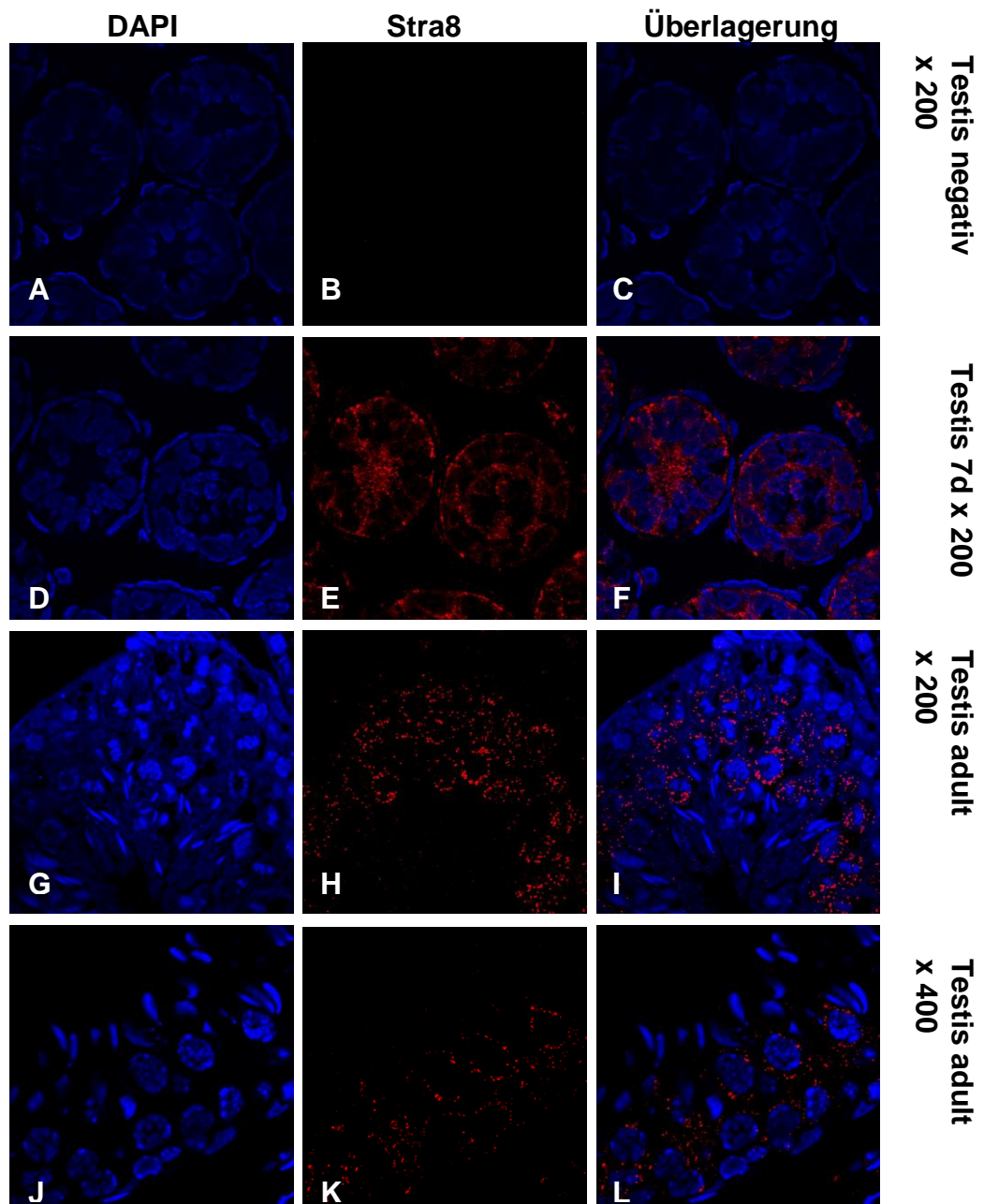
Als Positivkontrolle diente WT- Testis cDNA. Als Negativkontrolle wurde cDNA aus der NIH-3T3- Zelllinie (Fibroblasten) verwendet.

LW= negative Kontrolle ohne Template

Wie Abbildung 1 zeigt, konnte sowohl in den 15 Tage alten als auch in den adulten Ovarien eine *Stra8*- Expression detektiert werden.

### 3.1.2 Immunhistologischer Nachweis der STRA8- Expression im Ovar und im Testis

Für die Untersuchung der STRA8- Expression auf Proteinebene wurde ein kommerzieller STRA8- Peptidantikörper verwendet, der auf Schnitten von in Paraffin- eingebetteten 7 Tage alten und adulten WT- Testis getestet wurde. Unter dem LSM (Laser- Scanning- Mikroskop) zeigte sich, dass nur Typ A und Typ B Spermatogonien sowie präleptotäne und frühe leptotäne Spermatozyten positiv für STRA8 sind (Abb.2). Die genaue Bestimmung der STRA8- positiven Zelltypen wurde von Prof. Andreas Meinardt (Anatomisches Institut, Universität Gießen) durchgeführt. Die Ergebnisse stimmen mit dem aus der Literatur bekannten STRA8- Expressionsmuster exakt überein (Ouldad- Abdelghani et al. 1996; Baltus et al. 2006; Zhou et al. 2008a und b).



**Abbildung 2: STRA8- Antikörperfärbung auf Paraffinschnitten von WT-Testis**

**A-C:** Negativkontrolle= adulte WT- Testis (nur sekundärer Antikörper)

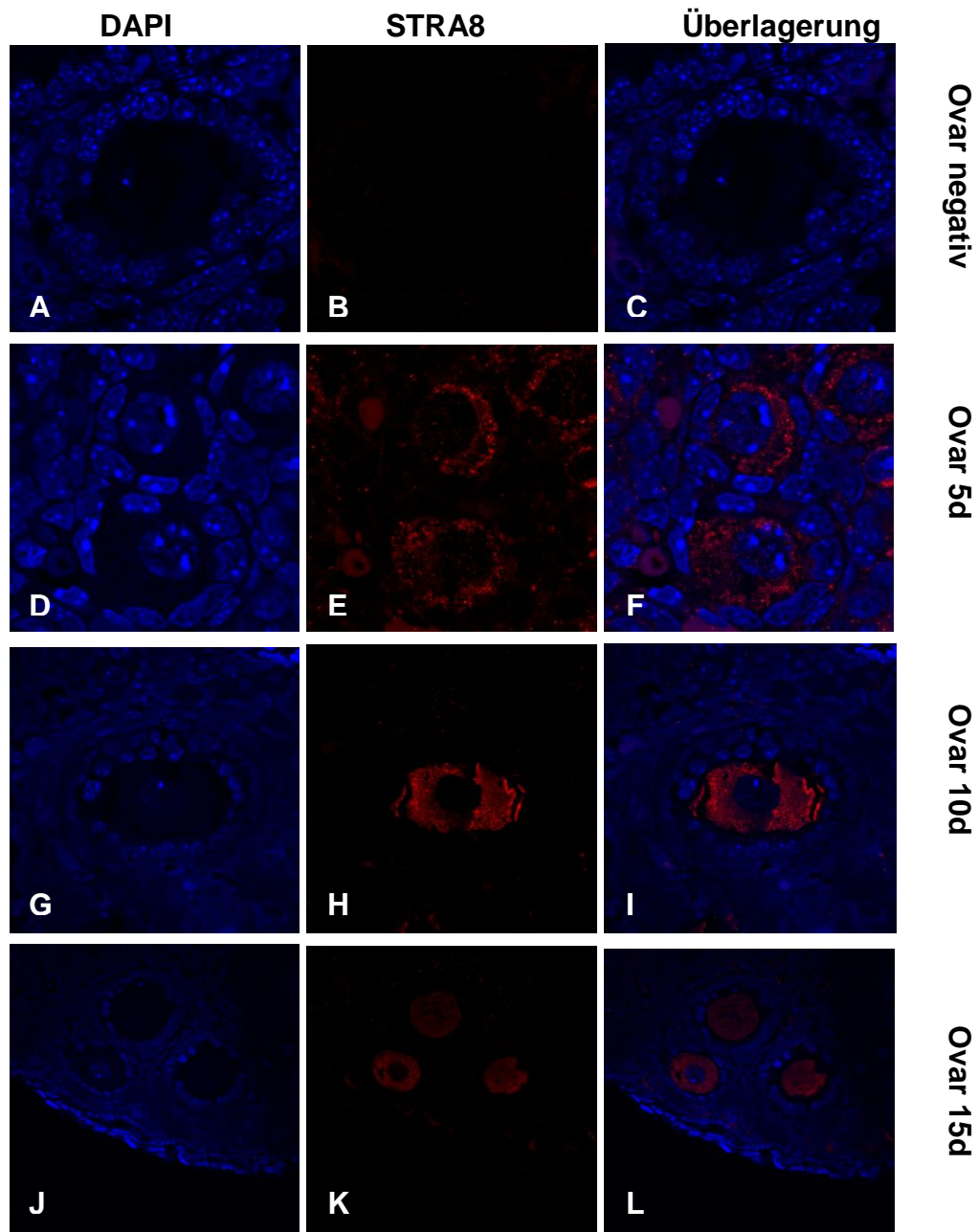
**D-F:** STRA8- Antikörper auf 7 Tage altem WT- Testis

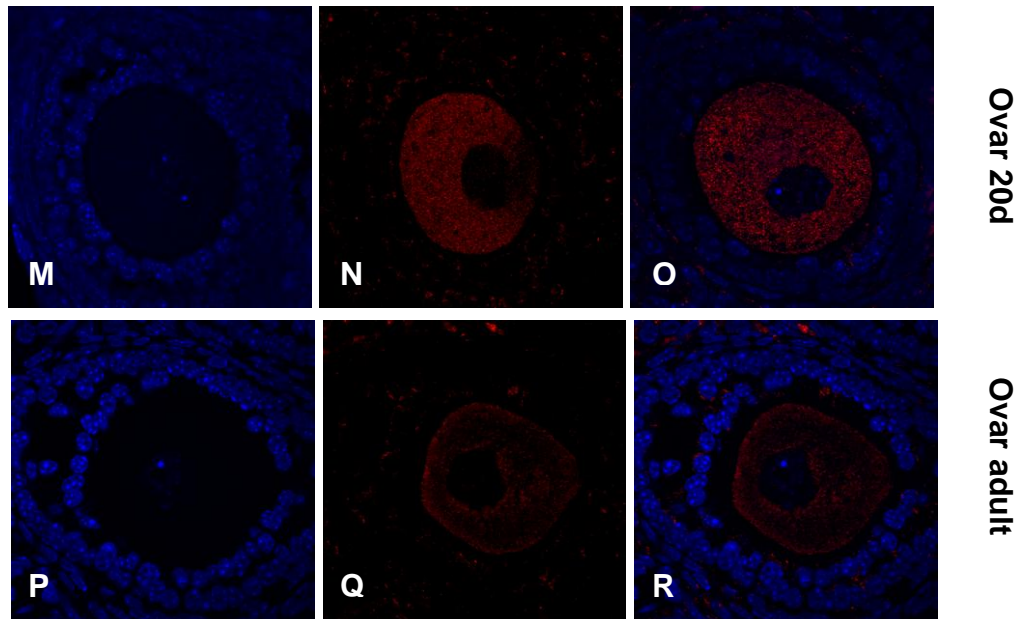
**G-L:** STRA8- Antikörper auf adultem WT- Testis.

Diese Abbildungen wurden zusammen mit Frau Dr. Nolte erarbeitet (Nolte 2008).

Durch diesen Vorversuch konnte gezeigt werden, dass der verwendete Antikörper spezifisch für STRA8 ist.

Im nächsten Versuch wurde der STRA8- Antikörper verwendet, um die Zellen im Ovar zu bestimmen, die zu der positiven *StrA8*- RT- PCR führen. Hierzu wurden Ovarien aus WT- Mäusen verschiedenen Alters (5d, 10d, 15d, 20d, adult) präpariert und die Schnitte immunhistochemisch gefärbt.





**Abbildung 3: STRA8- Antikörperfärbung auf Paraffinschnitten von WT- Ovarien verschiedenen Alters**

Die Bilder wurden mit einem 10er Objektiv aufgenommen und mit der zum LSM zugehörigen Software auf Bildausschnittgröße vergrößert.

**A, D, G, J, M, P:** DAPI (Kernfärbung)

**B, E, H, K, N, Q:** STRA8 (Cy3)

**C, F, I, L, O, R:** Überlagerung der Fluoreszenzen

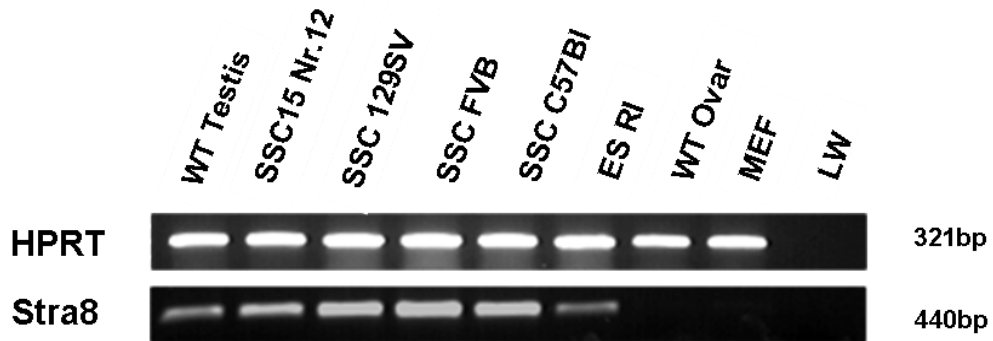
Diese Abbildungen wurden zusammen mit Frau Dr. Nolte erarbeitet (Nolte 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass STRA8 in allen Oozyten der verschiedenen Altersstufen exprimiert wird und im Ooplasm lokalisiert ist (Abb.3).

