

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

GENOMWEITE EXPRESSIONSANALYSE VON SOX17 POSITIVEN, ENDODERMALEN VORLÄUFERZELLEN DER MAUS

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Tobias Nolden

aus Grevenbroich

Mai 2010

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. H. Himmelbauer

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. R. Mutzel

Disputation: 09. August 2010

Für meine Eltern



Frühe Postimplantationsstadien der Maus

 ${\it Illustration\ von\ Rosa\ Beddington,\ *1956- \dagger 2001}$

Nicht die Geburt, die Hochzeit oder der Tod, sondern die Gastrulation ist die wirklich entscheidende Phase in unserem Leben.

Lewis Wolpert, 1986

Zusammenfassung

Der erste große Schritt in der embryonalen Entwicklung der Vertebraten ist die Bildung der drei Keimblätter - Ektoderm, Mesoderm und Endoderm - während der Gastrulation. Embryonale Zellen des Epiblasten verlieren in diesem Prozess ihre Pluripotenz und schlagen unterschiedliche Entwicklungswege ein, die auf molekularer Ebene nicht vollständig charakterisiert sind. Embryonale Stammzellen (ES Zellen), die aus den pluripotenten Zellen des Epiblasten stammen, exprimieren größtenteils die gleichen Gene wie Epiblastenzellen und können *in vitro* gezielt in spezialisierte Zelltypen aller drei Keimblätter differenziert werden. Daher geht man davon aus, dass auch zu Beginn der ES Zelldifferenzierung transient Keimblatt-spezifische Gene exprimiert werden.

während der Gastrulation zwischen Tag 6,0 und 7,5 der Das Maus-Embryonalentwicklung entstehende endodermale Keimblatt wird auch als definitives Endoderm (DE) bezeichnet. Aus dem DE leiten sich die Organe des gastrointestinalen und respiratorischen Trakts, wie zum Beispiel Leber, Pankreas, Intestinum und Lunge, ab. Neben dem DE entstehen unabhängig von der Gastrulation, zwischen Tag 4,5 bis 5,0 parietales Endoderm (PE) und viscerales Endoderm (VE), die extraembryonales Gewebe bilden. Das direkt dem Epiblasten aufliegende VE spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Positionierung der Körperachsen und der Induktion bestimmter embryonaler Strukturen, wie zum Beispiel der Kopffalte. Obwohl sich VE und DE in der Embryonalentwicklung völlig unterschiedlich ableiten lassen, besitzen sie dennoch gemeinsame funktionelle und molekulare Eigenschaften. Beide Endodermderivate exprimieren den Transkriptionsfaktor Sox17, der eine zentrale Rolle bei der Endodermentwicklung spielt. Damit ist Sox17 ein idealer genetischer Marker der Endodermdifferenzierung.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die frühe Differenzierung von murinen ES Zellen in *Sox17*-exprimierende endodermale Zellen *in vitro* zu untersuchen und bisher nicht beschriebene Gene des endodermalen Keimblatts zu charakterisieren. Eine transgene ES Zelllinie wurde etabliert, die das rot-fluoreszierende DsRedExpress-Protein (DsRed) unter der Kontrolle des *Sox17* Promotors exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die ES-Zellen, die ihre Pluripotenz verlieren und endodermale Identität annehmen, das DsRed Transgen in vergleichbarer Weise zum endogenen *Sox17* exprimieren und damit ein geeignetes *in vitro* Modell für Endoderm-Differenzierung darstellen. Die globale Analyse der Genexpression und Untersuchung der Gen-Ontologie zeigten, dass *Sox17* exprimierende Zellen dem visceralen, parietalen und definitiven Endoderm zuzuordnen sind. Die Analyse des Transkriptoms erlaubte es zudem neue Endoderm-assozierte

Gene zu identifizieren. Die Expression der Gene *Prss3*, *Plet1*, *061000012Rik*, *Chsy3*, 2210011C24Rik, *Gm10664*, *Sel113*, *Cdh6*, *Slc22a23*, *Pkdcc*, *Gpr120*, *Ttc6* und 210300C02Rik im embryonalen Endoderm und in daraus abgeleiteten Organen in vivo konnte durch *in situ* Hybridisierung gezeigt werden. Darüber hinaus konnten mit *Ocln*, *Rfx6*, *Cdh6* und *0610010012Rik* Gene identifiziert werden, deren Expression *in vitro* von SOX17 beeinflusst wird. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der in dieser Arbeit etablierten Zelllinie zur Identifizierung unbekannter Endoderm-assozierter Gene.

Abstract

The major first step in embryonic development of vertebrates is the formation of three germ layers during the process of gastrulation - the ectoderm, the mesoderm and the endoderm. During gastrulation, embryonic cells of the epiblast loose their pluripotency and adopt different developmental fates. However, the underlying molecular mechanisms have not been fully elucidated. Embryonic stem cells (ESCs) derived from the epiblast largely express the same genes as the pluripotent epiblast cells and *in vitro* they can be differentiated into cell types of the above mentioned three germ layers. Therefore it is hypothesized that directed ESC differentiation begins with the transient expression of germ layer-specific genes.

Endoderm formation in the vertebrate embryo occurs during distinct time periods. In the mouse, the definitive endoderm (DE) forms during gastrulation between day 6.0 and 7.5 of embryonic development, whereas parietal endoderm (PE) and visceral endoderm (VE) arise independently prior to gastrulation between day 4.5 and 5.0. DE gives rise to organs of the gastrointestinal and respiratory tract including thymus, lung, liver, pancreas and intestine, while PE and VE contribute to extra-embryonic tissues. The visceral endoderm surrounding most of the epiblast is important for the induction of embryonic body axes and head folds. Although VE and DE are formed independently during embryonic development, they share common functional and molecular properties. Both endoderm structures express the transcription factor *Sox17* which plays a crucial role in endoderm development. Thus, *Sox17* is thought to be an ideal marker molecule for endoderm differentiation.

The aim of this project was to investigate the early differentiation of murine ES cells into embryoid bodies which express *Sox17* and to discover and characterize previously unknown genes important for endoderm formation. For this purpose a transgenic ES cell line was established which expresses the red-fluorescent DsRedExpress (DsRed) protein under the control of the *Sox17* promotor. It is shown that ES cells which loose their pluripotency and adopt an endodermal identity express the DsRed transgene in a *Sox17* comparable manner. Therefore, the *Sox17*::DsRed ES cell line represents a suitable *in vitro* model for endoderm differentiation. Global analysis of gene expression and gene ontology showed that the *Sox17* expressing cell population was composed of visceral, parietal and definitive endoderm cells. In addition, the analysis of the *Sox17*-specific transcriptome identified unknown endoderm-associated genes. *In situ* hybridisation detected expression of the genes *Prss3*, *Plet1*, 061000012Rik, *Chsy3*, 2210011C24Rik, *Gm10664*, *Sel113*,

Cdh6, *Slc22a23*, *Pkdcc*, *Gpr120*, *Ttc6* and *210300C02Rik* within the embryonic endoderm and related organs *in vivo*. The genes *Ocln*, *Rfx6*, *Cdh6* and *0610010O12Rik* were identified with their expression *in vitro* being directed by SOX17 *in vitro*. In summary, this work identified previously unknown endoderm-associated genes and made an important contribution to the characterisation of ES cell derived endodermal cell types.

Diese Arbeit entstand in der Abteilung Lehrach, Arbeitsgruppe Himmelbauer im Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin. Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2004 bis Mai 2010 angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Veröffentlichungen von irgendwelchen Teilen der vorliegenden Dissertation sind von mir nicht vorgenommen worden.

Weiter erkläre ich, dass ich nicht schon anderweitig einmal die Promotionsabsicht angemeldet oder ein Promotionseröffnungsverfahren beantragt habe.

T. Nolden

Tobias Nolden

11. August 2010

Inhaltsverzeichnis

Ζu	Isami	menfas	sung	111
AŁ	ostrac	et		v
Та	belle	nverzei	ichnis	XIII
AŁ	obildu	Ingsve	rzeichnis	XV
At	okürz	ungsve	erzeichnis	XVII
1	Einl	eitung		1
	1.1	Die M	laus — Etablierung eines Modellorganismus	1
	1.2	Frühe	embryonale Entwicklung der Maus	3
		1.2.1	Präimplantation	3
		1.2.2	Implantation	4
		1.2.3	Gastrulation	5
	1.3	Embr	yonale Stammzellen	7
		1.3.1	Selbsterneuerung und Differenzierung embryonaler Stammzellen .	8
		1.3.2	Molekulare Grundlagen der Selbsterneuerung und Pluripotenz	8
	1.4	Molel	kulare Identität des extraembryonalen und definitiven Endoderms .	11
		1.4.1	Derivate des extraembryonalen Endoderms — primitives, viscera-	
			les und parietales Endoderm	11
		1.4.2	Definitives Endoderm	12
		1.4.3	Die zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors SOX17 während der	
			Endodermentwicklung	13
	1.5	Embr	yonale Stammzellen als Modell zur Rekapitulation der Endoderm-	
		entwi	cklung	15
	1.6	Zielse	tzung	18
2	Mat	erial ur	nd Methoden	19
	2.1	Mater	ial	19
		2.1.1	Chemikalien und sonstige Reagenzien	19

	2.1.2	Enzyme	20
	2.1.3	Antikörper	20
	2.1.4	DNA- und Proteingrößenstandards	20
	2.1.5	Reaktions-Kits	21
	2.1.6	Oligonukleotide für Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)	21
	2.1.7	Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien	21
	2.1.8	Verbrauchsmaterial	26
	2.1.9	Mausstämme	26
	2.1.10	Vektoren	27
	2.1.11	Eukaryotische Zelllinien	28
	2.1.12	BAC Klone und Bakterienstämme	29
	2.1.13	Geräte	30
2.2	Molek	ularbiologische Methoden	31
	2.2.1	Isolierung, Aufreinigung und Analyse von Nukleinsäuren	31
	2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
	2.2.3	Sequenzierung	36
	2.2.4	Synthese von cDNA — Nachweis und Quantifizierung von RNA-	
		Transkripten	37
	2.2.5	Manipulation und Klonierung von DNA-Molekülen	39
	2.2.6	Gateway Technologie	42
	2.2.7	RedET-Rekombination in <i>E. coli</i>	43
	2.2.8	Southern-Blot	47
2.3	Zellbio	ologische Methoden	48
	2.3.1	Allgemeine Zellkulturarbeiten	48
	2.3.2	Kultur verschiedener eukaryotischer Zelllinien	49
	2.3.3	Differenzierung embryonaler Stammzellen	50
	2.3.4	DNA Transfektion von Zellen	51
	2.3.5	Luciferase-Expressionsassays	52
	2.3.6	Bestimmung des Karyotyps	53
	2.3.7	Durchflußcytometrie	54
	2.3.8	Mikroskopie	55
2.4	Affym	etrix-Array Analyse	55
	2.4.1	Hybridisierung isolierter RNA auf Affymetrix-Arrays	55
	2.4.2	Bioinfomatische Auswertung der Affymetrix-Affay	56
2.5	Embry	vologische Methoden	56
	2.5.1	Blastozysteninjektion	56
	2.5.2	<i>Whole-mount in situ</i> Hybridisierung	57