### 3.1.3 Nachweis der *Stra8*- Expression in den ESC- und SSC- Zelllinien

In unserer Arbeitsgruppe wurden im Rahmen einer biologischen Doktorarbeit SSC- Zelllinien aus WT- Mäusestämmen isoliert (Nolte 2008). Die Zelllinien werden entsprechend ihrer Herkunft bezeichnet (SSC 129 SV, SSC C57Bl, SSC FVB), die Zelllinien aus der doppeltransgenen Maus tragen die Bezeichnung SSC15 (isoliert aus der Maus Nr. 15). Aus dieser Maus konnten mehrere klonale Zelllinien generiert werden, die durchnummeriert wurden (z.B. SSC15 Nr.12).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die *Stra8*- Expression der verschiedenen SSC- Zelllinien untersucht. Hierzu wurde zunächst nach erfolgreicher *HPRT*- Kontroll- PCR die *Stra8*- RT- PCR mit cDNA der SSC- Zelllinien durchgeführt.



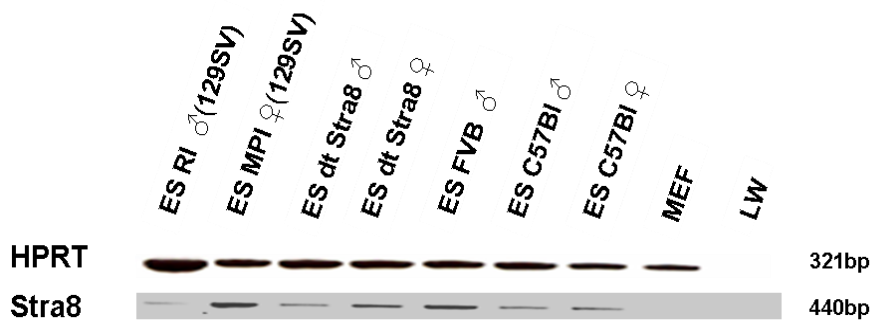
**Abbildung 4: *Stra8*- RT- PCR mit cDNA aus vier SSC- Zelllinien und aus der ES- RI Zelllinie**

Als Positivkontrolle dienten WT- Testis sowie -Ovar. Als Negativkontrolle wurden MEFs (embryonale Fibroblasten) eingesetzt. LW= Negativkontrolle ohne Template.

Diese Abbildung wurde zusammen mit Frau Dr. Nolte erarbeitet (Nolte 2008).

Wie Abbildung 4 zeigt, konnte in allen SSC- Zelllinien *Stra8*- Expression detektiert werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des vorausgegangenen Versuchs, war ein Nachweis von *Stra8* im WT- Ovar nicht möglich. In diesem Versuch wurde jedoch eine ältere WT- Ovar cDNA verwendet. ES- Zelllinien mit denselben genetischen Hintergründen wurden ebenfalls auf *Stra8*- Expression untersucht. Die ES- Zelllinien, die aus der *Stra8/EGFP*- doppeltransgenen- Maus isoliert wurden, tragen die Bezeichnung ES dt *Stra8*.

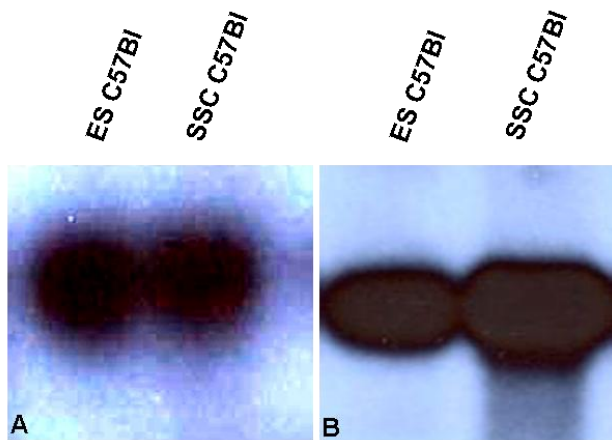




**Abbildung 5: Stra8- RT- PCR mit cDNA aus sieben verschiedenen ES- Zelllinien**  
 Positivkontrolle= ES RI  
 Negativkontrolle= MEF  
 Negativkontrolle ohne Template= LW

Wie Abbildung 5 zeigt, konnte sowohl in allen ES- Zelllinien *Stra8* mittels RT-PCR detektiert werden.

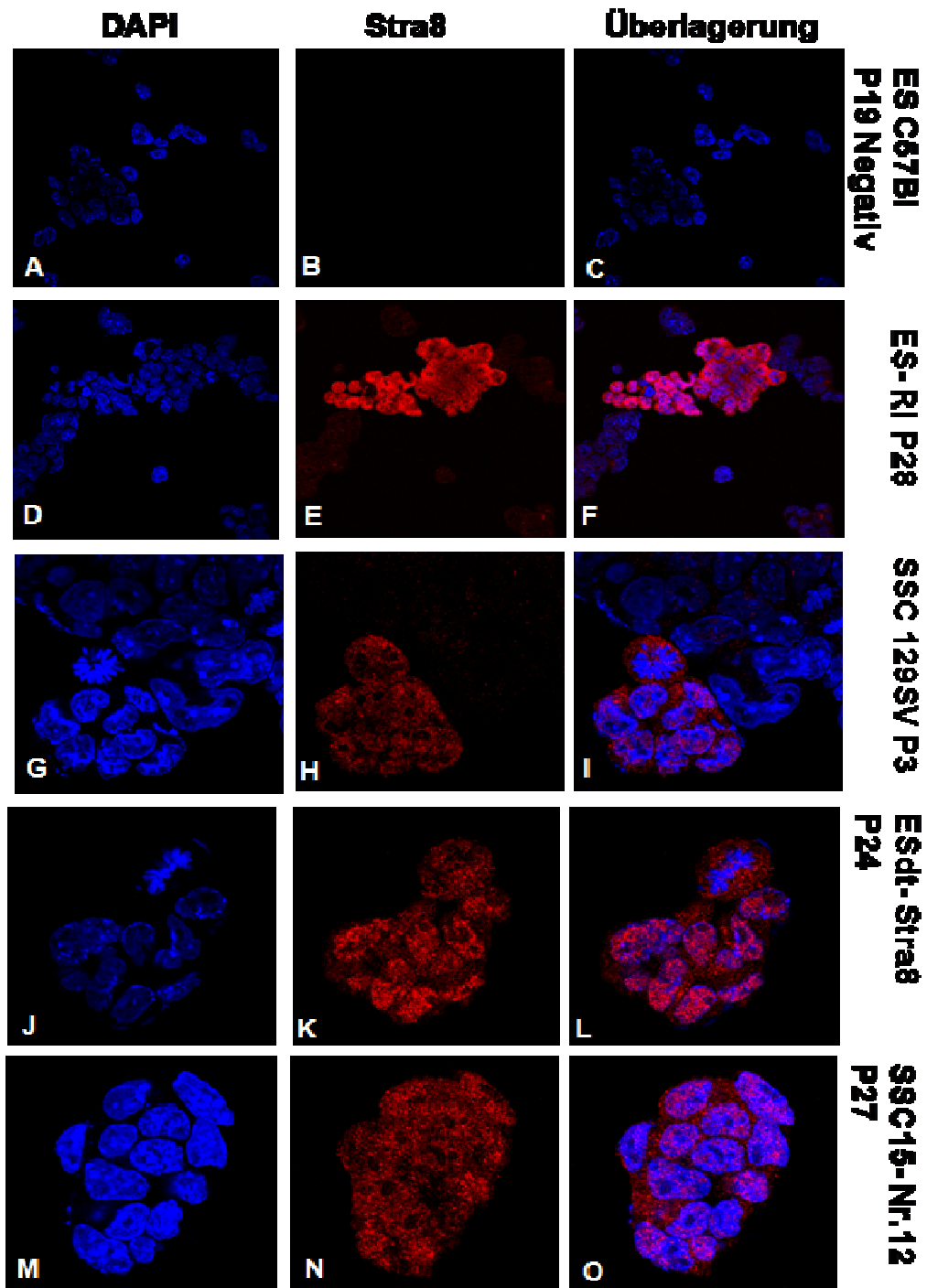
Auszugsweise wurde *Stra8*- mRNA in den Zelllinien ES C57BI und SSC C57BI mittels Northern- Blot analysiert (Abb.6).

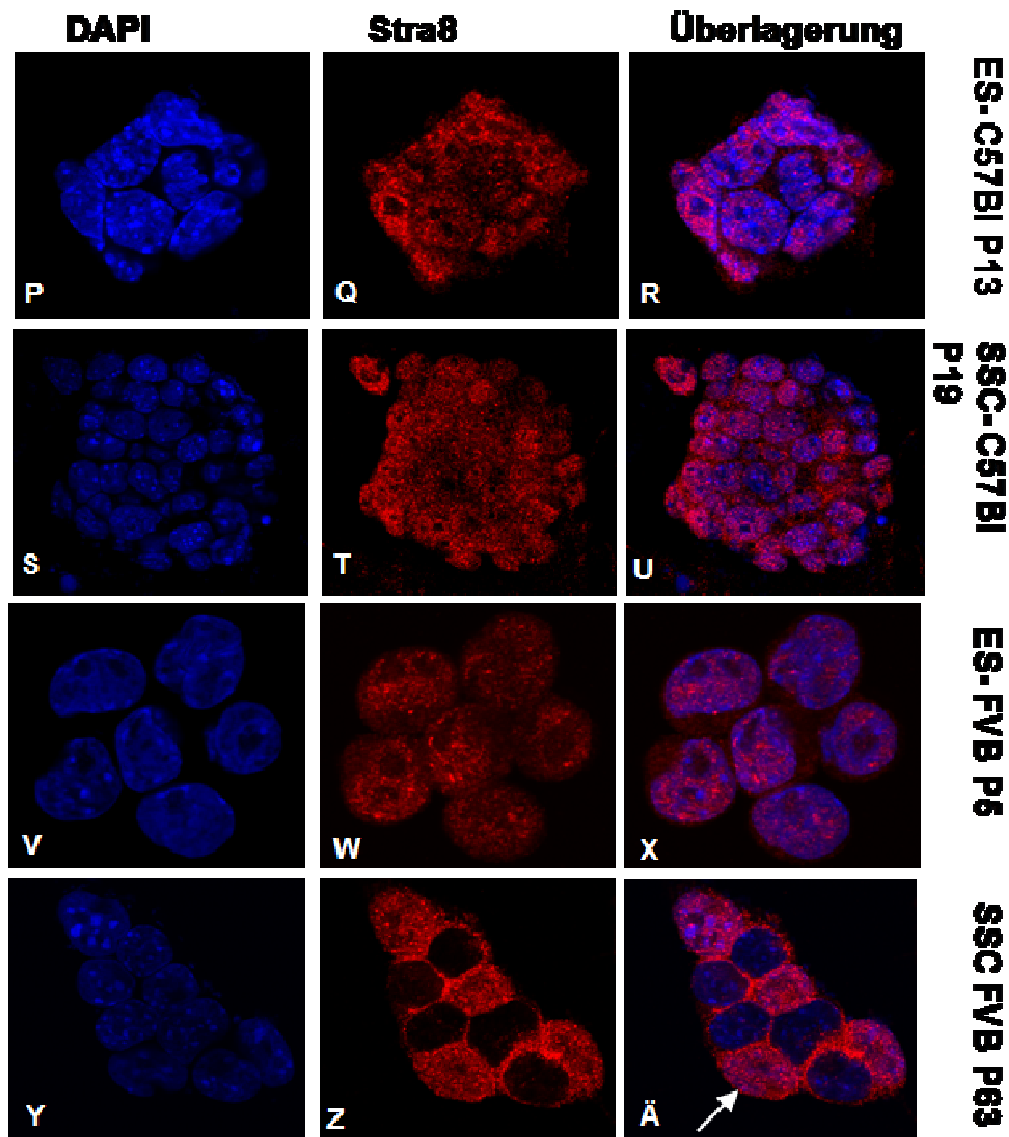


**Abbildung 6: Northern- Blot mit RNA aus den Zelllinien ES C57BI und SSC C57BI**  
 A: *Stra8*- Sonde  
 B:  $\beta$ - Aktin- Sonde

Im nächsten Versuch wurde nun die STRA8- Expression auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Färbung in den verschiedenen SSC- und ES- Zelllinien untersucht (Abb.7). In allen Zelllinien konnte STRA8 nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass es in den verschiedenen Zelllinien

sowohl STRA8- positive als auch STRA8- negative Zellen gibt. Dies wird besonders deutlich in den Zelllinien ES-RI (Abb.7F) und SSC 129SV (Abb.7I). Zudem wurde gezeigt, dass STRA8 in einigen Zellen zytoplasmatisch lokalisiert ist, es jedoch auch Zellen gibt, in denen das Protein im Kern lokalisiert ist. In der Zelllinie SSC FVB konnte dies am eindrucksvollsten gezeigt werden (Abb.7Ä).





**Abbildung 7: STRA8- Antikörperfärbung auf SSC- und ES- Zelllinien**

Die Bilder wurden mit einem 10er Objektiv aufgenommen und mit der zum LSM zugehörigen Software auf Bildausschnittgröße vergrößert.

**A, B, C:** Negativkontrolle (nur sekundär Antikörper (Cy3))

**A, D, G, J, M, P, S, V, Y:** Kernfärbung mit DAPI

**B, E, H, K, N, Q, T, W, Z:** STRA8- Antikörperfärbung (Cy3)

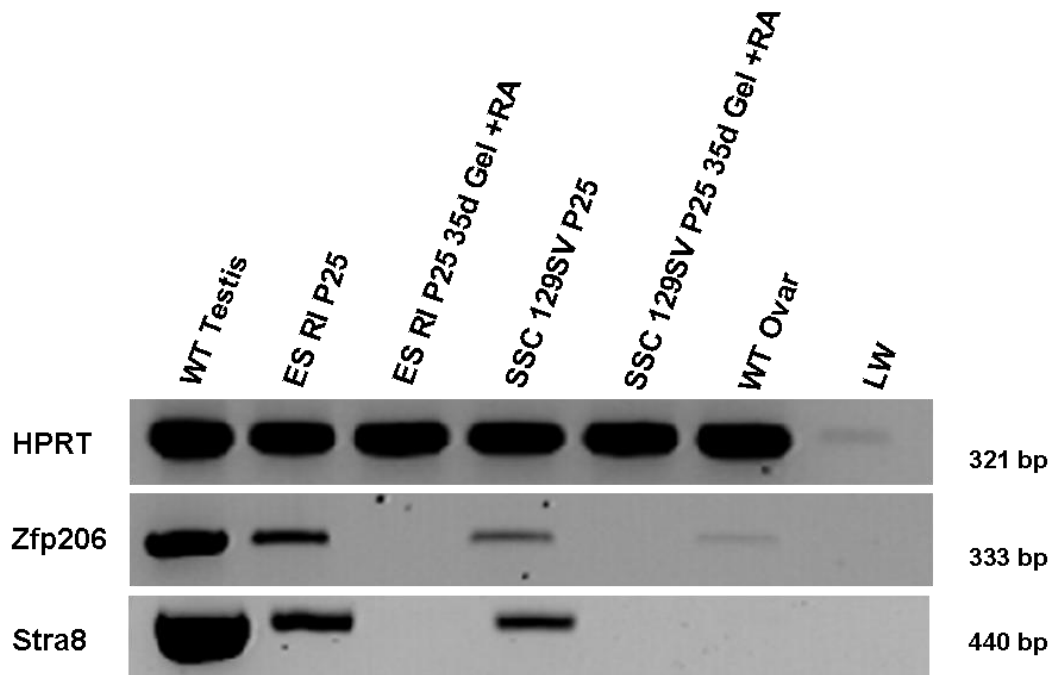
**C, F, I, L, O, R, U, X, Ä:** Überlagerung der Fluoreszenzen

In allen getesteten Zelllinien konnte eine STRA8- Expression nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass es in einigen Zelllinien (ES RI Abb.7F, SSC129Sv Abb.7I) sowohl STRA8- positive und als auch STRA8- negative Zellen gibt. Zudem ist deutlich zu erkennen, dass in einigen Zelllinien (SSC FVB Abb.7Ä) STRA8 in einzelnen Zellen im Zytoplasma in anderen jedoch im Kern (→) lokalisiert ist. P...= Passagenanzahl...

Die Abbildungen wurden zusammen mit Frau Dr. Nolte erstellt und sind z.T. auch in deren Dissertation (Nolte 2008) enthalten.

Die Tatsache, dass *Stra8* in allen getesteten ES- und SSC- Zelllinien nachzuweisen war, jedoch nicht in den als nicht pluripotent beschriebenen Zelllinien (Abb.1 3T3, Abb.4 MEF) führte zu der Annahme, dass *Stra8* als Pluripotenz- assoziiertes Gen in pluripotenten Zelllinien fungieren könnte. Diese Annahme wurde durch die in Abbildung 7Ä gezeigte Kernlokalisierung in einigen Zellen verstärkt, da bis dato alle bekannten Gene, die eine Rolle bei der Pluripotenz spielen, im Kern lokalisiert sind.

Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, wurden nun die Zelllinien ES-RI (129SV) und SSC 129SV, welche beide denselben genetischen Hintergrund haben, einer ungerichteten Differenzierung unterzogen. Die Zellen wurden hierzu 35 Tage auf mit 0,1% Gelatine beschichteten Kulturgefäßen und unter Retinsäure (RA)- Induktion ( $10^{-6}$ M) kultiviert. Mit der vollständigen Ausdifferenzierung der Zellen verschwindet die Expression von Pluripotenz- bzw. Pluripotenz- assoziierten Genen. Aus den Zellen wurde anschließend RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Es wurde eine RT- PCR für *Stra8* mit cDNA aus differenzierten und undifferenzierten Zellen durchgeführt (Abb.8). Als Positivkontrolle diente das Gen *Zfp206*, für das bereits gezeigt werden konnte, dass die Expression in differenzierten Zellen verschwindet (Zhang et al. 2006).



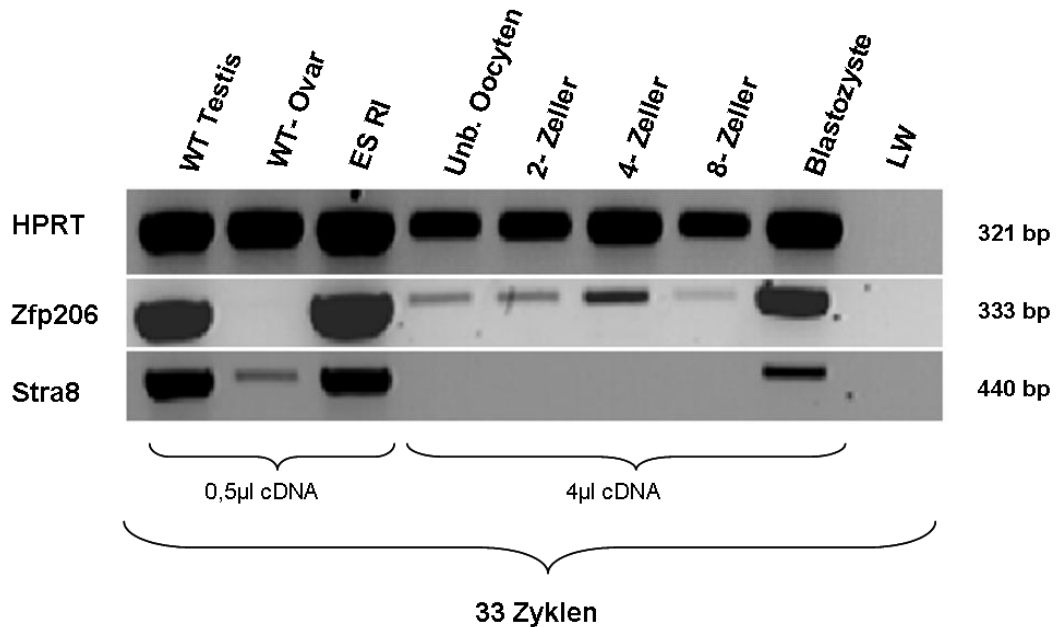
**Abbildung 8: RT- PCR- Expressionsanalyse für *Stra8* mit cDNA aus differenzierten und undifferenzierten Zellen**  
 ES-RI P25 und SSC 129SV P25= Undifferenzierte Zellen  
 35d Gel + RA= differenzierte Zellen; für 35 Tage auf Gelatine plus Retinsäure kultiviert  
 WT- Ovar= Kontrolle  
 LW= Negativkontrolle ohne Template  
 Die dargestellten Ergebnisse wurden gemeinsam mit Frau Dr. Nolte erarbeitet (Nolte 2008).

In den differenzierten Zellen war weder *Zfp206*- noch *Stra8*- Expression nachweisbar. Dies kann als weiterer Hinweis dafür gesehen werden, dass *Stra8* ein Pluripotenz- assoziiertes Gen ist.

### 3.1.4 *Stra8*- Expression in Embryonen

Da *Stra8* sowohl im Ovar als auch in den ES- Zelllinien (diese werden aus der inneren Zellmasse von Blastozysten isoliert) detektiert wurde, war nun von großem Interesse, ob *Stra8* auch in den Präimplantationsembryonen exprimiert wird. Um dies zu untersuchen, wurde aus je 50 isolierten Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien (unbefruchtete Oozyten bis Blastozysten) die Gesamt- RNA mit dem RNeasy Mini- Kit (Qiagen) isoliert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zunächst eine *HPRT*- Kontroll-

PCR durchgeführt (Abb.9). Zum Vergleich wurde auch die *Zfp206*-Expression untersucht.



**Abbildung 9: RT- PCR- Expressionsanalyse für *Stra8* und *Zfp206* in Embryonen (50)**

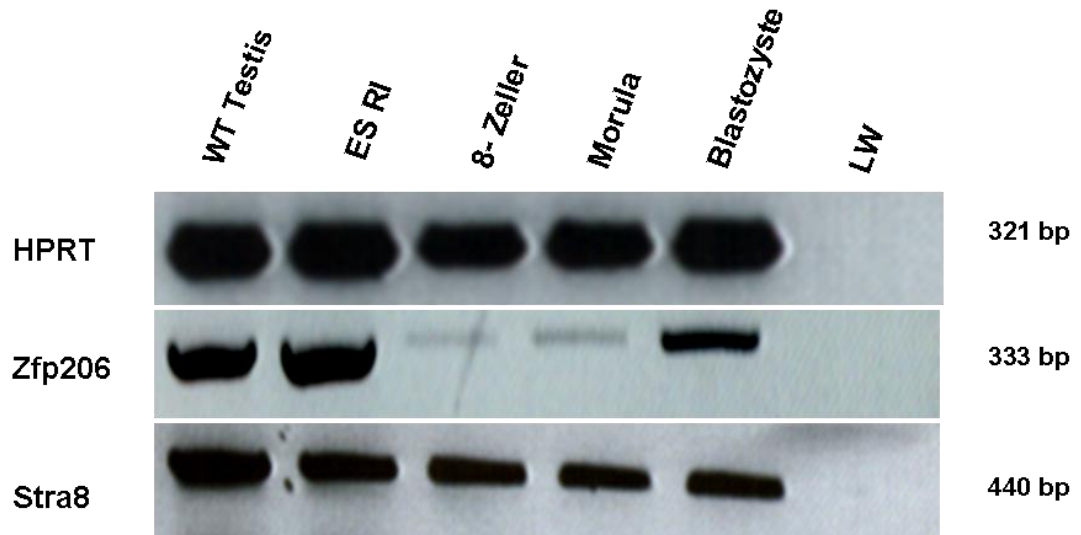
Für diese RT- PCR wurde RNA aus je 50 Embryonen isoliert und komplett in cDNA umgeschrieben. Die Zykluszahl wurde von 30 auf 33 erhöht und die achtfache Menge an cDNA eingesetzt. Unter diesen Bedingungen konnte in allen Stadien *Zfp206* detektiert werden. *Stra8* konnte jedoch nur im Blastozystenstadium nachgewiesen werden.

WT- Testis= Positivkontrolle, LW= Negativkontrolle ohne Template

Da es unter den üblichen Bedingungen nicht gelang, die publizierten Daten für *Zfp206* zu reproduzieren und auch keine *Stra8*- Expression nachweisbar war, wurde die Zykluszahl von 30 auf 33 erhöht und die achtfache Menge an cDNA eingesetzt. Unter diesen Bedingungen stimmte das *Zfp206*-Expressionsmuster mit dem publizierten überein. In der Blastozyste konnte nun auch *Stra8* detektiert werden.

Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse nicht nur ein Artefakt waren, wurde dieser Versuch für 8- Zeller, Morulae und Blastozysten wiederholt. Diesmal wurde jedoch Gesamt- RNA aus 100 Embryonen isoliert und komplett in cDNA umgeschrieben. Unter diesen Bedingungen zeigte sich wieder das für

*Zfp206* publizierte Expressionsprofil. *Stra8* konnte nun jedoch in allen getesteten Embryonalstadien nachgewiesen werden (Abb.10).