3	Erge	ebnisse	•	63
	3.1	Sox17:	:DsRed Reporterzelllinie	63
		3.1.1	Struktur des <i>Sox17</i> Gens der Maus	63
		3.1.2	Identifizierung von Sox17 Bacterial Artificial Chromosome Klonen	64
		3.1.3	Klonierung der Reportergenkassetten	65
		3.1.4	RedET Rekombination	67
		3.1.5	Homologe Rekombination in ES Zellen	69
		3.1.6	Endodermale Differenzierung	71
	3.2	Die Ex	pression des DsRed Reportergens <i>in vivo</i>	75
		3.2.1	Herstellung der Mauslinie <i>Sox17</i> ^{tm1(DsRed)Tbnl}	75
		3.2.2	Analyse der $Sox17^{tm1(DsRed)Tbnl}$ Mauslinie	76
	3.3	Analy	se des Transkriptoms von <i>Sox17</i> ::DsRed-positiven Zellen	79
		3.3.1	Isolierung Sox17::DsRed-exprimierender Zellpopulationen durch	
			FACS	79
		3.3.2	Affymetrix-Analysen der <i>Sox17</i> ::DsRed ES Zelllinie	81
	3.4	Analy	se endodermaler Kandidatengene	95
		3.4.1	Identifizierung bisher nicht beschriebener Sox17-regulierter Gene .	96
		3.4.2	Expressions analyse der Kandidatengene <i>in vivo</i>	97
		3.4.3	Einfluss von SOX17 auf die Expression untersuchter endodermaler	
			Gene <i>in vitro</i>	102
4	Disk	ussion		111
	4.1	Sox17:	:DsRed ES Zelllinie und Differenzierung	111
		4.1.1	Verwendung von DsRed als Reportergen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	111
		4.1.2	Die Integration des DsRedExpress Reporters in den <i>Sox17</i> Locus .	112
		4.1.3	Differenzierung der <i>Sox17</i> ::DsRed ES Zelllinie <i>in vitro</i>	113
		4.1.4	Phänotypen transgener <i>Sox17</i> ::DsRed Mäuse	117
	4.2	Affym	etrix-Analyse des <i>Sox17</i> ::DsRed ⁺ Transkriptoms	118
		4.2.1	FACS Isolierung <i>Sox17</i> ::DsRed-exprimierender Zellpopulationen .	118
		4.2.2	Hybridisierung der Affymetrix-Arrays	118
		4.2.3	Gen-Ontologie	119
	4.3	Neuid	entifizierte Gene im endodermalen Keimblatt	126
		4.3.1	Die Expression verschiedener Kandidatengene in vivo und	
			die Aktivierung der Promotoren durch SOX17 im Luciferase-	
			Expressionstest	127
		4.3.2	Identifizierung von SOX17 Bindestellen durch phylogenetisches	
			Footprinting	134

4.4	Schlussfolgerung und Ausblick	135					
Anhang		137					
A.1	Hierarchische Clusteranalyse	137					
A.2	KEGG Pathways	138					
	A.2.1 KEGG Pathway "Zellkommunikation"	138					
	A.2.2 KEGG Pathway "Tight junction"	139					
A.3	Endodermale Kandidatengene	140					
A.4	PCR Oligonukleotide	144					
Literaturverzeichnis 1							
Danksagung							

Tabellenverzeichnis

2.1	Monovalente Salze zur Fällung von Nukleinsäuren	35
2.2	Antibiotikaresistenzen der verwendeten Vektoren und Genkassetten	46
2.3	Transfektion mit Lipofectamin2000	52
3.1	Kartierte <i>Sox17</i> BAC Klone	65
3.2	Homologe Rekombination des Sox17::DsRed Reporters in CGR8 ES Zellen	69
3.3	Homologe Rekombination des Sox17::DsRed Reporters in C57BL/6 x	
	129/Sv F1 ES Zellen	75
3.4	Generierung der transgenen Mauslinie <i>Sox17</i> ^{tm1(DsRed)1bnl}	76
3.5	Mendel-Vererbung des <i>Sox17</i> ::DsRed Allels	79
3.6	RNA Konzentrationen und Integrität	81
3.7	Mouse Genome 430 2.0 Array	82
3.8	ANOVA und Student's <i>t</i> -Test <i>p</i> -Werte	88
3.9	GO-Annotierung von Transkripten hochreguliert in $Sox17$::DsRed ⁺	94
3.10	GO-Annotierung von Transkripten herunterreguliert in $Sox17$::DsRed ⁺	95
3.11	Liste untersuchter endodermaler Kandidatengene	97
3.12	<i>In situ</i> RNA-Sonden endodermaler Kandidaten-Gene	98
3.13	Gewebsexpression endodermaler Kandidatengene	101
3.14	Promotoren endodermaler Kandidatengene	102
4.1	GO assoziiert mit der Bildung von Zell-Zellkontakten in der apikal-	
	lateralen Plasmamembran	120
4.2	KEGG Pathways assoziiert mit der Bildung von Zell-Zellkontakten in der	
	apikal-lateralen Plasmamembran	121
4.3	GO assoziiert mit der Bildung von Blutgefäßen	122
4.4	GO assoziiert mit Gastrulation	123
4.5	GO assoziiert mit der Entwicklung des Endoderms	123
4.6	GO assoziiert mit der embryonalen Darmentwicklung	124
4.7	GO assoziiert mit der Bildung von Lunge und Trachea	124
4.8	GO assoziiert mit der Bildung tubulärer Strukturen	126
4.9	Vergleich identifizierter Markergene mit Literaturdaten	127

A.1	Endodermale Kandidatengene	•		•		•	•	•		•	•	•			•	•	•	•	•	•			140
-----	----------------------------	---	--	---	--	---	---	---	--	---	---	---	--	--	---	---	---	---	---	---	--	--	-----

Abbildungsverzeichnis

1.1	Phylogenie und Verbreitung des Genus <i>Mus</i>	2
1.2	Frühe Embryonalentwicklung der Maus	4
1.2	Frühe Embryonalentwicklung der Maus — Fortsetzung	5
1.3	Darstellung der frühen Embryonalentwicklung	6
1.4	Signaltransduktionswege der Pluripotenz und der Selbsterneuerung	10
1.5	Die Sox-Protein-Familie	14
1.6	Differenzierungsstrategien	16
2.1	RedET-Rekombination in <i>E. coli</i>	44
2.2	Schematischer Aufbau des Southern-Blots	47
2.3	<i>In vitro</i> Transkription von RNA Sonden	59
3.1	Organisation des murinen <i>Sox17</i> Locus	64
3.2	Klonierung der Reportergenkassetten	66
3.3	RedET-Rekombination in <i>E. coli</i>	68
3.4	Homologe Rekombination in ES Zellen	70
3.5	Spontane Differenzierung nach LIF-Entzug	72
3.6	EB Differenzierung von <i>Sox17</i> ::DsRed ES Zellen	74
3.7	Expression des <i>Sox17</i> ::DsRed Transgens während der Embryogenese	77
3.8	<i>Sox</i> 17 ^{DsRed} /DsRed knock-out Phänotyp	78
3.9	FACS Sortierung der <i>Sox17</i> ::DsRed ES Zelllinie	80
3.10	Vergleich von Affymetrix-Array und qPCR Daten	83
3.11	Expression von Markergenen innerhalb des Affymetrix-Datensatzes	84
3.12	Expression von Markergenen innerhalb des Affymetrix-Datensatzes	86
3.13	Hierarchische Clusteranalyse	91
3.14	Quantitative PCR von endodermal-assoziierten Kandidatengenen	96
3.15	<i>Whole-mount in situ</i> Hybridisierung	101
3.16	Luciferase-Expressionstests	103
3.17	LiCl aktiviert den WNT-Signalweg durch Inhibition von GSK3	104
3.18	Luciferase-Expressionstest endodermaler Kandidatengene	105

Dosisabhängigkeit von SOX17 vermittelter Transkription endodermaler						
Gene	106					
Promotoranalysen	108					
Promotoranalysen (Fortsetzung)	109					
Hierarchische Clusteranalyse	137					
KEGG Pathway "Zellkommunikation"	138					
KEGG Pathway "Tight junction"	139					
	Dosisabhängigkeit von SOX17 vermittelter Transkription endodermalerGenePromotoranalysenPromotoranalysen (Fortsetzung)Hierarchische ClusteranalyseKEGG Pathway "Zellkommunikation"KEGG Pathway "Tight junction"					

Abkürzungsverzeichnis

Amp^{R}	Ampicillinresistenz oder -resistent
AVE	anterior-viscerales Endoderm
BAC	engl. Bacterial Artificial Chromosome
BSA	Bovines Serumalbumin
CMV	Cytomegalievirus
DAVID	Database for Annotation Visualisation and Integrated Discovery
DE	definitives Endoderm
DIG	Digoxygenin
DTT	Dithiothreitol
Е	Embryonalstadium — Tag <i>post coitum</i> (p.c.)
EB	engl. embryoid body, Embryo-ähnlicher Körper
ES Zelle	embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
ExE	extraembryonales Endoderm
ExM	extraembryonales Mesoderm
FACS	engl. Fluorescence activated cell sorting
Gen ^{<i>R</i>}	Geneticinresistenz oder -resistent
GO	Gene Ontology
HMG	engl. High Mobility Group
ICM	Innere Zellmasse (engl. inner cell mass)
IRES	engl. internal ribosomal entry site
Kan ^{<i>R</i>}	Kanamycinresistenz oder -resistent
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LIF	leukemia inhibitory factor
MCS	engl. Multiple Cloning Site
MEF	embryonale Fibroblasten der Maus
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
ORF	engl. Open Reading Frame
oriC	Replikationsursprung
p.c.	post coitum

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	parietales Endoderm
PFA	Paraformaldehyd
PrE	primitives Endoderm
Puro ^{<i>R</i>}	Puromycinresistenz oder -resistent
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RIN	engl. RNA integrity number
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SV40	Simian Virus 40
T_m	Annealing-Temperatur
t-Sox17	kurze Spleißvariante von Sox17 ohne DNA-bindende HMG-Box
Tet ^{<i>R</i>}	Tetracyclinresistenz oder -resistent
TFBS	Transkriptionsfaktorbindestellen
TSS	Transkriptionsstartstelle
UTR	untranslatierte Region eines Gens
VE	viscerales Endoderm

1.1 Die Maus — Etablierung eines Modellorganismus

Bereits zu Beginn der Neolithischen Revolution vor etwa zehntausend Jahren hatte sich die Hausmaus, *Mus musculus*, auf dem Indischen Subkontinent in die vier Unterarten *Mus musculus domesticus, Mus musculus musculus, Mus musculus castaneus* und *Mus musculus bactrianus* aufgespalten. Die Ausbreitung der unterschiedlichen Subspezies über den gesamten Globus vollzog sich parallel zur Verbreitung der menschlichen Zivilisation, da sich die Maus sehr gut an die zunehmend sesshafte Lebensweise des Menschen anzupassen und von ihr zu profitieren vermochte. Dabei waren die Subspezies *M. m. musculus* und *M. m. domesticus* am erfolgreichsten und konnten sich gegenüber ihren Artverwandten *M. m. castaneus* und *M. m. bactrianus* behaupten. Während sich *M. m. domesticus* entsprechend der menschlichen Kulturgeschichte auf der Arabischen Halbinsel, in Nordafrika, Mittel- und Westeuropa, Amerika, Zentral- und Südafrika sowie Australien durchsetzte, breitete sich *M. m. musculus* über China und Russland bis nach Mitteleuropa aus. Hier trafen die beiden vorherrschenden Subspezies aufeinander, aber durchmischten sich nur auf einem stabilen Grenzstreifen von wenigen Kilometern Breite, der unter anderem durch Deutschland führt [1].

Anfang des 20. Jahrhunderts begannen Wissenschaftler sich für die Maus als Studienobjekt zu interessieren. Dabei lag das Hauptinteresse in der Erzeugung von Inzuchtstämmen. Die Wissenschaftler der damaligen Zeit bezogen die Tiere aus Zuchtfarmen, wie zum Beispiel der von Abbie Lathrop in Massachusetts, die die Mäuse als "Haustiere und Spielgefährten" vertrieb. In den Mausfarmen wurden Wild- und Zuchttiere aus aller Welt gehalten, so dass die Inzuchtstämme genetisch der Subspezies *M. m. domesticus* zuzuordnen sind, aber auch genetische Marker von *M. m. musculus* können nachgewiesen werden. Aufgrund von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen konnte sogar nachgewiesen werden, dass die heute im Labor verwendeten Inzuchtstämme wie zum Beispiel C57BL/6 oder 129/Sv auf einzelne Tiere aus Lathrop's Zucht zurückgehen [2].