**Abbildung 10: RT- PCR- Expressionsanalyse für *Stra8* und *Zfp206* in Embryonen (100)**

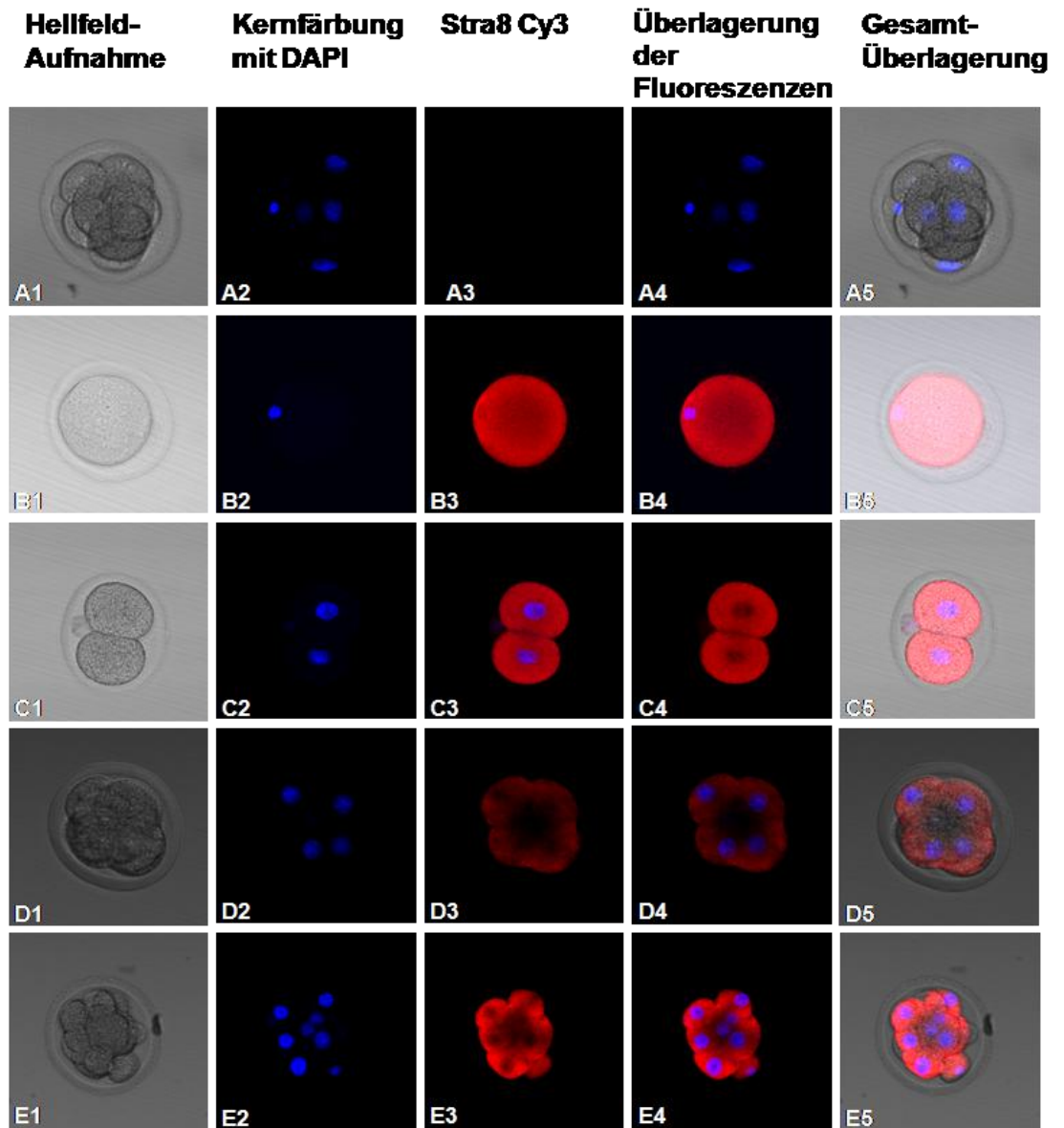
Für diese RT- PCR wurde RNA aus je 100 Embryonen isoliert und komplett in cDNA umgeschrieben. Unter den gewählten Bedingungen konnte *Stra8* in allen Embryonalstadien detektiert werden. Das Expressionsmuster von *Zfp206* stimmt mit dem zuvor erhaltenen überein (Abb.9).

Die in den Abbildungen 9 und 10 dargestellten Ergebnisse wurden zusammen mit Frau Dr. Nolte erarbeitet (Nolte 2008).

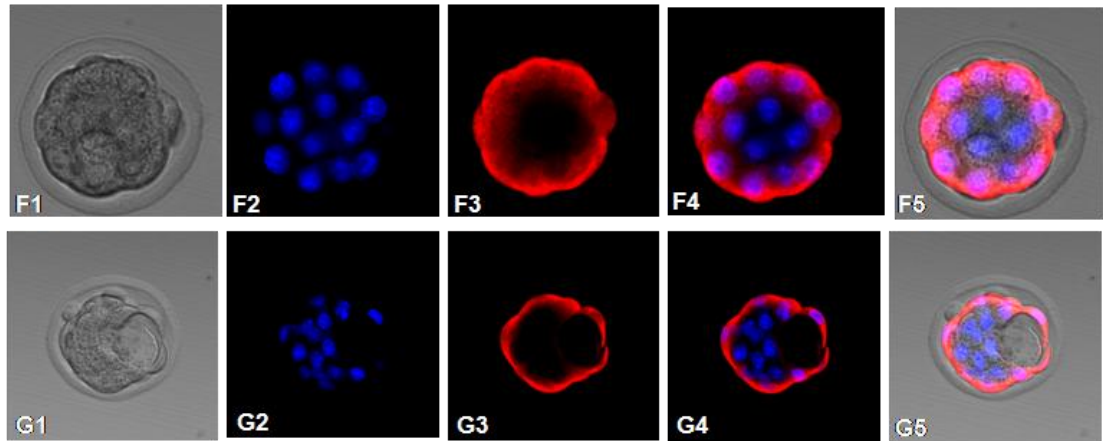
### 3.1.5. Immunhistochemischer Nachweis der STRA8- Expression in Präimplantationsembryonen

Um die STRA8- Expression auf Proteinebene in den verschiedenen Embryonalstadien zu testen, wurden die verschiedenen Stadien (unbefruchtete Oozyte bis Blastozyste) isoliert, einer immunhistochemischen Färbung unterzogen und auf einem Hohlschliffobjektträger mikroskopiert (Abb.11). Es konnte in der unbefruchteten Oozyte und in allen Embryonalstadien STRA8 nachgewiesen werden. STRA8 war immer zytoplasmatisch lokalisiert. In der Blastozyste konnte eine Expression sowohl in den Zellen der inneren Zellmasse als auch in den Zellen des

Trophoblasten nachgewiesen werden (Abb.11G5). In Abbildung 11 A1-5 wurde als Negativkontrolle exemplarisch auf das 8- Zellstadium nur der sekundäre Antikörper zugegeben. *Stra8* konnte sowohl mittels RT- PCR als auch immunhistochemisch in allen Präimplantationsstadien nachgewiesen werden.







**Abbildung 11: STRA8- Antikörperfärbung auf Präimplantations-embryonen**

Die Bilder wurden mit einem 20er Objektiv aufgenommen und mit der zum LSM zugehörigen Software auf Bildausschnittgröße vergrößert.

**A1-5:** Negativkontrolle (nur sek. Antikörper) auf 8- Zellern

**B1-5:** Antikörperfärbung auf unbefruchteten Oozyten

**C1-5:** Antikörperfärbung auf 2- Zellern

**D1-5:** Antikörperfärbung auf 4- Zellern

**E1-5:** Antikörperfärbung auf 8- Zellern

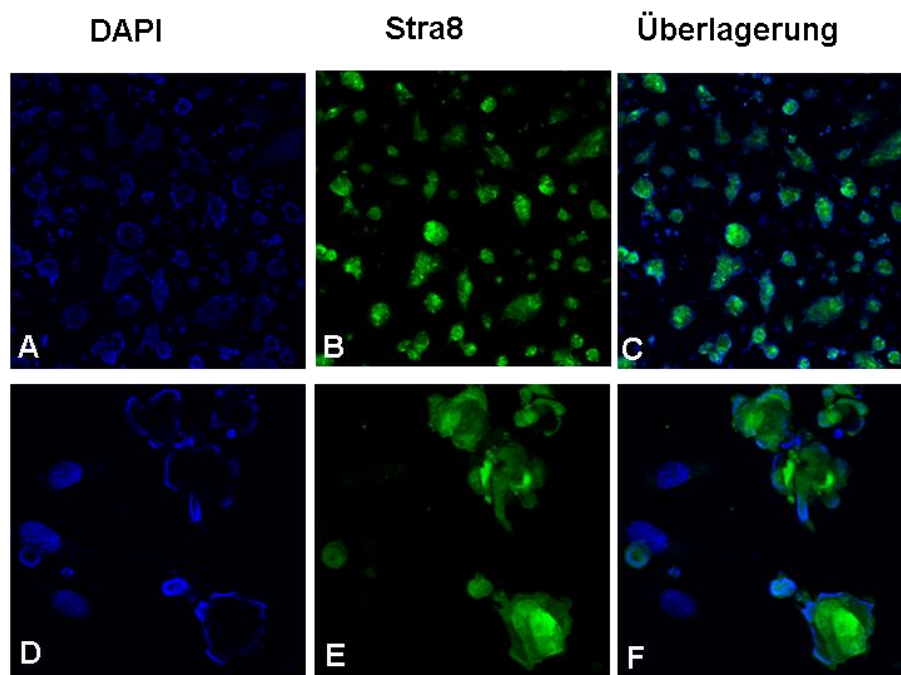
**F1-5:** Antikörperfärbung auf Morulae

**G1-5:** Antikörperfärbung auf Blastozysten

Diese Antikörperfärbungen wurden gemeinsam mit Frau Dr. Nolte generiert und sind z.T. auch in der Dissertation von Frau Dr. Nolte enthalten (Nolte 2008).

### 3.2 Untersuchung der Rolle von *Stra8* bei der Pluripotenz

Da in den vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte, dass es in pluripotenten Zelllinien STRA8- positive und -negative Zellen gibt (Abb.7, D-E), wurde in einem nächsten Versuchsansatz untersucht, welche Rolle die *Stra8*- Expression bezüglich der Pluripotenz von Stammzellen hat. Hierzu wurde die ES RI *Stra8*/10- Zelllinie (Diplomarbeit Nolte 2005), welche EGFP unter der Kontrolle des *Stra8*- Promotors exprimiert, mittels FACS Sortierung auf ihre EGFP- Fluoreszenz sortiert (Abb.12). Um zu untersuchen, ob die *Stra8*- positiven Zellen "pluripotenter" sind als die *Stra8*- negativen Zellen, wurden Blastozysteninjektionen zur Herstellung von Chimären durchgeführt. Es wurden zum Vergleich einmal sortierte EGFP- positive Zellen (= *Stra8* positiv) und einmal unsortierte Zellen verwendet.



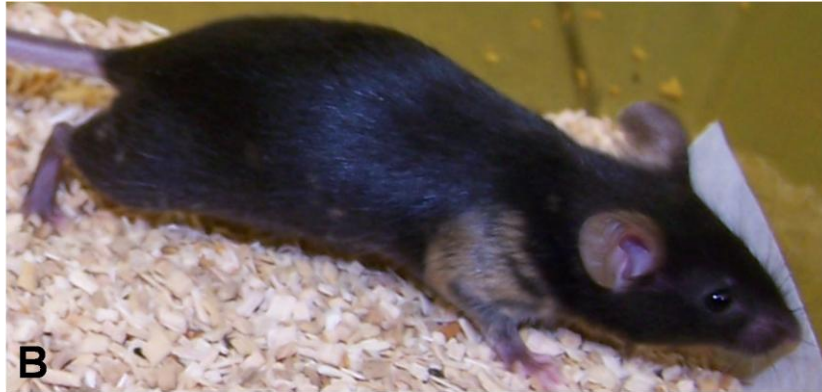
**Abbildung 12: EGFP- Fluoreszenz der ES RI Stra8/10 nach FACS Sortierung**

**A-C:** 200fache Vergrößerung

**D-F:** 400fache Vergrößerung

Die ES RI- Zellen stammten aus dem 129SV- Hintergrund, welcher eine braune Fellfarbe hat. Für die Blastozysteninjektion wurden Blastozysten aus C57Bl/6- Mäusen verwendet, die eine schwarze Fellfarbe haben. Die entstandenen Chimären konnten somit anhand ihres typischen Phänotyps (braun- schwarze Fellfarbe) identifiziert werden (Abb.13).





**Abbildung 13: Chimären entstanden aus den EGFP<sup>+</sup>- Zellen**

**A:** 90%ige Chimären

**B:** 10%ige Chimäre

Im Phänotyp zeigt sich ein schwarz- braunes Fell

Wie Tabelle 1 zeigt, erbrachten diese Experimente kein eindeutiges Ergebnis. Wären *Stra8*- positive Zellen tatsächlich pluripotenter, wäre zu erwarten, dass aus den Blastozysteninjektionen mit den *Stra8*- positiven Zellen mehr und höherprozentige Chimären hervorgehen als bei der WT-Kontrolle. Aus den Injektionen mit den *Stra8*- positiven Zellen gingen zwar zwei hochprozentige Chimären (90%) hervor, aber die Injektion mit unsortierten Zellen erbrachte insgesamt mehr Chimären, unter denen auch eine höherprozentige war (80%).