Die gegenwärtige biomedizinische Forschung stellt den Menschen, seine Physiologie und Biochemie, sowie die Aufklärung seiner Krankheiten in den Mittelpunkt. Aus ethischen, aber auch aus praktischen Gründen, verwendet die Grundlagenforschung

leicht zugängliche Modellorganismen. So haben verschiedene Organismen, darunter die Bäckerhefe (Saccharomyces cerevisiae), der Fadenwurm (Caenorhabditis elegans), die Fruchtfliege (Drosophila melanogaster), der Zebrabärbling (Danio rerio) und die Maus (Mus musculus), in den Laboralltag Eingang gefunden. Dabei kommt das Modell "Maus" dem Menschen am nächsten. Sowohl Mensch als auch Maus sind Säugetiere (Mammalia) und besitzen viele anatomische und physiologische Gemeinsamkeiten. Die Genome von Mensch und Maus wurden vor wenigen Jahren vollständig sequenziert [9-11]. Trotz einer evolutiven Distanz von geschätzten 90 Millionen Jahren [12, 13] sind sich beide Genome sehr ähnlich. Bis zu 99% aller Mausgene findet man ortholog auch beim Menschen, die mittlere Identität auf Aminosäureebene liegt bei 80% [9]. Zudem bietet die Maus weitere Vorteile, die an einen Modellorganismus im Labor gestellt werden. Sie ist mit einer Länge von 7 bis 11 cm (ausschließlich des 7 bis 10 cm langen Schwanzes) und einem Gewicht zwischen 30 bis 45 g klein genug, um sie raumsparend und kostengünstig im Labor zu halten. Mäuse sind bezüglich ihrer Nahrungsaufnahme anspruchslos und resistent gegen eine Vielzahl von Infektionen. Die kurze Generationszeit - Mäuse werden 4 bis 6 Wochen nach Geburt geschlechtsreif - und eine Tragezeit von neunzehn Tagen bei durchschnittlichen Wurfgrößen von 6 bis 12 Jungtieren erlauben es innerhalb kurzer Zeitintervalle genügend Tiere für Laborexperimente zu züchten. Insbesondere die Wurfgröße und der relativ unproblematische Zugang zu den heranwachsenden Embryonen im Uterus machen die Maus für die Entwicklungsbiologie interessant. Die Verwendung von wenigen Inzuchtstämmen gewährleistet zudem eine Vergleichbarkeit von Forschungsergebnissen



Abbildung 1.1: Phylogenie und Verbreitung des Genus *Mus.* (A) Phylogenetischer Stammbaum der verschiedenen *Mus* Spezies. Dargestellt sind alle heute noch lebenden Subgenera innerhalb des Genus *Mus. Domesticus, musculus, castaneus,* und *bactrianus* sind Subspecies innerhalb der *M. musculus* Gruppe. Alle anderen Linien repräsentieren vollständig abgegrenzte Spezies. Die Zeit evolutiver Divergenz verschiedener Linien in Millionen von Jahren (myr) sind Schätzungen basierend auf Daten verschiedener Quellen [3–7] (Abbildung verändert nach Lee. M. Silver [1]). (B) Geographische Verteilung der vier Subspezies innerhalb der *M. musculus* Gruppe. Die mutmaßliche Verbreitung von *M. m. domesticus* innerhalb der letzten 600 Jahre ist durch Pfeile markiert. Die zwei asiatischen Subspezies, die die Japanischen Inseln eroberten, vermischten sich zu einem früheren Zeitpunkt zur Quasi-Spezies *M. m. molossinus* (Abbildung verändert nach F. Bonhomme *et al.* [4,8]).

unterschiedlicher Labore. Ein letzter, wichtiger Aspekt ist die Etablierung von Methoden zur gezielten genetischen Veränderung des Mausgenoms in den letzten 30 Jahren. Dabei spielt die Manipulation embryonaler Stammzellen (ES Zellen) eine zentrale Rolle. Für die Etablierung pluripotenter Stammzelllinien [14] und für die Entdeckung der homologen Rekombination sowohl in somatischen als auch in ES Zellen [15–17] wurden M. Evans, Sir O. Smithies und M. Capecchi im Jahr 2007 mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt.

1.2 Frühe embryonale Entwicklung der Maus

Die frühe embryonale Entwicklung der Maus lässt sich in folgende zeitlich und morphologisch abgrenzbare Abschnitte unterteilen, (*i*) die Präimplantationsentwicklung, (*ii*) die Implantation des Embryos in den Uterus und (*iii*) die Gastrulation. In den folgenden Passagen werden diese frühen Entwicklungsstufen mit dem Schwerpunkt auf die Bildung des endodermalen Keimblatts beschrieben.

1.2.1 Präimplantation

In den ersten Tagen *post coitum* (p.c.) teilt sich die befruchtete Eizelle (Zygote) im Eileiter zunächst symmetrisch und bildet nach der dritten Teilung acht klar voneinander abgegrenzte Blastomere. In diesem Achtzellstadium sind die Blastomere totipotent, d.h. jede Blastomere besitzt die gleichen Eigenschaften bezüglich ihres Potenzials ein bestimmtes Zellschicksal einzunehmen. Am dritten Tag p.c. setzt sich der Embryo aus 16, schließlich aus 32 Zellen (Morulastadium) zusammen. Einzelne Blastomere lassen sich im Morulastadium nicht mehr klar voneinander trennen, sondern liegen kompakt beieinander. Die Gesamtgröße des Embryos hat sich im Vergleich zur Zygote nicht verändert, und er ist noch immer von der Zona pellucida, einer hauptsächlich aus Glycoproteinen bestehenden Schicht, umgeben. Im Morulastadium findet die erste Differenzierung der Blastomere statt. In den Zellen im Inneren der Morula wird die Expression des Transkriptionsfaktors Octamer-4 (OCT4) induziert [18, 19]. Die Expression von OCT4 spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz. OCT4 wird in vivo ausschließlich im Präimplantationsembryo und später in den Keimbahnzellen exprimiert [20] (Kapitel 1.3.2). Die Expression von OCT4 ist eine notwendige Bedingung für die Entwicklung der Morula zur Blastocyste am Tag 4 p.c. [21]. Die Blastocyste ist eine Hohlkugel. Ihre äußere, einschichtige Zellschicht, das Trophektoderm, umschließt die sogenannte Innere Zellmasse (ICM, engl. inner cell mass) und den flüssigkeitsgefüllten Hohlraum, das Blastocoel. Tam et al. konnten zeigen, dass die Lage der ICM vom Ort der Fusion von Oocyte und Spermium sowie der Position des zweiten Polkörpers abhängt und damit bereits im Präimplantationsembryo eine Festlegung der späteren Körperplanachsen erfolgt. [22]. Während der Präimplantationsentwicklung wandert der etwa 150 μ m große Embryo durch den Ovidukt in Richtung Uterus. Die Zona pellucida verhindert dabei die Implantation des Embryos in den Ovidukt und bietet sowohl mechanischen Schutz als auch Schutz vor einer immunologischen Reaktion der Mutter.

1.2.2 Implantation

Am Tag 4,5 p.c. der embryonalen Entwicklung strömt durch die Aktivität von Na^+/K^+ -Pumpen im Trophektoderm Wasser passiv ins Blastocoel ein, wobei die Blastocyste anschwillt und schließlich aus der Zona pellucida austritt. Der Embryo kann sich nun, im Uterus angekommen, einnisten [23]. Aus dem Trophektoderm bildet sich im weiteren Verlauf der Entwicklung der Trophoblastanteil der Placenta [24]. Die Zellen der ICM haben sich zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung in zwei verschiedene Zelltypen differenziert: (*i*) das primitive Endoderm (PrE), auch als Hypoblast bezeichnet, und (*ii*) das primitive Ektoderm, welches wenig später den pluripotenten Epiblasten und das extraembryonale Ektoderm bildet (Abbildung 1.2 A). Der Hypoblast bildet ein einschichtiges Epithel und trennt das primitive Ektoderm vom Blastocoel. Das PrE differenziert in den folgenden 36 h zu parietalem (PE) und visceralem Endoderm (VE). Sowohl PE als auch VE bilden Epithelien. Während das PE auf der Melasten. Beide De-



Abbildung 1.2: Überblick über die embryonale Entwicklung der Maus vom Implantationsstadium bis zur Neurula. Zum Zeitpunkt der Implantation setzt sich der Embryo (A) aus den folgenden drei Zellpopulationen zusammen: Trophektoderm (grau), primitives Endoderm (beige) und Epiblast (blau). Das primitive Endoderm differenziert in den folgenden 36 h zu parietalem (B) und visceralem (C) Endoderm. Der Epiblast bildet nun ein Epithel, das die präamniotische Höhle auskleidet (C). Der Primitivstreifen (D) beginnt sich am Tag 6,5 p.c. auszuprägen, und Mesoderm (rot) breitet sich, dem Epiblast aufliegend, flügelartig aus und erstreckt sich bis in die extraembryonale Region des Embryos. Innerhalb des extraembryonalen Mesoderms bilden sich sogenannte *Lacunae* (E), die sich später zum visceralen Dottersack vereinigen (Exocoelom). Der Dottersack wird mesometrial (proximal) durch das Chorion und antimesometrial (distal) durch das Amnion begrenzt.

rivate des PrE bilden später Teile extraembryonaler Strukturen, wie zum Beispiel den endodermalen Teil des visceralen und parietalen Dottersacks [25]. Der Epiblast bildet bis Tag 6,0 p.c. zunächst nur ein Epithel, das die präamniotische Höhle auskleidet (Abbildung 1.2 B und C). Mit dem Einsetzen der Gastrulation am Tag 6,5 p.c. entwickelt sich der Epiblast zu einem mehrschichtigen, dreifach gegliederten Embryo.

1.2.3 Gastrulation

Während der Gastrulation wird der für die Klasse der Vertebraten typische Körperbauplan angelegt. Aus dem einschichtigen, etwa 800 Zellen umfassenden Epithel des Epiblasten entwickelt sich nun der mehrschichtige Embryo [28], der sowohl extraembryonales Mesoderm (ExM) als auch alle übrigen Keimblätter des Embryos, Mesoderm, Ektoderm und definitives Endoderm (DE), umfasst. Die Reorganisation und die Bildung der drei Keimblätter während der Gastrulation stellt einen der komplexesten Vorgänge in der Embryogenese dar und setzt eine koordinierte Kombination von morphogenetischen Prozessen sowie Proliferation, Zelldifferenzierung und Musterbildung voraus. Die Gastrulation des Embryos beginnt zwischen Tag 6,0 und 6,5 p.c. mit der Bildung des Primitivstreifens im proximo-posterioren Areal an der Grenze zwischen embryonalem und extraembryonalem Anteil des Embryos (Abbildung 1.2 D). Die Zellen des Epiblasten in



Abbildung 1.2 (Fortsetzung): Der Primitivstreifen verlängert sich bis zur distalen Spitze der Gastrula. Am Tag 7,5 p.c. (F) ist der Knoten anterior des Embryos deutlich ausgebildet. Der Kopffortsatz und schließlich das Notochord (braun) enstehen vom Knoten ausgehend und liegen der Mittellinie des Neuroektoderms auf. Definitives Endoderm (gelb) entsteht ebenfalls anterior des Primitivstreifens nahe des Notochords. Posterior des Primitivstreifens bildet sich die Allantois. Am Tag 8,5 p.c. (G) beginnt sich das Neuroektoderm (violett) in der Neuralleiste zu organisieren. Das Herz entwickelt sich in diesem Stadium sehr schnell und das weiter anterior liegende paraxial liegende Mesoderm bildet nun die in Paaren angeordneten Somiten. Kaudal liefert der Primitivstreifen weiteres Mesoderm, aus dem sich im Verlauf der Entwicklung weitere Rumpfstrukturen bilden (Abbildung verändert nach Nagy *et al.* [26]).

der Nähe des Primitivstreifens verlieren ihre epitheliale Identität und zeigen mesenchymale Charakteristika, einen Vorgang den man auch als epitheliale-mesenchymale Transition bezeichnet. Die Zell-Zell-Adhäsion der epithelialen Zellen des Epiblasten und ihre apikal-basale Polarität gehen verloren. Einzelne proliferierende Zellen lösen sich aus dem Epithel und nehmen eine anterior-posteriore Polarität an. Durch Ingression und Delamination wandern die Zellen durch den Primitivstreifen zwischen Epiblast und VE rostral und lateral und bilden das mesodermale Keimblatt [29]. Im weiteren Verlauf der Gastrulation dehnt sich der Primitivstreifen anterior aus und lässt damit die zukünftige Körperachse von anterior nach posterior erstmals morphologisch erkennen. Der Primitivstreifen endet am distalen Ende des Embryos. Dort hat sich der Primitivknoten gebildet. Der Primitivknoten stellt eine Ansammlung dicht gepackter Zellen dar. Funktionell entspricht der Primitivknoten dem Hensen'schen Knoten des Hühnerembryos [30,31]. Während der Gastrulation interkalieren einige Zellen des Epiblasten in die äußere Schicht des VEs und bilden erste Ansammlungen von Zellen des DEs. Ist man aufgrund früherer Ergebnisse davon ausgegangen, dass das VE in diesen Bereichen durch Expansion der einwandernden Zellen des DEs verdrängt wird, sprechen neuere Ergebnisse eher dafür, dass das VE eine viel größere Plastizität und damit Anteil an der Bildung des embryonalen DEs und der daraus hervorgehenden endodermalen Organe in der späteren Embryogenese besitzt [32]. Voraussetzung für die Differenzierung von Zellen des Epiblasten zu Mesoderm oder Endoderm ist die Ingression der Zellen durch den Primitivstreifen. Diese Beobachtungen legte die Vermutung einer gemeinsamen Population von mesodermalen und endodermalen Vorläuferzellen nahe [33, 34]. Ergebnisse aus Differenzierungsexpe-



Abbildung 1.3: Darstellung der frühen Embryonalentwicklung. Die Keimblätter sind farblich unterschieden: Endoderm — gelb; Mesoderm — rot; Ektoderm — blau. Extraembryonale Gewebe sind durch den schwächeren Farbkontrast gekennzeichnet. Zelltypen, die sich keinem der drei Keimblätter zuordnen lassen, sind grau hinterlegt (Abbildung verändert nach Gardner *et al.* [27]).

rimenten mit murinen und humanen ES Zellen stützen die Vermutung einer gemeinsamen Vorläuferpopulation, die auch als Mesendoderm bezeichnet wird. Das Modell einer mesendodermalen Zellpopulation und die molekulare Evidenz wird in den Abschnitten 1.4.2 und 1.5 vorgestellt. Zellen des Epiblasten, die nicht durch den Primitivstreifen wandern, bilden das ektodermale Keimblatt. Die Abbildung 1.3 fasst die Embryonalentwicklung, die Bildung der unterschiedlichen Keimblätter und die davon abgeleiteten Gewebe schematisch zusammen.