**Tabelle 2: Ergebnisse der Blastozysteninjektionen**

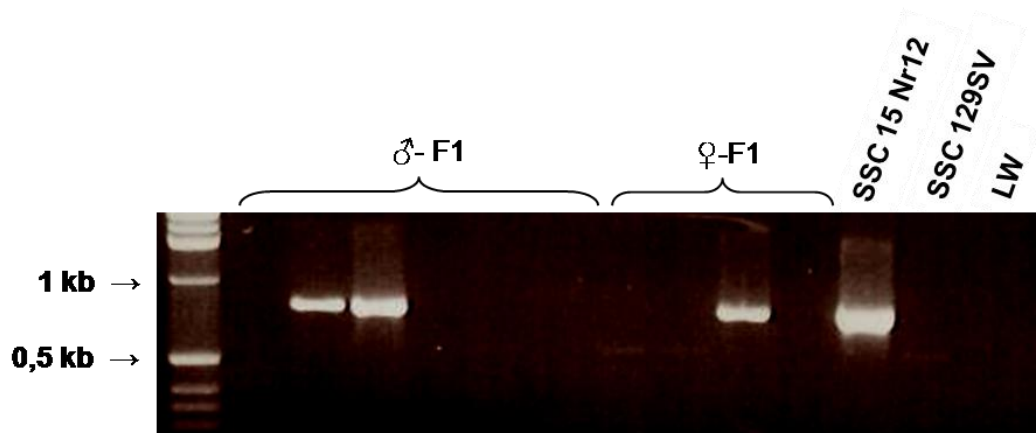
[Gemeinsam mit Frau Dr. Nolte erarbeitet und in deren Dissertation enthalten (Nolte 2008 S.113)]

Zelllinie	Anzahl der Embryonentransfere	Anzahl der NKO's	Chimären
ES-RI WT	2	16	1 x 10% 2 x 25% 2 x 65% 1 x 80%
ES-RI- <i>Stra8</i> /10 EGFP+	2	23	2 x 10% 2 x 90%

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *Stra8* zumindest keine zentrale Funktion bezüglich der Pluripotenz hat.

### 3.3 Bestimmung des prozentualen Anteils an *Stra8*-positiven Zellen im Testis der transgenen *Stra8/EGFP*-Maus

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils an *Stra8*-positiven Zellen im Testis, wurden die entstandenen hochprozentigen *Stra8/EGFP*-Chimären (90%) mit Mäusen aus der C57/Bl- WT- Linie verpaart. Die daraus entstandenen braunen Nachkommen wurden zunächst einer Genotypisierungs-PCR zur Identifizierung des *Stra8/EGFP*-Promotorkonstrukts unterzogen (Beispiel in Abb.14).



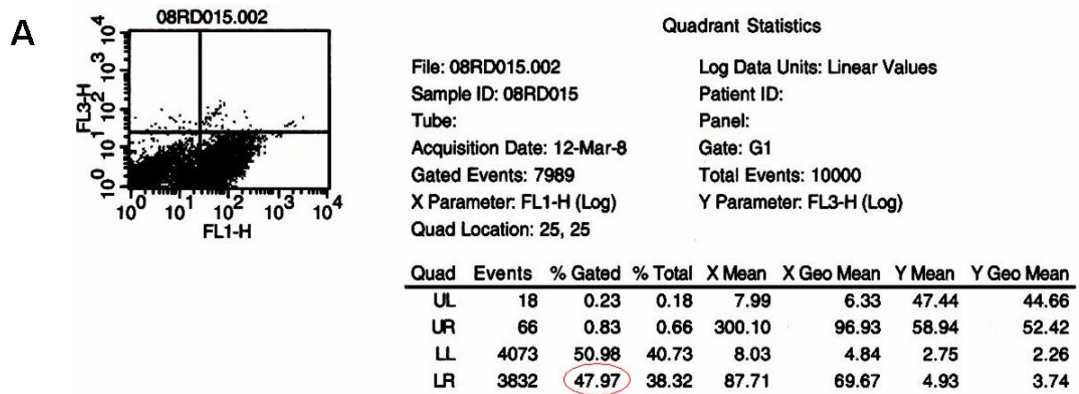
**Abbildung 14: Genotypisierungs- PCR der braunen Nachkommen (F1) der *Stra8/EGFP*- Chimären**

DNA aus sechs männlichen und vier weiblichen braunen Nachkommen. Als Kontrolle dient die Zelllinie SSC 15 Nr.12 (positiv) und SSC 129SV (negativ).  
LW = negativ Kontrolle ohne Template.

Anschließend wurden die Testes 14 Tage alter und adulter männlicher *Stra8/EGFP*- positiver- Nachkommen zu einer Einzelzell- Suspension dissoziiert und in dieser der prozentuale Anteil an *Stra8/EGFP*<sup>+</sup>- Zellen per FACScanning bestimmt (in Kooperation mit Prof. Dr. Dressel, Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie). Es konnte gezeigt werden, dass in 14 Tage alten Testes 47,2% und in adulten Testes 5,96% der Zellen EGFP- und damit *Stra8*- positiv waren (Abb.15).

Dieser Unterschied war zu erwarten, da im 14 Tage alten Testis noch kaum Spermatogenese stattfindet, und somit der prozentuale Anteil an Spermatogonien höher ist. In den vorangegangenen Versuchen konnte

gezeigt werden, dass nur Typ A und Typ B Spermatogonien sowie präleptotäne und frühe leptotäne Spermatozyten *Stra8*- positiv sind (3.1.2).



**B**

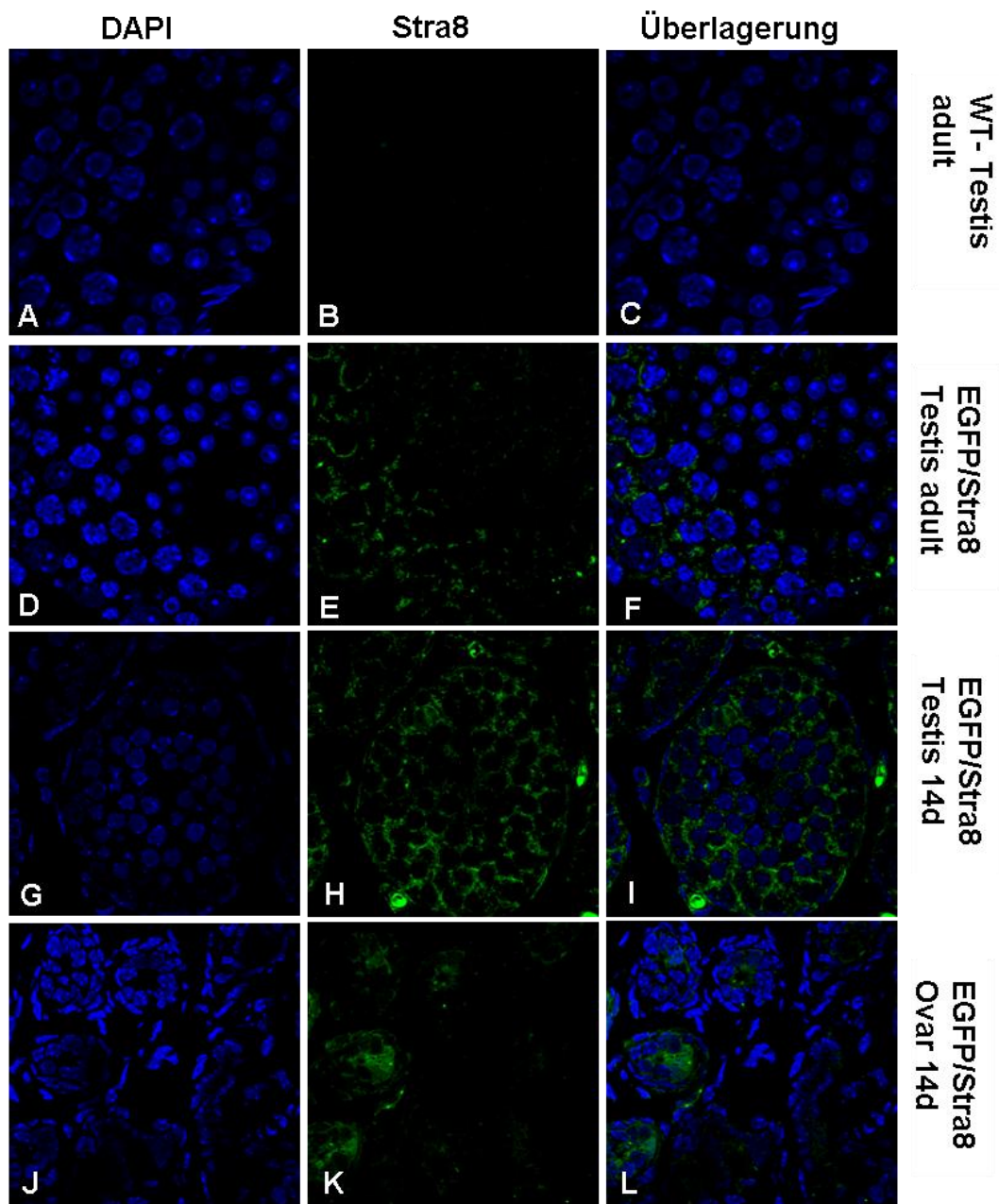
	Wildtyp- Hintergrund (WT)	<i>Stra8</i> /EGFP transgene Mäuse	Totale Anzahl ( <i>Stra8</i> /EGFP – WT)
14d alter Testis % der Zellen im LR- Gate	0.77%	47.97%	47.2%
Adulter Testis % der Zellen im LR- Gate	0.30%	6.26 %	5.96%

**Abbildung 15: FACScanning für EGFP- positive Zellen aus der Testissuspension 14 Tage alter und adulter transgener *Stra8*/EGFP- Mäuse**

**A:** Exemplarische Darstellung der Auswertung eines FACScanning. Testissuspension einer 14 Tage alten *Stra8*/EGFP- transgenen Maus. Im Gate LR befinden sich die EGFP<sup>+</sup>- Zellen (47.97%).

**B:** Tabelle: Auswertung der FACSsortierung. Es wurde der prozentuale Anteil der Zellen im LR- Gate von WT- Testis von denen der *Stra8*/EGFP- transgene Mäusen abgezogen. Damit wurde ermittelt, wie viele Testis- Zellen der transgenen Mäuse *Stra8*/EGFP- positiv sind.

Um zu zeigen, dass in den *Stra8*/EGFP- transgenen Nachkommen das *Stra8*- Expressionsmuster mit dem der WT- Mäuse übereinstimmt, wurde die EGFP- Fluoreszenz von 14 Tage altem Ovar und je 14 Tage altem- und adultem- Testis von *Stra8*/EGFP- positiven Nachkommen unter dem Mikroskop beurteilt. Wie Abbildung 16 zeigt, stimmt die EGFP- Fluoreszenz mit der STRA8- Fluoreszenz aus Versuch 3.1.2 (Abb.2) überein.



**Abbildung 16: EGFP- Fluoreszenz in Testis und Ovar aus *Stra8/EGFP*-transgenen Mäusen**

**A-C:** Negativ Kontrolle: EGFP- Fluoreszenz in WT- Testis  
600fach Vergrößerung

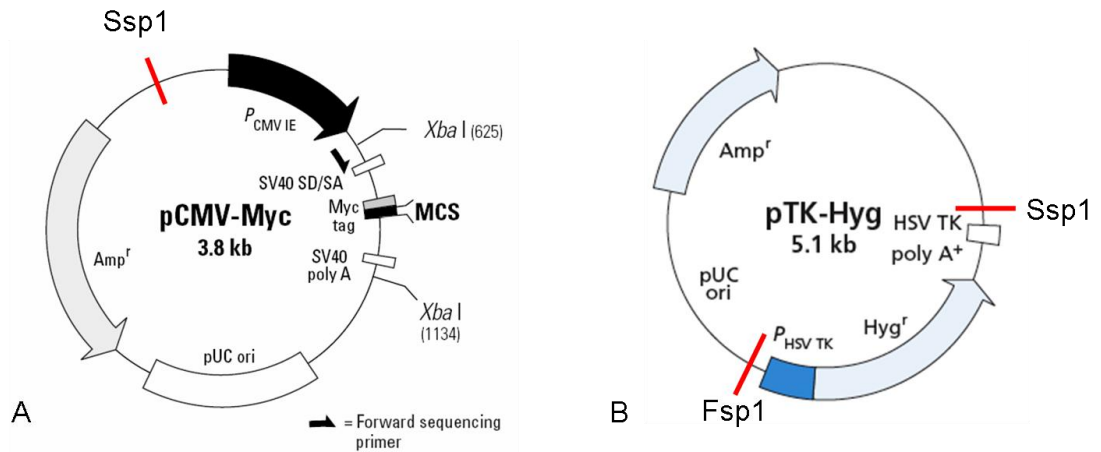
**D-F:** Testis aus einer adulten *Stra8/EGFP*- Maus  
400fache Vergrößerung

**G-I:** Testis aus einer 14d alten *Stra8/EGFP*- Maus  
200fache Vergrößerung

**J-L:** Ovar aus einer 14d alten *Stra8/EGFP*- Maus  
200fache Vergrößerung

### 3.4 *Stra8*- Überexpression

In einem weiteren Versuch sollte *Stra8* in jeweils einer ES- und einer SSC-Zelllinie stabil überexprimiert werden. Als Grundlage dieses Versuches diente die von Wang et al. (2007a) publizierte Vorgehensweise für die Überexpression von *Zfp206* in einer ES- Zelllinie, durch die es gelang, *Zfp206* als Pluripotenz- assoziiertes Gen zu identifizieren. Für die Überexpression von *Stra8* wurde der pCMV- Myc- Vektor ausgewählt (Abb.17), da dieser den ubiquitär aktiven CMV- Promotor und einen Myc- Tag zur Detektion des Fusionsproteins enthält. Der Myc- Tag war erforderlich, um später die Expression im Western- Blot nachzuweisen, da der STRA8- Antikörper im Western- Blot keine eindeutigen Ergebnisse ergibt. Zunächst musste in den pCMV- Myc- Vektor eine Hygromycin- Resistenz- Kasette integriert werden, da er keine Antibiotika- Resistenz für die Selektion in eukaryotischen Zellen besitzt. Hierzu wurde aus dem pTK- Hyg- Vektor die Hygromycin- Resistenz- Kasette durch die Blunt- End- Restriktionsenzyme *Ssp1* und *Fsp1* herausgeschnitten und in den durch *Ssp1* linearisierten pCMV- Myc- Vektor ligiert (Abb.17).