1.3 Embryonale Stammzellen

Anfang der 80er Jahre gelang es Evans und Kaufmann [14] und parallel dazu auch Martin [35] pluripotente Zelllinien aus Präimplantationsembryonen der Maus zu isolieren und *ex vivo* in Kultur zu halten. Der Ursprung dieser ES Zellen waren Zellen des Epiblasten später Blastocysten [36]. Die Propagierung der isolierten ES Zellen in Kultur ist dabei abhängig von der Anwesenheit mitotisch inaktivierter embryonaler Fibroblasten, die einerseits die Proliferation der Stammzellen fördern und andererseits deren Differenzierung in andere Zelltypen hemmen — mit anderen Worten also die Pluripotenz der ES Zellen aufrecht erhalten. Während die meisten *ex vivo* isolierten Zelltypen ihre Proliferation nach wenigen Passagen in Kultur einstellen [37], teilen sich ES Zellen symmetrisch und unbegrenzt, d.h. eine Stammzelle bringt zwei identische, pluripotente Tochterzellen hervor, die keine Anzeichen der Seneszenz zeigen. Diese Eigenschaft der Selbsterneuerung (engl. *self-renewal*) ist neben der Pluripotenz die zweite zentrale Eigenschaft der ES Zellen.

Die beiden Eigenschaften, Pluripotenz und Selbsterneuerung, führen zu einer weiteren Besonderheit der ES Zellen: Sie lassen sich in isolierte Bastocysten einführen. Nach Transfer der chimären Blastocysten in Uteri pseudoschwangerer Weibchen können sich die ES Zellen an der Bildung aller fötalen Gewebe einschließlich der Keimbahn beteiligen [38]. Dabei zeigte sich, das die Präimplantationsembryonen tolerant gegenüber Addition und Entfernung von Zellen sind und zu adulten Mäusen heranwachsen [29]. Einen Überblick über Methoden zur Integration von ES Zellen in frühe Embryonen, wie zum Beispiel die Injektion von ES Zellen in isolierte Blastocysten oder die Aggregation von ES Zellen mit frühen Morulae, gibt A. Nagy in "Manipulating the Mouse Embryo" [26].

Insbesondere die Tatsache, dass sich ES Zellen auch an der Bildung der Keimbahn beteiligen können, eröffnet die Möglichkeit, das ES Zell Genom *in vitro* zu manipulieren, und — wie oben beschrieben — chimäre Mäuse herzustellen. Wenn die gentechnisch veränderten ES Zellen durch die Keimbahn der chimären Tiere wandern (Keimbahntransmission), können Mauslinien mit der genetischen Veränderung in allen somatischen Zellen hergestellt und untersucht werden [39].

1.3.1 Selbsterneuerung und Differenzierung embryonaler Stammzellen

Die erfolgreiche Kultur von ES Zellen war zunächst, wie bereits im vorhergehenden Kapitel erwähnt, abhängig von der Anwesenheit einer Nährschicht (engl. feeder layer) aus embryonalen Fibroblasten. Spätere Forschungsergebnisse zeigten, dass die Wirkung der embryonalen Fibroblasten auf die Stammzellen durch bestimmte konditionierte Medien ersetzt werden kann. [40]. Diese Ergebnisse zeigten, dass mindestens ein löslicher Faktor im Medium für Proliferation, Selbsterneuerung und Aufrechterhaltung der Pluripotenz der Stammzelle verantwortlich ist. Die Forschergruppe um A. Smith identifizierte schließlich das Cytokin LIF (leukemia inhibitory factor) als den Faktor, der die Funktion inaktivierter Fibroblasten oder konditionierter Kulturmedien ersetzen kann [41,42]. Die entsprechende cDNA konnte von Gearing et al. kloniert werden [43]. In den folgenden Jahren konnte ein für die Stammzellkultur weiterer wichtiger Faktor identifiziert werden: BMP4 (bone morphogenic protein 4). Ohne die Supplementierung des Kulturmediums mit LIF und BMP4 differenzieren ES Zellen in vitro spontan in die verschiedensten Zelltypen. Mesodermale und ektodermale Zelltypen lassen sich bereits wenige Tage nach Entfernung der Wachstumsfaktoren nachweisen. In den vergangenen Jahren wurden erhebliche Fortschritte gemacht, ES Zellen gezielt in adulte Zelltypen zu differenzieren, um dabei die molekulare Identität adulter Zellen und deren Vorläuferstadien zu charakterisieren, sowie Mechanismen und Wege ektodermaler, mesodermaler und endodermaler Differenzierung auf molekularer und biochemischer Ebene aufzuklären.

1.3.2 Molekulare Grundlagen der Selbsterneuerung und Pluripotenz

Selbsterneuerung und Pluripotenz embryonaler Stammzellen sind abhängig von LIF und BMP4. Die LIF vermittelte Signaltransduktion ist auf molekularer Ebene in weiten Teilen bekannt [44]. Das Cytokin bindet an seinen in ES Zellen — *in vivo* auf Zellen der ICM — exprimierten Rezeptor, der sich aus den zwei Polypeptidketten, LIFR und gp130, zusammensetzt und induziert deren Heterodimerisierung. Durch die Dimerisierung des Rezeptors wird die Rezeptor-assoziierte Janus Kinase (JAK) aktiviert. JAK phosphoryliert nun mehrere Tyrosinreste des LIF-Rezeptors. Der hyperphosphorylierte Komplex aus LIFR, gp130 und JAK führt zur Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3. Der aktivierte Transkriptionsfaktor kann nun verschiedene Zielgene aktivieren, die für die Aufrechterhaltung der Stammzellidentität von Wichtigkeit sind (Abbildung 1.4). Die Linearität des LIF/STAT3 Signalwegs konnte in STAT3 defizienten ES Zellen nachgewiesen werden. $Stat3^{-/-}$ ES Zellen sind nicht in der Lage, ihren undifferenzierten Zustand zu wahren [45]. Umgekehrt ist die konstitutive Aktivierung von STAT3 in ES Zellen in Abwesenheit von LIF ausreichend, um die ES Zellen pluripotent zu halten [46]. In vivo wird LIF von Zellen des Trophektoderms exprimiert, während sich LIFR und gp130 auf den pluripotenten Zellen der ICM nachweisen lassen [47]. Aber weder $Lif^{-/-}$ noch LIFR defiziente Blastocysten zeigen eine fehlerhafte Entwicklung der ICM [48]. Dieser Unterschied in der Rolle von LIF in der in vivo- und in der in vitro-Situation konnte durch Nichols et al. geklärt werden: Mausoocyten können während der Diapause — dem Zeitraum, in dem Mausweibchen ihren Nachwuchs säugen — erneut befruchtet werden, die Implantation der sich entwickelnden Blastocysten in den Uterus wird jedoch verhindert. Diese Diapause-Blastocysten können im Uterus überleben, sind aber bis zum Ende der Diapause in ihrer Entwicklung arretiert. Nach Beendigung der Diapause können sich die Embryonen in den Uterus einnisten und die Entwicklung der Embryonen verläuft normal weiter. $Lifr^{-/-}$ Blastocysten verlieren jedoch nach künstlich induzierter Diapause diese Fähigkeit. Zellen des Epiblasten verlieren ihre Pluripotenz und degenerieren [49]. In diesem Zusammenhang steht auch die Tatsache, dass sich ES Zellen besonders effizient aus späten, in der Entwicklung arretierten Blastocysten isolieren lassen [36]. Die Notwendigkeit des LIF Signals für die Pluripotenz der ICM Zellen in den arretierten Blastocysten spiegelt sich in der LIF Abhängigkeit der ES Zellen nach Isolation in der Kulturschale wider [37]. Im Gegensatz dazu steht die Tatsache, dass humane ES Zelllinien (1998 erstmals isoliert durch Thomson et al. [50]) kein LIF Signal für den Erhalt ihrer Identität benötigen [51]. Die Beobachtung, dass (i) LIF/STAT3 Signale während der normalen Einnistung der Blastocyste für die Pluripotenz der ICM Zellen und des späteren Epiblasten in vivo eine untergeordnete Rolle spielen und (ii) ES Zellkulturen ohne LIF nicht gänzlich differenzieren [53], ließ die Frage nach weiteren Pluripotenzfaktoren offen. Sowohl Chambers et al. als auch Mitsui et al. beschrieben 2003 den ES Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor NANOG¹, der bei Überexpression ES Zellen auch ohne LIF/STAT3 Signal im undifferenzierten Status hält [55,56]. Chambers et al. konnten zudem zeigen, dass die Etablierung von chimären Mäusen aus ES Zellen, die dieses neue Gen überexprimieren und keinen funktionellen LIF/STAT3 Signaltransduktionsweg besitzen, möglich ist. Mitsui et al. zeigten, dass die Bildung der pluripotenten ICM in Blastocysten ohne NANOG nicht möglich ist. Die Ergebnisse von Chambers und Mitsumi beweisen die Schlüsselfunktion von NANOG für den Erhalt der Pluripotenz in vitro und in vivo. Mit LIF/STAT3, NANOG und OCT4 sind wohl die wichtigsten Schlüsselproteine für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz des Epiblasten während der Präimplantati-

¹Der Name NANOG leitet sich vom Namen des Jungbrunnens *"Tir na n'Og"* im Land der ewigen Jugend aus der keltischen Mythologie ab [54].

onsentwicklung der Maus und in ES Zellen identifiziert. Mit *Esrrb, Tcl1* und *Tbx3* konnten nach genomweiten Expressionsanalysen und RNA Interferenz weitere Pluripotenzgene identifiziert werden [57]. Durch die Einführung genomweiter Sequenziermethoden in den vergangenen zwei Jahren und deren Kombination mit herkömmlichen molekularbiologischen Methoden — wie beispielsweise der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP-Seq) — konnten weitere Fortschschritte gemacht werden, das genregulatorische Netzwerk von Pluripotenz und Selbsterneuerung in murinen, aber auch in humanen ES Zellen, aufzuklären und den Genen einzelne Funktionen zuzuweisen [58–60].



Abbildung 1.4: Signaltransduktionswege, die an der Aufrechterhaltung von Selbsterneuerung und Pluripotenz embryonaler Stammzellen beteiligt sind. Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermitteln Signale in den Zellkern und beeinflussen die Schlüsselfaktoren OCT4, NANOG und STAT3, die Pluripotenz und Selbsterneuerung der ES Zellen aufrechterhalten. Stellenweise sind die Signaltransduktionswege noch nicht vollständig aufgeklärt und durch Fragezeichen markiert. FZD, frizzled; GAB1, GRB2-associated binding protein 1; GSK3, glycogen synthase kinase 3; ID, Inhibitor of differentiation, JAK, janus kinase; MEK, mitogenactivated protein kinase MAPK; ERK, extracellular signal regulated kinase; SMAD, similar to mothers against decapentaplegic homologue; SHP2, SH2-domain-containing protein tyrosine phosphate-2; WNT, wingless type protein. (Abbildung verändert nach Boiani *et al.* [52]).