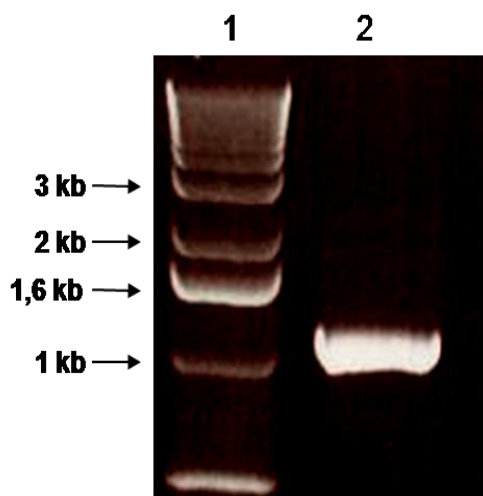


**Abbildung 17: Darstellung des pCMV- Myc- Vektors und der Ligations- Strategie für die Hygromycin- Resistenz- Kassette (Vektorkarten aus: www.clonetech.com)**

**A: pCMV- Myc- Vektor** Die Expression des zu untersuchenden Gens wird von dem CMV- Promotor kontrolliert. Der Myc- Tag vor der “Multiple Cloning Site“ (MCS) dient zum Detektieren der Expression im Western-Blot. Der Vektor wurde zur Integration der Hygromycin- Resistenz- Kassette mittels Ssp1 linearisiert.

**B: pTK- Hyg- Vektor** Mittels der Enzyme Fsp1 und Ssp1 wurde die Hygromycin- Resistenz- Kassette ausgeschnitten und in den pCMV- Myc- Vektor ligiert.

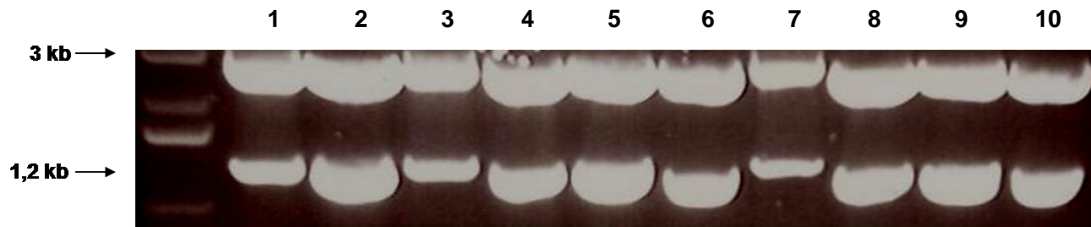
Um die Ligation des *Stra8* Gens in die MCS des pCMV- Myc- Hyg- Vektors zu ermöglichen, wurden zunächst Primer hergestellt, die *NotI*- Schnittstellen an die Enden des ORF amplifizieren (Abb.18).



**Abbildung 18:**  
**Amplifikation des *Stra8*- ORFs**  
 1: 1kb- Leiter  
 2: Amplifikation des *Stra8*- ORF (1,2kb) mit den Primerpaaren ORF-*Stra8*-Not I-F/ ORF-*Stra8*-Not I-R.



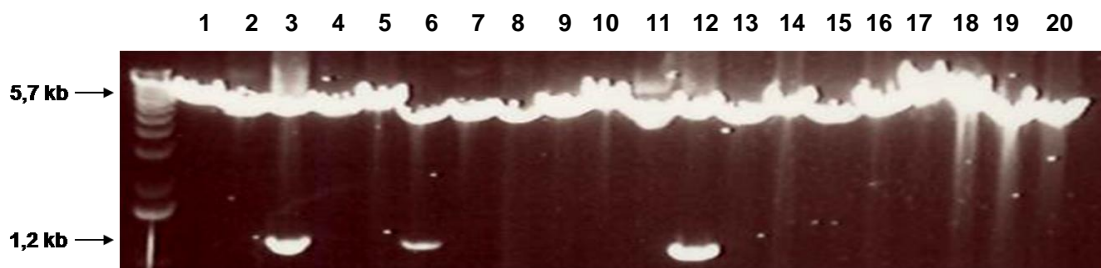
Anschließend wurde der ORF des *Stra8*- Gens in den pGEM-T Easy- Vektor ligiert und der Vektor in DH5 $\alpha$ - Bakterien transformiert. Die Kolonien, die den Vektor mit Konstrukt integriert hatten, wurden mittels *NotI*- Restriktionsenzymverdau identifiziert (Abb.19) und einer Sequenzanalyse unterzogen.



**Abbildung 19: Verdau von Plasmidpräparationen von pGEM-T Easy-ORF- *Stra8* mit dem Restriktionsenzym *NotI* (1-10)**

Durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym *NotI* wurden nach der Ligation mit dem *Stra8*- ORF die Konstrukt-tragenden Kolonien identifiziert. Da an den beiden Enden des ORF eine *NotI*- Schnittstelle amplifiziert wurde, entstehen bei dem Verdau der Konstrukt- tragenden Kolonien zwei unterschiedlich lange DNA- Fragmente, der 1,2kb *Stra8*- ORF und der 3kb große pGEM-T Easy- Vektor.

In dem *Stra8*- ORF in Kolonie 6 konnten Mutationen ausgeschlossen werden, so dass dieser als Grundlage für die Ligation in den pCMV- Myc- Hyg- Vektor genutzt werden konnte. Nach der Klonierung in den pCMV- Myc- Hyg- Vektor wurden nun erneut die Konstrukt- positiven Klone durch einen *NotI*- Restriktionsenzymverdau ermittelt (Abb.20).



**Abbildung 20: Verdau von Plasmidpräparationen von pCMV- Myc- Hyg ORF- *Stra8* mit dem Restriktionsenzym *NotI* (1-10)**

Zur Identifizierung der *Stra8*- ORF tragenden Kolonien wurde auch hier ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *NotI* durchgeführt. Die Konstrukt- tragenden Kolonien zeigten nach dem Verdau zwei unterschiedlich lange DNA- Fragmente. Der 1,2kb *Stra8*- ORF und der 5,7kb große pCMV- Myc- Hyg- Vektor.

Zur Kontrolle, ob der *Stra8*- ORF in der richtigen Orientierung in den Vektor ligiert wurde, und er weiterhin ohne Mutation ist, wurden die positiven Klone erneut einer Sequenzanalyse unterzogen. Es konnte gezeigt werden, dass die pCMV- Myc- Hyg- ORF- *Stra8*- Kolonie 3 den ORF in der richtigen Orientierung integriert hat und auch weiterhin keine Mutationen im *Stra8*- ORF aufwies. Für die Transfektion in die ES- und SSC- Zelllinien wurde von der Kolonie 3 eine Endotoxin- freie Maxipräparation durchgeführt und diese anschließend steril aufgearbeitet.

Zu diesem Zeitpunkt stellte eine andere Arbeitsgruppe unseres Institutes fest, dass der CMV- Promotor in Stammzellen inaktiviert wird und somit eine stabile Überexpression in Stammzellen mit dem verwendeten pCMV- Myc- Hyg- Vektor unwahrscheinlich ist. Der Versuch wurde an dieser Stelle abgebrochen und eine andere Strategie zur stabilen Transfektion und Überexpression mittels Retroviren erarbeitet und begonnen.

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass eine *Stra8*-Expression im Ovar von Mäusen verschiedenen Alters (5d, 10d, 15d, 10d, adult) nachzuweisen ist. Parallel zur zytoplasmatischen Lokalisation von STRA8 im prämeiotischen Keimzellepithel in den männlichen Gonaden (Oulad Abdelghani et al. 1996; Baltus et al. 2006; Zhou et al. 2008a+b), ist STRA8 demnach auch im Ovar im Ooplasma der Oozyten lokalisiert. Die Expression ist dabei nicht auf ein bestimmtes Stadium der Follikelreifung beschränkt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch nach der Ovulation in unbefruchteten Oozyten, aber auch in den Präimplantationsstadien der Embryonalentwicklung *Stra8* auf RNA- und Proteinebene detektiert werden kann. Untersuchungen von ES- und SSC- Zelllinien hinsichtlich der *Stra8* Expression zeigten, dass in allen im Institut etablierten Zelllinien *Stra8* zu detektieren ist. Dabei konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass STRA8 neben der zytoplasmatischen Lokalisation in einigen Zellen der Zelllinien nukleär lokalisiert ist. Differenzierungsversuche zeigten zudem, dass mit vollständiger Ausdifferenzierung der Zellen keine *Stra8*-Expression in ES- und SSC- Zelllinien mehr nachzuweisen ist. Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich einer eventuellen Rolle von *Stra8* bezüglich der Pluripotenz brachten keine eindeutigen Ergebnisse. So konnte gezeigt werden, dass die Chimärenbildung nach Blastozysteninjektion mit ausschließlich *Stra8* positiven ES- Zellen im Vergleich mit einer normalen Mischpopulation von ES- Zellen (die sowohl *Stra8*- positive als auch -negative Zellen enthält), kaum einen Unterschied hervorbringt.

### 4.1 Das Gen *Stra8*

Das Gen *Stra8* (**S**timulated by retinoic acid gene **8**) wurde erstmals von Bouillet et al. (1995) beschrieben. *Stra8* war eines von 50 identifizierten Genen, dessen Expression unter Retinsäurebehandlung in P19 embryonalen Karzinom- Zellen induziert wird. Die cDNA von *Stra8* ist 1455 bp lang. Das Gen besteht aus 9 Exons unterschiedlicher Länge und kodiert ein Protein von 393 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 45 kDa. *Stra8* ist bei der

Maus auf Chromosom 6 lokalisiert. Oulad-Abdelghani et al. konnten 1996 zeigen, dass das STRA8- Protein putative Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase A und C, Casein 2 und die Prolin-abhängigen Kinasen enthält. Zudem besitzt es eine 51 Aminosäuren lange Glutamin- reiche Domäne die anfangs vermuten ließ, dass das Protein STRA8 als ein Bestandteil des Zytoskeletts fungiert. Dies bestätigte sich jedoch nicht (Oulad- Abdelghani et al. 1996). Betrachtet man die Proteinstruktur, so fällt auf, dass das STRA8- Protein eine Helix- loop- Helix- Domäne enthält, welche charakteristisch für Proteine ist, die an DNA binden können.

Im humanen Genom ist es Miyamoto et al. (2002) gelungen, ein Ortholog zum *Stra8*- Gen zu identifizieren. Es ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert und enthält ebenfalls 9 Exons. Das kodierte Protein besteht jedoch nur aus 330 Aminosäuren und enthält keine Glutamin- reiche Domäne. Analog zum Maus- *Stra8* ist seine Expression auf den Testis beschränkt.

#### **4.2 *Stra8*- Expressionsmuster und seine Rolle in der Meiose**

*Stra8* wurde 1996 von Oulad- Abdelghani et al. als Testis- spezifisches Gen beschrieben, welches auf die prämeiotischen Stadien der Spermatogenese beschränkt ist. Er zeigte, dass schon in den Embryonalstadien 12,5 bis 16,5 dpc in den männlichen Gonadenanlagen eine *Stra8*- Expression zu detektieren ist. Dies wurde in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Doktorarbeit bestätigt (Jaroszynski 2005). Weiterführende Untersuchungen bezüglich des *Stra8*- Expressionsmusters zeigten jedoch, dass die *Stra8* Expression nicht nur auf den Testis beschränkt ist. So zeigte Sapin et al. (1999), dass auch in so genannten "Giant"-Zellen des Trophoblasten im Embryonalstadium 10,5-15,5dpc eine *Stra8* Expression nachzuweisen ist. Ergänzend zu der von Menke et al. (2003) und Zhou et al. (2008a) nachgewiesenen *Stra8*- Expression in Ovarien in verschiedenen Embryonalstadien, konnte in der vorgelegten Arbeit eine *Stra8*- Expression in Oozyten auch noch post partum, auf RNA- als auch auf Proteinebene, nachgewiesen werden. Über die Funktion von *Stra8* in der Oogenese ist nur

wenig bekannt. Die Ergebnisse von Baltus et al. (2006) weisen auf eine wichtige Funktion von *Stra8* in der männlichen als auch in der weiblichen Meiose hin. Die Autoren konnten zeigen, dass homozygote *Stra8*- Knock-out- Mäuse beider Geschlechter infertil sind. Die Infertilität ist auf den Meiosearrest der Keimzellen zurückzuführen.