1.4 Molekulare Identität des extraembryonalen und definitiven Endoderms

1.4.1 Derivate des extraembryonalen Endoderms — primitives, viscerales und parietales Endoderm

Formal lässt sich das PrE (Hypoblast) von Zellen der ICM ableiten. Doch zentrale Fragen über die molekulare Identität des PrE sind trotz kürzlicher Fortschritte noch nicht vollständig beantwortet. Rossant et al. konnten zeigen, dass die ICM aus einer Mischpopulation von Nanog- und Gata6-exprimierenden Zellen besteht [61]. Durch Verfolgung individueller Zellschicksale in der ICM konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich die Tochterzellen entweder an der Bildung des Hypoblasten oder des Epiblasten, nicht jedoch an beidem beteiligen können [62]. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Gata6-positive Zellen den Hypoblasten und Zellen, die den Pluripotenzmarker Nanog (Kapitel 1.3.2) exprimieren, den Epiblasten bilden. Die Expression von Gata6 und die Bildung des PrE ist abhängig von Grb2 (growth factor receptor bound protein 2). Das Rezeptor-assozierte Adapterprotein GRB2 ist eine Komponente des MAP Kinase Kinase Kinase Signalwegs und weist damit auf eine Rolle von Rezeptor-Tyrosin-Kinase Signalen in einem frühen Stadium der Bildung des PrEs hin. Mit PDGFRA (plateletderived growth factor receptor, alpha polypeptide) konnte kürzlich möglicherweise diese Rezeptor-Tyrosin-Kinase im PrE identifiziert werden [63]. Hnf4a (hepatic nuclear factor 4, alpha) und Dab2 (disabled homologue 2) sind direkte Zielgene des Transkriptionsfaktors GATA6 [64, 65]. HNF4A wiederum reguliert die Bildung von sogenannten tight junctions, ist für eine epitheliale Zellpolarität verantwortlich und wirkt als Morphogen bei der Bildung von Mikrovilli [66, 67]. In $Gata6^{-/-}$ und $Hnf4a^{-/-}$ Blastocysten ist die Bildung von VE gestört [64, 68–70], in $Dab2^{-/-}$ Embryonen kommt es zu einer Disorganisation des VEs, und Zellen die PrE und VE Marker exprimieren, können im Epiblasten nachgewiesen werden [71]. Die Expression von Gata6 in ES Zellen führt zur Bildung von Laminin B1, welches eine Rolle bei der Zelladhäsion spielt [72]. Darüber hinaus ist auch der Transkriptionsfaktor Sox17 im ExE exprimiert und bildet zusammen mit den genannten GATA- und verschiedenen HNF-Transkriptionsfaktoren ein komplexes genregulatorisches Netzwerk, dass die Expression vieler endodermaler Zielgene reguliert (Abschnitt 1.4.3).

Die molekulare Identität spiegelt die funktionelle Aufgabe der extraembryonalen Endodermderivate wieder. Die Hauptfunktion des PEs ist die Synthese und Sekretion von Komponenten der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel Laminine, Entactin, Typ IV Procollagen und Heparansulfat-Proteoglykanen. Die Matrixproteine bilden eine dicke Basallamina zwischen PE und Trophektoderm, die auch als Reichert-Membran bezeich-

net wird. Die Reichert-Membran bildet somit eine Barriere zwischen dem maternalen und dem embryonalen Kompartiment [73]. Die Hauptfunktionen des VEs sind (i) die Absorption von Substanzen aus dem maternalen Kreislauf, die über die Reichhert Membran gefiltert in den parietalen Dottersack aufgenommen werden und (ii) die Sekretion von Serumkomponenten und anderen Proteinen wie zum Beispiel Alphafetoprotein (AFP), Transferrin, High- und Low-Density Apolipoproteinen sowie α_1 -Antitrypsin. Damit besitzt das VE eine ähnliche Funktion wie der fötale Darm und die Leber, obwohl beide Organe vom DE abgeleitet werden und somit einen anderen Ursprung besitzen [74]. Die funktionale Kongruenz von DE und VE spiegelt möglicherweise auch die diskutierte Plastizität des VEs wieder. Die spezialisierte Funktion des VEs manifestiert sich in der Zellmorphologie: Apikal bilden die VE Zellen eine Vielzahl auf Absorption spezialisierte Microvilli aus. Weiterhin ist die Membran reich an sogenannten *coated pits* für die Rezeptor-vermittelte Endocytose und im Cytosol lassen sich apikal vermehrt Lysosomen entdecken. Die basale Zellmembran ist möglicherweise an der Sekretion von AFP, Transferrin u.a. Serumkomponenten beteiligt [75]. Darüber hinaus besitzt das VE eine induktive Funktion für die Bildung embryonaler Strukturen. So reguliert das VE die Bildung des Primitivstreifens und legt die anterior-posteriore Polarität des Embryos fest [76]. Das anterior viscerale Endoderm (AVE) ist für die Induktion der Kopfstruktur des Embryos nötig [77]. Dabei spielt LHX1 (LIM homeobox protein 1), das im VE direkt mit OTX2 (orthodenticle homolog 2) und FOXA2 (forkhead box A2) interagiert [78], eine entscheidende Rolle für die korrekte Funktion des VEs [79].

1.4.2 Definitives Endoderm

In den vergangenen Jahren wurden erhebliche Fortschritte gemacht die molekulare Regulation der Entwicklung des DEs aufzuklären (im Übersichtsartikel zusammengefasst von [80]). So konnten zentrale Signalwege identifiziert werden, die an der Bildung des DEs, der Musterbildung des Vorderdarms und an der Morphogenese der aus dem Vorderdarm abgeleiteten endodermalen Organe wie Pankreas, Gallenblase und Leber beteiligt sind. Schlüsselgene, die an der Determination des DEs beteiligt sind, sind unter den Vertebraten stark konserviert. Zu diesen Genen gehören *Nodal* und Komponenten des Nodal-Signalwegs, Transkriptionsfaktoren der sogenannten Mix-ähnlichen Faktoren, aber auch Forkhead-Domain, GATA- und SRY abgeleitete HMG-Box-Domain Transkriptionsfaktoren einschließlich SOX17 [81–86]. Definitiv-endodermale Zellen entstehen in einem Bereich des Primitivstreifen, der dem Primitvknoten oder auch der als "Organizer" bezeichneten Region entspricht. Diese Region exprimiert *Mixl1*, Goosecoid (*Gsc*) und *Foxa2*, aber auch den pan-mesodermalen Marker Brachyury. *Mixl1* wird über den zur Tgf- β Familie gehörenden Faktor NODAL induziert. Direkte Zielgene von MIXL1 sind wiederum *Gsc* und *Sox17* [87]. *Sox17* wird also nicht nur im ExE sondern auch im DE exprimiert, so dass sich die Zellpopulationen beider Endodermderivate nicht ausschließlich anhand des Transkriptionsfaktors SOX17 unterscheiden lassen (Abschnitte 1.4.3 und 1.5).

Arbeiten über Musterbildung des ventralen Vorderdarms zeigen, dass auch lösliche Faktoren, die durch angrenzende Keimblattderivate gebildet werden, an der Entwicklung des Endoderms und seiner abgeleiteten Organe beteiligt sind [88]. So ist beispielsweise FGF4, das im benachbartem kardialen Mesoderm gebildet wird, in der Lage, die Differenzierung von Endoderm des ventral gelegenem Vorderdarms zu induzieren. Dabei ist die Stärke der Induktion von der FGF4 Konzentration abhängig [89,90]. Activin A und FGF2, sezerniert von Zellen des Notochords, führen hingegen durch die Repression des Sonic Hedgehog (Shh) Signalweges im Endoderm zur Induktion pankreatischer Marker [91–93].

1.4.3 Die zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors SOX17 während der Endodermentwicklung

SOX17 gehört zur Familie der Transkriptionsfaktoren mit einer *High Mobility Group* (HMG)-Box. Der Name der Sox Gene leitet sich vom Y-chromosomalen *Sry* (Sexdetermining region Y) Gen ab. *Sry* ist für die Ausbildung des männlichen Geschlechts entscheidend [94]. Zur Zeit sind mehr als 30 Sox Gene bekannt, davon allein über 20 Gene im Menschen und in der Maus. Die Sox Gene lassen sich aufgrund von Sequenzhomologie in zehn Gruppen (A, B1, B2, C–I) einordnen [95,96]. *Sox17* wird zusammen mit *Sox7* und *Sox18* zur Gruppe F gezählt (Abbildung 1.5). *Sox7* wird gemeinsam mit *Sox17* im extraembryonalen Endoderm expremiert. Eine Expression von *Sox7* im definitiven Endoderm kann aber nicht nachgewiesen werden [97]. *Sox18* hingegen spielt bei der Differenzierung des Endothels während der Gefäßentwicklung eine wichtige Rolle [98].

SOX17 wurde zunächst als stadiumspezifischer Transkriptionsfaktor während der Spermatogenese beschrieben. Das murine *Sox17* Gen liegt im Abschnitt A1 des Chromosoms 1 und kodiert für zwei alternativ gespleißte mRNA Varianten. Während die eine Spleißvariante ein 419 Aminosäuren großes Protein mit einer einzelnen HMG-Box in der Nähe des (NH₂)-Terminus kodiert, zeigt die andere mRNA Variante eine partielle Deletion der HMG Domäne. Kanai *et al.* konnten durch die Analyse der verschiedenen *Sox17* Transkripte zeigen, dass die beiden Varianten durch alternatives Spleißen des vierten Exons entstehen [99]. Exon 4 kodiert für die 5' untranslatierte Region und die ersten 102 N-terminalen Aminosäuren. Darüber hinaus konnte durch *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) mit rekombinant hergestellten Proteinen gezeigt werden, dass die verkürzte SOX17 Isoform nicht an DNA Sequenzen bindet, die bisher für SOX17 und andere

Sox Transkriptionsfaktoren beschrieben worden sind. Luciferase-basierte Reporterassays zeigten, dass SOX17 die Transkription des Luciferasereporters transaktivieren konnte, während die verkürzte SOX17 Variante nur geringen Einfluss auf die Reportergenexpression zeigte. Expressionsanalysen identifizierten *Sox17* als einen frühen Marker des embryonalen Endoderms. Dabei wird *Sox17* sowohl in extraembryonalen Endodermderivaten (viscerales und parietales Endoderm) als auch im definitiven Endoderm exprimiert. In *Sox17* defizienten Embryonen ist die Entwicklung des embryonalen Darms erheblich gestört. Zellen des DEs im vorderen Darm sterben durch Apoptose. Zellen des mittleren und hinteren Darms sind nicht in der Lage zu expandieren. Die Rotation der Körperachse zwischen Tag 8,5 und 9,5 p.c. findet in *Sox17^{-/-}* Embryonen nicht statt und die Embryonen sterben vor Erreichen des Embryonalstadiums E 11,5. Transplantierte *Sox17^{-/-}*



Abbildung 1.5: Konservierung ausgewählter Proteine der Sox-Familie von Maus und Mensch. Die Proteine wurden aufgrund der Sequenz ihrer HMG-Box den Gruppen A, B1, B2 und C–I zugeordnet. (Gruppen B2, H und I fehlen). Verschiedene strukturelle Elemente, Motive und funktionelle Regionen, auch vorhergesagte, sind eingezeichnet. Transkripte mit bewiesener Intron-loser Struktur sind markiert (Abbildung verändert nach Bowles *et al.* [95]).

Zellen schaffen es nicht, Gewebe des DEs in den chimären Mäusen zu besiedeln, können aber zu mesodermalen oder zu ektodermalen Zellen differenzieren [84]. Die Entwicklung von VE und PE ist in $Sox17^{-/-}$ Mäusen nicht beeinträchtigt. Shimoda *et al.* konnten jedoch zeigen, dass *in vitro* die Differenzierung von $Sox17^{-/-}$ ES Zellen in ExE gestört ist [100]. Die Expression des Transkriptionsfaktors Sox7, der im ExE zusammen mit Sox17 exprimiert wird, ist *in vitro* in den $Sox17^{-/-}$ Zellen supprimiert. *In vivo* wird die Expression von Sox7 im ExE hingegen aufrechterhalten. *Sox7* ist möglicherweise also *in vivo* in der Lage, das Fehlen von Sox17 im ExE zu kompensieren. Kürzlich konnten Niakan *et al.* zeigen, dass Sox17 (*i*) in einem komplexen Netzwerk involviert ist, (*ii*) einen direkten Einfluss auf die Expression extraembryonaler Gene besitzt und (*iii*) die Expression von Selbsterneuerungs- und Pluripotenzgenen inhibiert, indem es mit *Nanog* um DNA Bindestellen in den Promotoren der Gene konkurriert [101].