Nayernia et al. (2004) nutzten die *Stra8*- Expression zur Gewinnung von männlichen Keimzellen aus der pluripotenten F9 Zelllinie (Teratokarzinom Zellen). Die *Stra8*- Expression sollte als Marker für den Übertritt in die frühen prämeiotische Phasen dienen und eine Isolierung dieser Zellen ermöglichen. Hierzu wurde zunächst eine *Stra8/ EGFP*- transgene F9- Zelllinie generiert, die unter dem 1,4 kb- *Stra8*- Promotor EGFP (**E**nhanced **G**reen **F**luorescence **P**rotein) exprimiert. Die transfizierten Zellen zeigten keine EGFP-Fluoreszenz und somit keine *Stra8*- Expression. Erst nach Retinsäureinduktion zeigte sich ein moderater Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen (~42%), der durch weitere 2- monatige Kultur der EGFP<sup>+</sup>- Zellen auf 86% gesteigert werden konnte. Mittels FACS Sortierung konnten die *Stra8*- EGFP- positiven Zellen isoliert werden. Eine nähere Charakterisierung der isolierten Zellen zeigte, dass es sich wahrscheinlich um spermatogoniale Stammzellen, undifferenzierte und differenzierte Typ A und Typ B Spermatogonien handelt. Dies war zu erwarten, da bekannt ist, dass *Stra8* in diesen Zellen exprimiert wird (Oulad-Abdelghani et al. 1996; Baltus et al. 2006). Nach Transplantation der sortierten *Stra8*- EGFP- positiven F9- Zellen (auch SSC1 genannt) in die Tubuli seminiferi von männlichen Mäusen, deren Keimzellen vorher zerstört wurden, differenzierten sie weiter zu haploiden Keimzellen. In den Spermien dieser Mäuse konnte das transgene Allel nachgewiesen werden. Nayernia et al. (2006) haben mit Hilfe dieser Strategie, auch aus ES- Zellen haploide Keimzellen generiert. Diese nutzten sie zur Befruchtung von Oozyten mittels ICSI (intrazytoplasmatische Spermieninjektion). Nach der Entwicklung von Zwei- Zell- Stadien wurden die Embryonen in den Uterus pseudoschwangerer Mäuse transferiert. Es kam zur Geburt von lebensfähigen Mäusen.

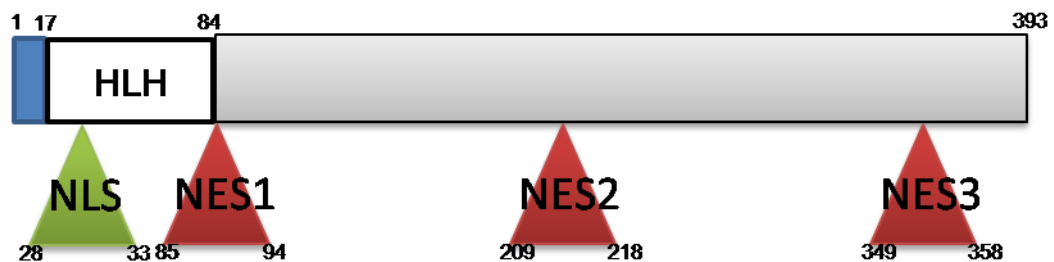
Die erfolgreiche Generierung von männlichen haploiden Keimzellen aus pluripotenten F9- und ES- Zellen mittels der *Stra8*- Expression unterstützt die Annahme, dass *Stra8* als ein Marker der frühen Phase der Meiose genutzt werden kann.

### 4.3 *Stra8*- Expression in pluripotenten Zellen

Als pluripotent bezeichnet man Zellen, die in der Lage sind sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in Zellen aller drei Keimblätter (Mesoderm, Ektoderm, Endoderm) zu differenzieren. Sie sind jedoch im Gegensatz zu totipotenten Zellen nicht in der Lage, einen lebensfähigen Organismus zu bilden. Zu den pluripotenten Zellen gehören ESCs (**E**mbrionic **S**tem **C**ells), EGCs (**E**mbrionic **G**erm **C**ells), Teratokarzinom- Zellen und maGSCs (**m**ultipotent **a**dult **G**ermlin **e** **S**tem **C**ells). Es gibt Hinweise dafür, dass *Stra8* neben der Rolle in der Meiose noch weitere Funktionen hat, welche in Verbindung mit den pluripotenten Eigenschaften von Zellen stehen müssen. So wurde der aktive *Stra8*- Promotor erfolgreich zur Gewinnung von pluripotenten maGSCs aus Testes genutzt (Guan et al. 2006). Diese sind in der Lage, in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Des Weiteren konnte in der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass *Stra8* sowohl in den verschiedenen ES- Zelllinien als auch in den maGSCs (also den SSC- Zelllinien) zu detektieren ist. Wäre *Stra8* lediglich ein prämeiotischer Marker, so wäre zu erwarten, dass pluripotente Zellen die *Stra8*- Expression verlieren oder zu haploiden Zellen differenzieren. Auch nach mehreren Passagen exprimieren diese Zellen neben den Pluripotenzgenen (*Oct3/4*, *Nanog*, *Utf1*, *Esg1*, *Rex1*) jedoch weiterhin *Stra8* und behalten ihre pluripotenten Eigenschaften bei. In den Differenzierungsversuchen von SSC- Zelllinien sowie ES- Zelllinien verschwand hingegen die *Stra8*- Expression, wie auch für andere Pluripotenzgene beschrieben.

Zudem konnte in der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass auch in den frühen Embryonalstadien, in denen die Zellen noch ein pluri- und am Anfang sogar ein totipotentes Differenzierungspotential aufweisen, *Stra8* exprimiert wird. Somit fungiert *Stra8* nicht nur als prämeiotischer Marker. Da

nachgewiesen werden konnte, dass das STRA8- Protein nicht nur zytoplasmatisch, sondern auch zum Teil intranukleär lokalisiert ist, stellt sich die Frage, ob STRA8 eine regulatorische Funktion in der Genexpression der pluripotenten Zellen hat. Für diese Theorie spricht auch die Proteinstruktur von STRA8 mit einer "Helix- loop- Helix" (HLH)- Domäne. Diese ist charakteristisch für Proteine, die an DNA binden. Die von Tedesco et al. (2009) veröffentlichte Arbeit bestätigte diese Vermutung. Die Autoren untersuchten den "shuttle" von STRA8 zwischen Zytoplasma und Nukleus. Im Rahmen der Arbeit konnten die Autoren zeigen, dass das STRA8- Protein in der HLH- Domäne ein "nuclear localisation signal" (NLS) hat und sich downstream davon drei "nuclear export signals" (NES) befinden. Eine Funktion der NLS und der NES2 konnte experimentell bestätigt werden. Für NES1 und NES3 liegen keine Daten vor. Es konnte also gezeigt werden, dass STRA8 aktiv in den Nukleus transportiert wird, an DNA bindet und Transkriptionsprozesse aktiviert (Abb.21).



**Abbildung 21: Struktur des STRA8- Proteins**  
(modifiziert nach Tedesco et al. 2009)  
NLS= "nuclear localisation signal"  
NES= "nuclear export signal"

Dennoch kann *Stra8* keine Schlüsselfunktion hinsichtlich der pluripotenten Eigenschaften von Zellen haben. Wie die von Baltus et al. (2006) veröffentlichten Daten zeigen, sind *Stra8*- Knock- out- Mäuse nicht letal. Die *Stra8*- Knock- out- Mäuse zeigten außer Infertilität keine phänotypischen Anomalien. Auch die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *Stra8* keinen wesentlichen Einfluss auf die pluripotenten Eigenschaften von ES- Zellen hat. Wäre dies der Fall, so hätte die Blastozysteninjektion mit *Stra8*- positiven ES- Zellen, im Vergleich mit

einer Mischpopulation von *Stra8*- positiven und -negativen ES- Zellen, ein eindeutigeres Ergebnis hinsichtlich der Chimärenbildung hervorbringen müssen.

Für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der *Stra8* Funktion in pluripotenten Zellen wurde in unserer Arbeitsgruppe ein *Stra8*- Knock- down-Modell etabliert. Es ist gelungen mittels synthetisch hergestellter siRNA die *Stra8*- Expression in pluripotenten Zellen herunterzuregulieren. Expressionsanalysen dieser Zellen haben eine Hochregulation der Pluripotenzgene *Nanog*, *Oct3/4*, *Klf4* und *Zfp206* ergeben. Frühe Markergene der drei Keimblätter werden hingegen geringer exprimiert. *Stra8* steht demnach tatsächlich im Zusammenhang mit den pluripotenten Eigenschaften von Zellen. Anders als anfangs vermutet, scheint die *Stra8*- Expression jedoch eher Einfluss auf die Differenzierungsoptionen von pluripotenten Zellen zu haben.

#### 4.4 Perspektiven

Durch diese Arbeit konnte die Rolle von *Stra8* als Marker der Meiose, auch in den weiblichen Keimzellen, untermauert werden. Die durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich weiterer Funktionen von *Stra8*, speziell in pluripotenten Zellen, lassen dennoch keine eindeutigen Schlüsse zu. Weiteren Aufschluss über die *Stra8*- Funktion in pluripotenten Zellen wird wohl der schon begonnene erneute Versuch einer stabilen *Stra8*-Überexpression bringen. Analog zu den von Wang et al. (2007a+b) durchgeführten Untersuchungen über *Zfp206* sollen Expressionsstudien mit den *Stra8*- überexprimierenden pluripotenten Zellen durchgeführt werden. In diesen soll speziell auf die Expression von Pluripotenzgenen, aber auch auf Gene zur Differenzierung in Mesoderm, Ektoderm und Endoderm eingegangen werden. Erste Ergebnisse zeigen, dass es bei einer stabilen Überexpression von *Stra8* (2fach) zu einer Herunterregulierung der Expression der Pluripotenzgene kommt. Die Expression verschiedener Differenzierungsmarker lässt vermuten, dass die Zellen durch die Überexpression von *Stra8* in Richtung Mesoderm differenzieren. Weitere



Versuche bezüglich des Differenzierungsverhaltens dieser Zellen sollen darüber Aufschluss geben. Insgesamt spricht aber auch dieses Ergebnis für die Theorie, dass *Stra8* in den pluripotenten Zellen tatsächlich eine Funktion erfüllt und seine Expression im Zusammenhang mit den pluripotenten Eigenschaften der Zellen steht bzw. die Differenzierung von pluripotenten Zellen u.a. durch *Stra8* kontrolliert wird. In weiteren Versuchen soll nun überprüft werden, wie sich Zellen, in denen *Stra8* ausgeschaltet wurde, während der Differenzierung verhalten.

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass sowohl in den unbefruchteten Oozyten als auch in den verschiedenen Embryonalstadien *Stra8* auf Protein und mRNA Ebene nachzuweisen ist, liegt die Vermutung nahe, dass *Stra8* auch eine Rolle während der frühen Embryonalentwicklung hat. Die ersten zwei bis vier Teilungen der Zygote werden durch maternale Transkriptionsfaktoren reguliert (Übersicht in Hardy und Spanos 2002), da sich die Zygote bis zu diesem Zeitpunkt in einer transkriptionellen Inaktivität befindet. *Stra8* könnte demnach als maternaler Transkriptionsfaktor dienen. Da *Stra8* jedoch bis zum Stadium der Blastozyste nachgewiesen werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass es zu einer *Stra8*-Genaktivierung auch in der frühen Embryogenese kommt.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das *Stra8* (**S**timulated by retinoic acid gene **8**)- Gen hinsichtlich seines Expressionsmusters und seiner Rolle in pluripotenten Zellen genauer untersucht. Es konnte zu dem schon bekannten Expressionsmuster im Testis auch eine *Stra8*- Expression im Ovar, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene, nachgewiesen werden. Anders als im Testis konnte *Stra8* im Ovar jedoch in allen Oozyten der verschiedenen Entwicklungsstadien der Oogenese immunhistologisch detektiert werden. Bekannt war eine *Stra8*- Expression während der Oogenese bis dato nur in Mäuseembryonen (Menke et al. 2003; Zhou et al. 2008), jedoch nicht während der Oogenese post partum. Ob *Stra8* als maternaler Transkriptionsfaktor dient oder Einfluss auf die Oogenese auch noch post partum hat, lässt sich noch nicht sagen. Die in dieser Arbeit nachgewiesene *Stra8*- Expression in verschiedenen Stadien von Präimplantationsembryonen, auch schon im Zwei- Zell- Stadium, spricht für die These, dass *Stra8* als maternaler Transkriptionsfaktor dient.

Des Weiteren konnte *Stra8* in verschiedenen ES- und SSC- Zelllinien auf RNA- und Proteinebene detektiert werden. Von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass STRA8 in diesen Zellen zum Teil zytoplasmatisch, aber auch intranukleär lokalisiert ist. Parallel zu der vorliegenden Arbeit wurde der "shuttle" von STRA8 zwischen Kern und Zytoplasma auch von Tedesco et al. (2009) beschrieben und genauer untersucht. Die Proteinstruktur von STRA8, sowie die Ergebnisse von Tedesco et al. (2009) weisen darauf hin, dass STRA8 in pluripotenten Zellen aktiv in den Nukleus transportiert wird, an DNA bindet und Transkriptionsprozesse aktiviert. Es liegt demnach nahe anzunehmen, dass *Stra8* eine Rolle bei der Differenzierung von pluripotenten Zellen haben könnte. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit lassen jedoch keinen näheren Schluss zu, welche Rolle *Stra8* in pluripotenten Zellen genau hat. Es konnte gezeigt werden, dass die *Stra8*- Expression synchron zu der Expression von Pluripotenzgenen auch nach mehreren Passagen noch zu detektieren ist und bei Differenzierungsversuchen verschwindet. Um zu untersuchen, ob *Stra8*-

positive- ES- Zellen ein höheres oder niedrigeres Pluripotenz- Potenzial haben als *Stra8*- negative, wurden Blastozysteninjektionen mit *Stra8*- positiven ES- Zellen im Vergleich mit einer Mischpopulation von *Stra8*- positiven und -negativen ES-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *Stra8* keinen wesentlichen Einfluss auf die pluripotenten Eigenschaften von ES- Zellen hat, da ansonsten ein eindeutigeres Ergebnis hinsichtlich der Chimärenbildung zu erwarten gewesen wäre. Um die Rolle von *Stra8* in pluripotenten Zellen genauer zu verifizieren, sollten im Rahmen dieser Arbeit ES- Zellen etabliert und untersucht werden, die *Stra8* stabil überexprimieren. Mit der erarbeiteten Strategie konnte dieser Versuch jedoch nicht durchgeführt werden und wurde abgebrochen. Eine andere Strategie zur stabilen Transfektion und Überexpression wurde erarbeitet und begonnen.

## 6. Literaturverzeichnis

**Adham IM, Nayernia K, Engel W.** (1997): Spermatozoa lacking Acrosin protein show delayed fertilisation. *Mol Rep Dev* 46: 370-376.

**Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215 (3): 403-410.

**Baltus AE, Menke DB, Hu YC, Goodheart ML, Carpenter AE, de Rooij DG, Page DC** (2006): In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet* 38 (12): 1430-1434.

**Beddington RS, Robertson EJ** (1989): An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 105 (4): 733-737.

**Birnboim HC, Doly J** (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7 (6): 1513-1523.

**Bouillet P, Chazaud C, Oulad-Abdelghani M, Dollé P, Chambon P** (1995): Sequence and expression pattern of the *Stra7* (*Gbx-2*) homeobox-containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells. *Dev Dyn* 204 (4): 372-382.

**Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A** (2003): Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113 (5): 643-655.

**Chien A, Edgar DB, Trela JM** (1976): Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 7 (3): 1550-1557.

**Chiquoine AD** (1954): The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* 118 (2):135-146.

**Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Firpo MT, Pera RA** (2004): Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum Mol Genet* 13 (7): 727-739.

**Clark JM** (1988): Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 16 (20): 9677-9686.

**Denhardt DT** (1966): A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 23 (5): 641-646.

**Dihazi H, Dihazi GH, Nolte J, Meyer S, Jahn O, Müller GA, Engel W** (2009): Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells: comparative proteomic approach. *J Proteome Res* 8 (12): 5497-5510.

**Dressel R, Guan K, Nolte J, Elsner L, Monecke S, Nayernia K, Hasenfuss G, Engel W** (2009): Multipotent adult germ-line stem cells, like other pluripotent stem cells, can be killed by cytotoxic T lymphocytes despite low expression of major histocompatibility complex class I molecules. *Biol Direct* 4: 31.

**Dressel R, Nolte J, Elsner L, Novota P, Guan K, Streckfuss-Bömeke K, Hasenfuss G, Jaenisch R, Engel W** (2010): Pluripotent stem cells are highly susceptible targets for syngeneic, allogeneic, and xenogeneic natural killer cells. *FASEB J* [Epub ahead of print]

**Feinberg AP, Vogelstein B** (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132 (1): 6-13.

**Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G** (2006): Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440 (7088): 1199-1203.

**Hanahan D** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166 (4): 557-580.

**Hardy K and Spanos S** (2002): Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J Endocrinol Rev* 172 (2): 221-236.

**Hodge R** (1994): RepARATION of RNA gel blots. *Methods Mol Biol* 28: 49-54.

**Horie K, Takakura K, Taii S, Narimoto K, Noda Y, Nishikawa S, Nakayama H, Fujita J, Mori T** (1991): The expression of c-kit protein during oogenesis and early embryonic development. *Biol Reprod* 45 (4): 547-552.

**Jaroszynski L** : Expression and functional analysis of *Tex18* and *Stra8* genes in male germ cells. Math.- Naturwiss. Diss. Göttingen 2005

**Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A** (1991) : Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 19 (15): 4293.

**Maldonado-Saldivia J, van den Bergen J, Krouskos M, Gilchrist M, Lee C, Li R, Sinclair AH, Surani MA, Western PS** (2007): *Dppa2* and *Dppa4* are closely linked SAP motif genes restricted to pluripotent cells and the germ line. *Stem Cells* 25 (1): 19-28.

**Martin GR, Evans MJ** (1975): Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 72 (4): 1441-1445.

**Menke DB, Koubova J, Page DC** (2003): Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev Biol* 262 (2): 303-312.

**Miyamoto T, Sengoku K, Takuma N, Hasuike S, Hayashi H, Yamauchi T, Yamashita T, Ishikawa M** (2002): Isolation and expression analysis of the testis-specific gene, STRA8, stimulated by retinoic acid gene 8. *J Assist Reprod Genet* 19 (11): 531-535.

**Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC** (1993): Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 90 (18): 8424-8428.

**Nayernia K, Li M, Jaroszynski L, Khusainov R, Wulf G, Schwandt I, Korabiowska M, Michelmann HW, Meinhardt A, Engel W** (2004): Stem cell based therapeutical approach of male infertility by teratocarcinoma derived germ cells. *Hum Mol Genet* 13 (14): 1451-1460.

**Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathsack K, Drusenheimer N, Dev A, Wulf G, Ehrmann IE, Elliott DJ, Okpanyi V, Zechner U, Haaf T, Meinhardt A, Engel W** (2006): In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell* 11 (1): 125-132.

**Nolte J**: Versuche zur Differenzierung von embryonalen Stammzellen und Tumorzellen zu männlichen Keimzellen. Biologische Diplomarbeit Göttingen 2005

**Nolte J**: Zur Pluripotenz spermatogonialer Stammzellen. Math.- Naturwiss. Diss. Göttingen 2008

**Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Décimo D, Gansmuller A, Heyberger S, Dollé P, Bronner S, Lutz Y, Chambon P** (1996): Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by *Stra8*, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol* 135 (2) 469-477.

**Pesce M, Schöler HR** (2001): Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 19 (4): 271-278.

**Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA** (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839): 487-491.

**Saitou M, Barton SC, Surani MA** (2002): A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418 (6895): 293-300.

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T**: Molecular cloning: a laboratory manual. 2. Auflage; Cold Spring Harbor, New York, USA 1989.

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74 (12): 5463-5467.

**Sapin V, Bouillet P, Oulad-Abdelghani M, Dastugue B, Chambon P, Dolle P** (1999): Differential expression of retinoic acid-inducible (*Stra*) genes during mouse placentation. *Mech Dev* 92: 295-299.

**Tedesco M, La Sala G, Barbagallo F, De Felici M, Farini D** (2009): STRA8 shuttles between nucleus and cytoplasm and displays transcriptional activity. *J Biol Chem* 284 (51): 35781-35793.

**Wang ZX, Kueh JL, Teh CH, Rossbach M, Lim L, Li P, Wong KY, Lufkin T, Robson P, Stanton LW** (2007a) : Zfp206 is a transcription factor that controls pluripotency of embryonic stem cells. *Stem Cells* 25 (9): 2173-2182.



**Wang ZX, Teh CH, Kueh JL, Lufkin T, Robson P, Stanton L W** (2007b): Oct4 and Sox2 directly regulate expression of another pluripotency transcription factor, Zfp206, in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 282 (17): 12822-12830.

**Western P, Maldonado-Saldivia J, van den Bergen J, Hajkova P, Saitou M, Barton S, Surani MA** (2005): Analysis of Esg1 expression in pluripotent cells and the germline reveals similarities with Oct4 and Sox2 and differences between human pluripotent cell lines. *Stem Cells* 23 (10): 1436-1442.

**Zechner U, Nolte J, Wolf M, Shirneshan K, Hajj NE, Weise D, Kaltwasser B, Zovoilis A, Haaf T, Engel W** (2009): Comparative methylation profiles and telomerase biology of mouse multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells. *Mol Hum Reprod* 15 (6): 345-353.

**Zhang W, Walker E, Tamplin OJ, Rossant J, Stanford WL, Hughes TR** (2006): Zfp206 regulates ES cell gene expression and differentiation. *Nucleic Acids Res* 34 (17): 4780-4790.

**Zhou Q, Li Y, Nie R, Friel P, Mitchell D, Evanoff RM, Pouchnik D, Banasik B, McCarrey JR, Small C, Griswold MD** (2008a): Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid in vitro. *Biol Reprod* 78 (3): 537-545.

**Zhou Q, Nie R, Li Y, Friel P, Mitchell D, Hess RA, Small C, Griswold MD** (2008b): Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) in spermatogenic cells induced by retinoic acid: an in vivo study in vitamin A-sufficient postnatal murine testes. *Biol Reprod* 79 (1): 35-42.

**Zovoilis A, Nolte J, Drusenheimer N, Zechner U, Hada H, Guan K, Hasenfuss G, Nayernia K, Engel W (2008):** Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells have similar microRNA profiles *Mol Hum Reprod* 14 (9): 521-529.

### **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. W. Engel für die Bereitschaft bedanken, diese Arbeit zu betreuen. Vielen Dank für die intensive Betreuung, die vielen Anregungen und für die zügige Korrektur des Manuskripts.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. J. Nolte für die Bereitstellung des Themas, für die vielen Anregungen, ihre umfassende Unterstützung bei der Versuchsplanung und –durchführung und die gute Zusammenarbeit, die sehr zu meiner Motivation und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt auch meinen Kollegen aus dem Labor 107 für die gute Zusammenarbeit und die gute Atmosphäre. Insbesondere bedanke ich mich bei Nadja und Sandra, die mir immer hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite standen. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht, mit Euch in dieser Arbeitsgruppe zu arbeiten.

Danke natürlich auch an alle anderen Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik.

### **Lebenslauf**

Mein Name ist Linda Kotzenberg. Ich wurde am 04. Juli 1983 als drittes von vier Kindern des Leiters der „Werkstätten für behinderte Menschen“ der Lebenshilfe Detmold e.V., Dipl. Ing. Jochen Kotzenberg, und der Hausfrau Hildegard Kotzenberg, geborene Reinsch, in Steinheim geboren.

Von 1990-1994 besuchte ich die Werretalschule Remmighausen. Anschließend war ich Schülerin der Geschwister – Scholl - Gesamtschule Detmold, an der ich 2003 meine allgemeine Hochschulreife erlangte.

Nach meiner Schulzeit absolvierte ich zunächst ein zweimonatiges Pflegedienstpraktikum. Da ich ein Jahr auf einen Studienplatz für das Studium zur Humanmedizin warten musste, nutzte ich diese Zeit, um diversen kleineren Beschäftigungen nachzugehen. Unter anderem arbeitete ich als Praktikantin in einer Kommunikationsagentur, wo ich bei dem Erstellen von Pressespiegeln half, danach in einer Fabrik für Pyrotechnik. Außerdem unterstützte ich eine ältere Dame nach dem Tode ihres Mannes. Zudem verbesserte ich meine Englischkenntnisse durch einen zweimonatigen Sprachkurs auf Malta.

Im Wintersemester 2004/2005 begann ich mein Humanmedizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen, das ich voraussichtlich im Wintersemester 2010/2011 abschließen werde. Währenddessen absolvierte ich diverse Praktika und Famulaturen in unterschiedlichsten Fachgebieten und Städten, unter anderem auch eine zweimonatige Famulatur in der Geburtshilfe bzw. Notfallaufnahme in Port Shepstone, Südafrika. Von Dezember 2007 bis August 2009 arbeitete ich parallel zu meinem Studium, unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Engel, an der vorliegenden experimentellen Arbeit zur Dissertation am Institut für Humangenetik der Georg-August-Universität Göttingen.