Eine weitere Rolle spielt *Sox17* bei der Entwicklung des ventralen Pankreas, der Leber und des biliären Systems (Gallenblase und -gang) vom ventralen Vorderdarm in der späteren embryonalen Entwicklung. Pankreas und biliäres System entwickeln sich aus einer gemeinsamen *Sox17-* und *Pdx1-*koexprimierenden Zellpopulation. Diese Vorläuferzellen trennen sich dann in eine *Pdx1-*positive Anlage des ventralen Pankreas und in ein *Sox17-*positives biliäres Primordium. Deletion von *Sox17* an E8,5 führt zum Verlust biliärer Strukturen und zu vermehrt pankreatischem Gewebe in der Leberanlage. *Sox17* Überexpression supprimiert die Pankreasentwicklung und führt zu einer ektopischen Bildung von Gallenblasen-ähnlichem Gewebe in der *Pdx1-*positiven Region [102].

Kim *et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass *Sox17* für die Überlebensfähigkeit fötaler und neonataler hämatopoetischer Stammzellen benötigt wird. Die *Sox17* Expression in adulten hämatopoetischen Stammzellen wird vier Wochen nach der Geburt eingestellt. Damit zeigen fötale und adulte hämatopoetische Stammzellen einen grundlegenden Unterschied in der *Sox17*-abhängigen transkriptionellen Regulation [103].

1.5 Embryonale Stammzellen als Modell zur Rekapitulation der Endodermentwicklung

Embryonale Stammzellen lassen sich *in vitro* zu einer Vielzahl unterschiedlicher adulter Zelltypen differenzieren. Eine zielgerichtete Umwandlung in terminal differenzierte Zellen lässt sich dabei über die Kulturbedingungen und die Verwendung unterschiedlicher Wachstumsfaktoren, Cytokine oder Signalstoffe beeinflussen. Differenzierte Zellpopulationen sind meist heterogen und die Differenzierung in einen spezifischen Zelltyp ist nie vollständig. Die Anreicherung bestimmter Zellpopulationen kann aber durch die Einführung zelltypspezifisch exprimierter Selektionsmarker oder durch die Fluoreszenzmarkie-

rung und anschließender Isolation durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) erreicht werden. Grundsätzlich lassen sich vier verschiedene Differenzierungsstrategien voneinander unterscheiden, die in der Abbildung 1.6) schematisch dargestellt sind. Die Differenzierung in sogenannten *Monolayer*-Zellkultursystemen und die Bildung von Zellaggregaten, sogenannte Embryoidkörper (engl. *Embryoid bodies*), sind aufgrund ihrer Praktikabilität die am häufigsten verwendeten Methoden. Monolayer-Zellkulturen konnten erfolgreich zur Differenzierung neuroektodermaler Zellen etabliert werden [105]. Zellen, die der mesodermalen und endodermalen Linie angehören, werden effizienter durch Aggregation von ES Zellen in *Embryoid Bodies* (EBs) differenziert. Die Differenzierung von ES Zellen in Abwesenheit von LIF beruht dabei auf einem 1977 publizierten Protokoll für die Differenzierung embryonaler Karzinomzellen [106]. Seither konnte in



Abbildung 1.6: Differenzierungsstrategien von ES Zellen. Dargestellt sind die vier wichtigsten Methoden zur Herstellung unterschiedlicher Zellpopulationen aus embryonalen Stammzellen (Abbildung verändert nach Hyslop *et al.* [104]).
einer Vielzahl von Experimenten gezeigt werden, dass sich innerhalb der EBs Zellen aller drei Keimblätter bilden. Es wird postuliert, dass die EB Differenzierung der ES Zellen *in vitro* auf molekularer Ebene über ähnliche Zwischenschritte verläuft wie *in vivo* während der frühen Embryogenese. Damit stellt die EB Differenzierung ein einfaches *in vitro* Modell sowohl für die Präimplantationsentwicklung als auch für die frühe Gastrulation dar (im Übersichtsartikel zusammengefasst von G. Weitzner [107]). Die Forschung mit ES Zellen kann somit für das Verständnis von Entwicklungsvorgängen auf molekularer Ebene einen wichtigen Beitrag leisten. Ein genaues Verständnis der molekularen Mechanismen von Pluripotenz und Differenzierung wiederum spielt für den therapeutischen Einsatz embryonaler und adulter Stammzellen eine entscheidende Rolle. Darüberhinaus kann die Stammzellforschung auch grundlegende Hinweise auf Genfunktionen während der Embryonalentwicklung liefern.

Die Differenzierung von ES Zellen in terminal differenzierte, funktionelle Zellen der Leber oder des Pankreas ist von großem therapeutischen Interesse. Sowohl Hepatocyten als auch Insulin-produzierende pankreatische β -Zellen leiten sich von Zellen des definitiven Endoderms ab. Da die EB Differenzierung ein vereinfachtes Modell für die frühe Embryonalentwicklung ist, lässt sich die Bildung des Endoderms in diesem Zellkultursystem *in vitro* untersuchen. Dabei entsteht im EB nicht nur das DE, das sich *in vivo* von Zellen des Epiblasten ableitet, sondern auch ExE, das bereits vor dem Einsetzen der Gastrulation direkt aus Zellen des Hypoblasten hervorgeht. Molekulare Untersuchungen konnten zeigen, dass sich das DE aus ES Zellen, wie in der Embryogenese in vivo, über eine mesendodermale Vorläuferpopulation entwickelt. Kubo et al. konnten durch die Markierung des pan-mesodermalen Markers Brachyury (T) mit einem grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) zeigen, dass sich definitiv-endodermale Sox17-positive Zellen von einer Subpopulation GFP-positiver Zellen des EBs ableiten lassen [108]. Vergleichbare Ergebnisse publizierten Tada und Yasunaga et al., die zur Charakterisierung der mesendodermalen Vorläuferpopulation den "Organizer"-spezifischen Marker des Primitivknotens Goosecoid (Gsc) verwendeten [109, 110]. Yasunaga et al. zeigten, dass Zellen des DEs sowohl Gsc als auch Sox17 exprimieren, während Zellen des VEs $Sox17^+Gsc^-$ sind. Gleichzeitig konnte der Chemokinrezeptor Cxcr4 als Marker des DEs identifiziert werden. D'Amour et al. bestätigten diese Ergebnisse mit humanen ES Zellen [111]. Wie in den Abschnitten 1.4.1–1.4.3 beschrieben, exprimieren alle Endodermderivate den Transkriptionsfaktor Sox17. Somit eignet er sich, um die Gesamtpopulation endodermaler Zellen zu identifizieren und zu analysieren.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, im ES Zellsystem endodermale Differenzierung zu untersuchen. Dazu wurden in einem ersten Schritt Reportergenkassetten kloniert und mit diesen ES Zellen verändert, so dass sich die Differenzierung der ES Zellen in endodermale Zelltypen *in vitro* verfolgen ließ. Zur Visualisierung endodermaler Differenzierung wurde das rot-fluoreszierende Reportergen DsRedExpress verwendet. Die Endodermassozierte Expression des Reportergens sollte durch den endogenen Promotor des *Sox17* Gens reguliert werden. Der *Sox17*::DsRedExpress Reporter — in der weiteren Arbeit verkürzt mit *Sox17*::DsRed bezeichnet — sollte mittels RedET-Rekombination und homologer Rekombination in den endogenen *Sox17* Locus einer ES Zelllinie integriert werden.

Protokolle zur Differenzierung der gentechnisch veränderten ES Zellen in Zellpopulationen des endodermalen Keimblattes sollten im Rahmen dieser Promotion etabliert werden. Die Expression des DsRedExpress Reportergens sollte mit der Expression des endogenen Sox17 Transkripts im ES Zellsystem verglichen werden. Die gewebespezifische Expression des DsRedExpress Reportergens in vivo sollte dann am Maus-Modell verifiziert werden. In einem weiteren Schritt sollten mit Hilfe der transgenen Sox17::DsRed ES Zelllinie verschiedene Zellpopulationen mittels Durchflusscytometrie isoliert werden nicht-differenzierte ES Zellen, Sox17::DsRed-negative (Sox17::DsRed⁻) und endodermal differenzierte Sox17::DsRed-positive (Sox17::DsRed⁺) Zellen. Das Transkriptom der verschiedenen Zellpopulationen konnte nun durch Mikroarray-basierte Expressionsanalysen aufgeklärt werden. Ein Vergleich der Transkriptome von undifferenzierten ES Zellen mit den differenzierten Zellpopulationen sollte Aufschluß über die endodermale Identität Sox17-exprimierender Zellen geben. Das Transkriptom endodermaler Zellen sollte dann mit der in vivo Situation während der frühen embryonalen Entwicklung der Maus verglichen werden. Gene, die mit Sox17 bzw. dem Reportergen in vitro koexprimiert werden und noch nicht im Zusammenhang mit der Bildung des endodermalen Keimblattes und der daraus abgeleiteten Gewebe beschrieben worden sind, sollten identifiziert und näher analysiert werden. Identifizierte Gene sollten schließlich in vivo durch in situ Hybridisierung am sich entwickelnden Embryo untersucht werden. Der Einfluss des Transkriptionsfaktors SOX17 auf die Expression der Kandidatengene sollte mit Hilfe von Luciferase-Expressionsassays *in vitro* untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 30%, Genaxxon	Kaliumchlorid (KCl), Merck
Agar, Difco	Kaliumhydrogencarbonat (KHCO3), Merck
Agarose, Invitrogen	Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄), Merck
Ammoniumpersulfat $((NH_4)_2S_2O_2)$, Sigma	Kaliumhydroxid (KOH), Merck
Ammoniumsulfat $((NH_4)_2SO_4)$, Sigma	Kanamycin, Fermentas
Ampicillin, Fermentas	Kresolrot, Sigma
BCIP, Roche	L-Arabinose, Sigma
Betaine-Monohydrat, Fluka	Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ * 6H ₂ O), Merck
β -Mercaptoethanol, Merck	Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO $_4 * 7H_2O$), Merck
Biocoll-Lösung ($\delta = 1,077 \text{g/ml}$), Biochrom	Maleinsäure $C_4H_4O_4$, Merck
Block-Reagenz, Roche	Mangan(II)-chlorid Dihydrat (MnCl ₂ * 2H ₂ O), Merck
Bromphenolblau, Sigma	Methanol, Merck
Calciumchlorid (CaCl ₂), Merck	Milchpulver, Gedimex
Chloramphenicol, Sigma	Mitomycin C, Roche
Chloroform (CHCl ₃), Merck	MOPS, Sigma
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol), Roche	Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$), Merck
Diethylenpyrocarbonat (DEPC), Sigma	Natriumchlorid (NaCl), Roth
di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄), Merck	Natriumcitrat ($Na_3C_6H_5O_7$), Merck
di-Natriumhydrogenphosphat (Na2HPO4), Merc	kNatriumdodecylsulfat (SDS), Merck
Dithiothreitol (DTT), Sigma	Natriumhydroxid, Roth
dNTP-Mix (je 100 mM), Bioline	Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT), Roche
DMSO, Sigma	N,N,N',N'-Tetramethyethylendiamin (TEMED), Sigma
EDTA, Roth	Paraformaldehyd, Merck
Essigsäure, Merck	Phenol, Roth
Ethanol, Merck	Ponceau S, Sigma
Ethidiumbromid (EtBr), Roth	Propidiumiodid, BD Biosciences
Fluoromount G, Southernbiotech	Proteinase K, Roche
Formamid, Applied Biosystems	Puromycin, Gibco BRL
Glucose, Roth	Rinderserumalbumin (BSA), Sigma
Glycerol, Merck	Rubidiumchlorid (RbCl), Sigma
Glycin, Merck	Salzsäure (HCl) 37%, Merck
Hefeextrakt, Difco	Tetracyclin, Sigma
Hefe RNA, Roche	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base), Merck

Heparin, Roche HEPES 1M, Gibco BRL Isoamylalkohol, Merck Kaliumacetat $(C_2H_3KO_2)$, Merck Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-HCl), Merck Triton X-100, Sigma Trypton, Fluka Tween 20, Sigma

2.1.2 Enzyme

Für die Standard-PCR wurde eine *Taq*-Polymerase verwendet, die durch die Serviceabteilung des Instituts nach einem Protokoll von Engelke *et al.* [112] isoliert wurde.

Zur Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren wurde die Antarctic Phosphatase (NEB) verwendet. Für DNA-Ligationen wurde T4 DNA Ligase (NEB) mit dem entsprechenden 10 x Puffer (500 mM Tris-HCl, 100 mM , 10 mM ATP, 100 mM DTT) nach Herstellerangaben verwendet.

Die cDNA-Synthese wurde mit der SuperScript II Reversen Transkriptase (Invitrogen) in dem mitgelieferten 5 x Puffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) durchgeführt.

Lyophilisierte Proteinase K (Roche) wurde in Nuklease-freiem H₂O gelöst (1–20 μ g/ml) und entsprechend der Protokolle eingesetzt. Die folgende Restriktionsendonukleasen wurden von NEB bezogen und — wenn nicht anders vermerkt — nach Herstellerangaben verwendet: *Bam* HI, *Dpn* I, *Eco*R I, *Kpn* I, *Hind* III, *Pvu* I, *Sac* I, *Spe* I und *Xho* I.

Für die in vitro Transkription wurde der T7 MaxiScript Kit (Ambion) verwendet.

DNaseI (RNase-frei) und 10x DNaseI-Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl (pH 7,5 bei $25 \degree$ C), 25 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2) wurden von Fermentas bezogen und nach Herstellerprotokoll verwendet.

2.1.3 Antikörper

Für die *in situ* Hybridisierungen wurde ein anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragment (150 $U/200 \,\mu$ l) von Roche in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet.

2.1.4 DNA- und Proteingrößenstandards

Als Größenstandards für die Gelelektrophorese wurden die DNA Marker GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas), Lambda DNA/*Hind* III (Fermentas) und Lambda DNA/*Pst* I (Fermentas) sowie der RiboRuler High Range RNA Marker für RNA (Fermentas) verwendet. Für die SDS-Page wurde der PageRuler Prestained Protein Marker (Fermentas) eingesetzt.

2.1.5 Reaktions-Kits

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems Dual-Glo Luciferase Assay Kit, Promega ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham One-Cycle Target Labeling Kit & Control Reagent Package, Affymetrix Plasmid Midi Kit, Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen Quick and Easy BAC Modification by RedET-Recombination, Gene Bridges Random Primed DNA Labeling Kit, Roche RNA 6000 Nano Chip Kit, Agilent RNAeasy Micro Spin Purification Kit, Qiagen SYBRGreen PCR Master Mix, Applied Biosystems T7 MaxiScript *in vitro* Transcription Kit, Ambion

2.1.6 Oligonukleotide für Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Oligonukleotide für die RedET-Rekombination wurden von der Firma BioSpring synthetisiert und elektrophoretisch aufgereinigt, alle anderen PCR-Primer wurden von Metabion bezogen und durch Fällung gereinigt. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind im Anhang A.4 aufgelistet.

2.1.7 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

2.1.7.1 Standard-Puffer und -Lösungen

ad 11 ddH_2O

100x TE-Puffe	r, pH 8,0	TLS-Puffer	
1 M	Tris-Base	200 mM	NaCl
100 mM	EDTA	5 mM	EDTA
Mit 1 M LICI and a LIS 0 air atallar	100 mM	Tris-Base	
Mit 1 M HCl auf pH 8,0 einstellen.		0,2% (w/v)	SDS
		$200 \mu g/ml$	Proteinase K
50x TAE-Puffe	r		
242 g	Tris-Base		
57,1 ml	Eisessig	NaCI/EtOH Fä	llungs-Lösung
100 ml	0.5M EDTA pH8.0	10 ml	100% EtOH (eiskalt)

 $150 \,\mu\text{l}$ 5 M NaCl

TBE-Puffer

54 g	Tris-Base
27,5 g	Borsäure
20 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1,01	ddH ₂ O

DNA-Lysispuffer

1,0 ml 1 M TrisHCl pH 7,5 (10 mM) 2,0 ml 0,5 M EDTA (10 mM) 0,2 ml 5 M NaCl (10 mM) 5,0 ml 10% SDS (0,5%) ad 100 ml ddH₂O

 $100 \,\mu$ l Proteinase K (50 mg/ml Stock) pro 5 ml Lysispuffer.

CES

2,7 M Betaine 6,7 mM DTT 6,7 %(v/v) DMSO 55,0 µg/ml BSA

10 x PCR-Puffer

350 mM	Tris-Base
150 mM	Tris-HCl
1%	Tween 20
500 mM	KCl
15 mM	MgCl ₂
0,15 mM	Kresolrot

TB-Puffer

 $\begin{array}{ccc} 250 \text{ mM} & \text{KCl} \\ 15 \text{ mM} & \text{CaCl}_2 \\ 10 \text{ mM} & \text{PIPES} \\ \text{ad } 800 \text{ ml} & \text{ddH}_2 \text{O} \end{array}$

Mit 1 M KOH auf pH 6,7 einstellen. 55 mM MnCl₂ 100 ml ddH₂O

Beide Lösungen werden gemischt, auf ein Volumen von 1 Liter aufgefüllt und sterilfiltriert.

Sonstige Lösungen und Stocks

- 1% BSA Fraktion V in PBS (PBA)
- 5 M NaCl in ddH₂O, autoklaviert
- 75 mM KCl in ddH₂O, autoklaviert
 - 1 M LiCl in ddH₂O, autoklaviert und sterilfiltriert
 - 5 M Natriumacetat in nucleasefreiem Wasser

2.1.7.2 Puffer zur alkalischen Lyse

AL1		AL2	
50 mM	Glucose	200 mM	Natriumhydroxid
25 mM	Tris-Base	1% (w/v)	SDS
10 mM	EDTA		
100 mg/l	RNase A	AL3	
Mit 1 M HCl auf pH 8,0 einstellen.		3 M	Kaliumacetat
		28,5 ml	Eisessig pro Liter Puffer

2.1.7.3 Southern-Blot Lösungen

20x SSC

175,3 g	NaCl
88,2 g	Natriumcitrat
ad 11	ddH ₂ O

Neutralisierungs-Puffer

87,7 g NaCl ad 11 ddH₂O

pH-Wert auf pH7,0 einstellen.

Church-Puffer

250 mM Na₂HPO₄ 1 mM EDTA 5,0% (w/v) SDS

> 250 ml 1 M HCl ad 11 ddH₂O

78,8 g Tris-HCl

pH-Wert auf pH7,0 einstellen.

Waschpuffer-I

100 ml	20x SSC
10 ml	10% SDS
ad 11	ddH ₂ O

Waschpuffer-II

5 ml	20x SSC
10 ml	10% SDS
ad 11	ddH ₂ O

Depurinierungs-Puffer

Denaturierungs-Puffer

50,0 ml 10 M NaOH 87,7 g NaCl ad 11 ddH₂O

2.1.7.4 Puffer und Lösungen für in situ Hybridisierungen

DEPC-H ₂ O	Lsg.1	
$200 \mu l$ DEPC	500 ml	Formamid
11 H ₂ O	250 ml	20x DEPC-SSC pH 5,0
Inkubation des DEPC-Wassers mindes-	50 ml	20% SDS RNase-frei
tens 2 h bei 37 °C oder RT über Nacht. An-	ad 11	DEPC-H ₂ O
schließend autoklavieren.		

Hybridisierungspuffer

250 ml	Formamid
125 ml	20x DEPC-SSC pH 5,5
25 ml	20% SDS RNase-frei
$500 \mu l$	Hefe-RNA
$500 \mu l$	Heparin
ad 500 ml	DEPC-H ₂ O

20x DEPC-SSC, pH 5,0

175,3 g NaCl 88,2 g Natriumcitrat ad 11 DEPC-H₂O

pH-Wert mit Zironensäure auf pH5,0 einstellen. Anschließend mit DEPC behandeln (siehe DEPC-H₂O).

Lsg.3T

500 ml	Formamid
100 ml	20x DEPC-SSC pH 5,0
1 ml	Tween-20
ad 11	DEPC-H ₂ O

Blocklösung

10,0 g	Block-Reagenz
ad 100 ml	MAB-Puffer

Blocklösung-FCS

6,0 ml	MABT-Puffer
2,0 ml	Blocklösung
2,0 ml	FCS

10x TBST

81,8 g	NaCl
2,0 g	KCl
30,3 g	Tris-Base
900 ml	H ₂ O

Mit HCl pH-Wert auf pH7,5 einstellen (ca. 36,5 ml) und mit H₂O auf 11 auffüllen, autoklavieren und 10 ml Tween-20 hinzufügen.

20% SDS RNase-frei

200 g SDS ad 11 DEPC-H₂O

SDS durch erwärmen lösen und anschließend steril filtrieren. Nicht autoklavieren!

MAB

100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl

MABT

100 mM	Maleinsäure
150 mM	NaCl
0,1%	Tween

PBS

8,0 g	NaCl
0,2g	KC1
1,44 g	KH ₂ PO ₄
ad 11	H_2O

Der pH-Wert sollte 7,4 betragen, gegebenenfalls mit NaOH oder HCl auf pH7,4 einstellen. Kann auch als 10x Stock angesetzt werden, in diesem Fall sollte der pH-Wert bei 6,8 liegen.

DEPC-PBST

200 µl DEPC 11 PBS

Inkubation von DEPC mindestens 2 h bei 37 °C oder RT über Nacht. Nach dem Autoklavieren 1 ml Tween-20 hinzufügen.

4% PFA-PBST

4,0 g	Paraformaldehyd
100 ml	PBST

PFA bei 60 $^\circ \mathrm{C}$ lösen und steril filtrieren

NTMT

50 ml	1 M Tris-HCl pH 9,5
10 ml	5 M NaCl
10 ml	2,5 M MgCl ₂
500μ l	Tween-20
ad 500 ml	DEPC-H ₂ O

Sonstige Stocks und Lösungen für in situ Hybridisierungen

10 µg/µl	Proteinase K in DEPC-H ₂ O	

 $\begin{array}{lll} 200\,\mu g/\mu l & \mbox{Glycin in DEPC-H}_2 O \\ 25\% & \mbox{Glutaraldehyd} \\ 50\,\mu g/\mu l & \mbox{Hefe-RNA in DEPC-H}_2 O \\ 50\,\mu g/\mu l & \mbox{Heparin in DEPC-H}_2 O \\ 50\,\mu g/\mu l & \mbox{BCIP, 5'-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat Toluidiniumsalz in DMF} \\ 75\,\mu g/\mu l & \mbox{NBT, Nitroblau-Tetrazoliumsalz in DMF} \\ 80\% & \mbox{Glycerol in PBST} \end{array}$

2.1.7.5 Bakteriologische Medien und Zusätze

LB-Medium

- 10,0 g/1 Trypton 5,0 g/1 Hefeextrakt
- 10,0 g/l Natriumchlorid

SOB-Medium

20,0 g/l Trypton
5,0 g/l Hefeextrakt
10 mM Natriumchlorid
2,5 mM Kaliumchlorid
10 mM Magnesiumchlorid
10 mM Magnesiumsulfat

Antibiotika Stocks

50 mg/ml	Ampicillin in 50% Ethanol
30 mg/ml	Chloramphenicol in 50% Ethanol
30 mg/ml	Kanamycin in ddH ₂ O
10 mg/ml	Tetracyclin in 75% Ethanol

2.1.7.6 Zellkulturmedien

cDMEM

Kryomedium

Waschmedium

10% DMSO in FCS

5% FCS in DMEM oder GMEM

- 25 mM Glucose
- 2 mM Glutamin
- 1 mM Natriumpyruvat, Gibco

10% FCS in DMEM, Gibco

- 50 μ M β -Mercaptoethanol, Gibco
 - 1% 100x Pen/Strep, Gibco

SOC-Medium

- 20,0 g/l Trypton
- 5,0 g/l Hefeextrakt
- 0,5 g/l Natriumchlorid
- 2,5 mM Kaliumchlorid
- 10 mM Magnesiumchlorid

LB-Agar

- 10,0 g/l Trypton
- 5,0 g/l Hefeextrakt
- 10,0 g/l Natriumchlorid
- 15,0 g/l Agar

CGMEM	cl	MDM	
15%	FCS in GMEM, Gibco	20%	FCS in IMDM, Gibco
25 mM	Glucose	25 mM	Glucose
2 mM	Glutamin	2 mM	Glutamin
1 mM	Natriumpyruvat	1 mM	Natriumpyruvat
50 <i>u</i> M	β -Mercaptoethanol	$100 \mu M$	β -Mercaptoethanol
1%	100x Nicht-essentielle AA, Gibco	1%	100x Nicht-essentielle AA
1%	100x Pen/Strep		
1000 U/ml	LIF, Chemicon		

Sonstige Zellkulturlösungen

Opti-MEM, Gibco FCS getestet für ES Zellkultur, Biochrom Dulbecco's PBS, Gibco Trypsin/EDTA, Gibco 50 mg/ml biolog. aktives Geneticin in ddH₂O, Gibco Accutase in PBS, 0,5 mM EDTA, PAA

2.1.8 Verbrauchsmaterial

Kunststoff-Verbrauchsmaterial für die allgemeine Laborarbeit, Bakterienkultur und Zellkultur wurden von den Firmen Biozym, Corning, Eppendorf, Greiner, TPP und VWR bezogen. Es folgt eine Auflistung weiterer Verbrauchsmaterialien.

GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array, Affymetrix	Zellsiebe, 200 μ m, BD Biosciences
Deckgläser eckig (24x55 mm), Roth	Objektträger, Menzel-Gläser
Deckgläser rund (15 mm), Roth	Objektträger Superfrost, Menzel-Gläser
Elektroporationsküvetten Gene Pulser (1 mm, 4 mm), Biorad	Röntgenfilm, Amersham
Immobilon-P PVDF Membran (0,45 μ m), Millipore	Thermowell 96er-Platte, Corning Inc.
Microspin G-50 Säulen, Amersham	Whatman Papier, Amersham
Nylon Hybond-N+ Membran, Amersham	MACS Pre-Separations Filter, Miltenyi

2.1.9 Mausstämme

Fibroblasten zur Kultivierung embryonaler Stammzellen wurden aus Tag 13,0 p.c. alten Embryonen des genetisch veränderten Mausstammes DR4 gewonnen [113]. Der Mausstamm DR4 besitzt Resistenzen gegen die Antibiotika Geneticin (G418), Puromycin und Hygromycin. Zusätzlich vermittelt die Deletion des X-chromosomalen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (*Hprt*) Gens Resistenz gegen 6-Thioguanin (6TG).

Blastocysten für die Injektion genetisch veränderter embryonaler Stammzellen wurden aus Mäusen des Stammes C57BL/6 isoliert. Injizierte Blastocysten wurden in pseudoschwangere NMRI Weibchen eingesetzt. Resultierende chimäre Tiere wurden schließlich mit C57BL/6 zurückgekreuzt.

Für *whole-mount in situ* Hybridisierungsexperimente wurden neben dem C57BL/6*Sox*17^{tm1(dsRed)Tbnl} Mausstamm auch der Inzuchtstamm NMRI und Kreuzungen beider Stämme verwendet.

2.1.10 Vektoren

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren beschrieben. Eigenschaften der Vektoren werden genannt, sofern sie für diese Arbeit relevant sind.

pUC19	Standard Vektor in der Molekularbiologie. Der Amp ^{<i>R</i>} Vektor leitet sich von pBR322 ab und besitzt einen hoch-replikativen pMB1 Replikationsursprung (oriC). pUC19 (Invitrogen) wurde als Transformations- und Transfektionskontrolle verwendet.
pIRES2 eGFP	pIRES2 eGFP (Clontech) besitzt einen CMV IE Promotor zur Expression von klonierten Genen. Der eGFP Reporter wird von einem bicistronischen Transkript, vermittelt von der <i>Internal Ribosomal Entry Site</i> (IRES) des Poliovirus, translatiert. Der Vektor wurde in dieser Arbeit zur Klonierung von Reportergenkassetten verwendet. Er besitzt eine Kan ^{R} .
peCFP-N1	Clontech Vektor — wurde als Matrize für die Amplifizierung mit- tels PCR des eCFP ORFs verwendet.
pIRES DsRedExp.1	Clontech Vektor — Quelle für die PCR-Amplifizierung des DsRedExpress ORFs.
pIRES Puro3	pIRES Puro3 (Clontech) diente als Quelle für das Gen der Puro- mycinresistenz.
pACYC177	pACYC177 (NEB) ist aufgrund seiner geringen Größe, des niedrig-replikativen p15A Replikationsursprungs und seiner An- tibiotikaresistenzen (Amp ^{<i>R</i>} und Kan ^{<i>R</i>}) zur Amplifizierung eines linearen Minimalvektors für die Subklonierung durch RedET- Rekombination verwendet worden.

pGL3	pGL3 (Promega) ist ein promotorloser Vektor, der Firefly-
	Luciferase exprimiert, wenn zu untersuchende Promotoren
	einkloniert werden. Für Gateway-Klonierungen von PCR-
	amplifizierten Promotorsequenzen wurden in den Vektor attP Si-
	ganalsequenzen 5' des Luciferase ORFs einkloniert [M. Lange un-
	veröffentlicht]. Der Vektor besitzt für die Selektion in <i>E. coli</i> eine Amp^{R} .
pRL-TK Renilla	pRL-TK Renilla (Promega) exprimiert Renilla-Luciferase unter
-	der Kontrolle des Thymidin-Kinase (TK) Promotors und wurde
	als Transfektionskontrolle bei Luciferase-Expressionsassays ver-
	wendet.
pDonor201	Gateway-Vektor (Invitrogen) zur Klonierung des SOX17 ORFs.
-	Der Vektor enthält attP Sequenzen und ein Amp ^R -Gen.
pDest474 und 701	Die Vektoren pDest474 und 701 (Invitrogen) wurden zur Expres-
-	sion von SOX17 in eukaryotischen Zellen verwendet. Die Vek-
	toren besitzen eine Amp ^{<i>R</i>} und Kan ^{<i>R</i>} Resistenz und attR Signal-
	sequenzen zur Gateway-Klonierung. Die Vektoren enthalten attR
	Sequenzen und einen N- bzw. C-terminalen myc-Tag. Die Expres-
	sion eines klonierten Gens wird in eukaryotischen Zellen vom
	CMV IE Promotor reguliert.

2.1.11 Eukaryotische Zelllinien

CGR8	Wildtyp ES Zelllinie (Karyotyp 40,XY) hergestellt aus Tag 3,5 p.c. alten, männlichen Präimplantationsembryonen der Mauslinie 129/J [114].
F1	ES Zelllinie (Karyotyp 40,XY) gewonnen aus Tag 3,5 p.c. alten Präimplantationsembryonen einer F1 Kreuzung von C57BL/6 und 129/Sv [Hiiragi <i>et al.</i> , unveröffentlicht].
DR4 MEF	Embryonale Fibroblasten der Maus gewonnen aus Tag 13,5 p.c. alten Embryonen des multiresistenten DR4 Mausstamms (Ab- schnitt 2.1.9) [113].
HEK293	Adenovirus transformierte humane Zelllinie aus embryonalem Nierengewebe [115].

COS-1SV 40 transformierte Fibroblasten aus der Niere der GrünenMeerkatze Cercopithecus aethiops [116].

2.1.12 BAC Klone und Bakterienstämme

Die BAC Vektoren stammen aus einer Klon-Bank des *Roswell Park Cancer Institute* [117]. Für die Konstruktion der Bank wurde die genomische DNA einer weiblichen C57BL/6 Maus aus Niere und Gehirn isoliert. DNA-Fragmente wurde über *Eco* RI Schnittstellen in den pBAC3.6 Vektor [118] kloniert. *E. coli* DH10B Stichkulturen der BACs wurden über das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) bezogen. Im Folgenden sind die BACs mit den Genomkoordinaten des DNA Fragments und kodierten Genen aufgelistet:

BAC Klone

RP23-37D15	Position: Chromosom 1, 4439353–4606640bp		
	Gen: Sox17		
RP23-285G23	Position: Chromosom 1, 4362187–4538578bp		
	Gen: Sox17		
cDNA Klone [119]			
H3118B09	NIA Mouse 15k Clone Set [120]		
	Gen: Pkdcc		
H4048G04	NIA Mouse 7k Clone Set [121]		
	Gen: 2610528J11Rik		
Bakterienstämme			
DH10B	E. coli Stamm für die Klonierungen der Reportergenkonstrukte.		
	$\left(\begin{array}{c} \text{F-mcrA } \Delta(mrr\text{-hsdRMS-mcrBC}) \ \phi 80 lacZ\Delta M15 \ \Delta lacX74 \ recA1 \ endA1 \\ araD139 \ \Delta(ara \ leu) \ 7697 \ galU \ galK \ \lambda^{-} rpsL \ nupG \end{array}\right)$		
OmniMax T1 ^R	Phagen resistenter <i>E. coli</i> Stamm für die Gateway-Klonierungen $\begin{pmatrix} F'{proAB^+ lacI^q lacZ \Delta M15 Tn10(Tet^R) \Delta(ccdAB)} mcrA \Delta(mrr-hsd RMS-mcrBC) \phi 80(lacZ)\Delta M15\Delta(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD \end{pmatrix}$		

2.1.13 Geräte

In der folgenden Auflistung sind sämtliche Geräte aufgeführt, die für die Durchführung der Laborarbeiten verwendet wurden.

2100 Bioanalyser Plattform, Agilent 7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems Elektrophoresekammer Mini-Protean II, Biorad Elektrophoresekammer (klein), Eigenbau, MPI Werkstätten Elektrophoresekammer (groß), Pharmacia Elektroporator, Gene Pulser Xcell, Biorad Elektroporator für Bakterien, Biorad Entwicklermaschine Curix60, Agfa Inkubator Innowa CO-170, New Brunswick Scientific Kühlzentrifuge, Centrifuge 5810-R, Eppendorf Laserscanningmikroskop LSM510 Meta, Zeiss Lichtmikroskop, Olympus CK2, Olympus Luminometer, Moonlight 3010, Pharmingen Peltier Thermal Cycler PTC-225, MJ Research Phosphor-Imager Storm 820, Molecular Dynamics Schüttelinkubator Innova 44, New Brunswick Scientific Semidry-Elektroblotter PerfectBlue, PeqLab Sterilwerkbank, Herasafe, Heraeus Tischzentrifuge, Centrifuge 5415-D, Eppendorf TissueLyser, Qiagen Ultracentrifuge Avanti J20, Beckman Coulter UV Crosslinker Stratalinker, Stratagene UV Geldokumentation AlphaImager, Alpho Innotech UV/Vis Spektrophotometer Nanodrop ND, Nanodrop UV/Vis Spektrophotometer Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech Vakuumkonzentrator SpeedVac, Thermo Savant Waage AT250, Mettler

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung, Aufreinigung und Analyse von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* beruht auf einem Protokoll, das in den 70er Jahren etabliert worden ist [122]. Die Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Miniprep) wurde nach diesem Protokoll durchgeführt. Für die Aufreinigung im präparativen Maßstab wurde der Plasmid Midi Kit von Qiagen verwendet, um eine größere Ausbeute von DNA hoher Qualität für die weiteren Experimente zu erhalten.

Miniprep: Für die Präparation von BACs sowie hoch- und niedrig-replikativen Plasmiden im analytischen Maßstab $(0,5-2 \mu g)$ wurden 2 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur des Vektor tragenden E. coli Stammes in einer Tischzentrifuge (11.000 rpm, 1 min, RT) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierten Zellen in 200 μ l Puffer AL1 resuspendiert. Durch Zugabe von $200 \,\mu$ l des alkalischen Puffers AL2 wurden die Zellen lysiert. Mit der Neutralisierung des Lysates durch 200 µl AL3 Puffer fielen sowohl Protein als auch das mit Zellwandbestandteilen assoziierte bakterielle Genom aus der Lösung aus, während die Plasmid-DNA in Lösung blieb. Darüber hinaus bildete das im AL2 Puffer enthaltene SDS mit den Kaliumionen des Neutralisierungspuffers AL3 ein unlösliches Präzipitat. Nach Zentrifugation (14.000 rpm, 6 min, RT) wurde die gelöste Plasmid-DNA im Überstand (etwa 600 μ l) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde die DNA gefällt und anschließend abzentrifugiert (14.000 rpm, 5 min, RT). Das DNA-Pellet wurde schließlich mit 500 µl EtOH, 70%, gewaschen, erneut zentrifugiert (14.000 rpm, 5 min, RT) und nach Abzug des Ethanols getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 50 μ l TE gelöst und durch PCR oder Restriktionsverdau analysiert (Abschnitte 2.2.2 und 2.2.5.1).

Midiprep: Zur Isolierung von 20–100 μ g Plasmid-DNA wurde der Qiagen Plasmid Midi Kit verwendet. Das Prinzip des Kits beruht auf dem im vorhergehenden Abschnitt beschriebenem Prinzip der alkalischen Lyse. Plasmid-DNA wird nach Lyse unter geeigneten Niedrigsalz- und pH-Bedingungen an ein anionisches Austauschmaterial gebunden. RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen können so ausgewaschen werden. Die DNA wird anschließend mit einem Hochsalzpuffer eluiert und schließlich durch Isopropanolfällung entsalzt und konzentriert. Für Details des Protokolls wird auf das ausführliche Handbuch des Herstellers (http://www.qiagen.com/literature/) verwiesen. Änderungen des Protokolls wurden an den Schritten 8 und 13–14 vorgenommen: (*i*) An Stelle einer erneuten Zentrifugation (15 min, 20.000 g, 4 °C) des DNA-haltigen Überstandes nach Lyse wurde der Überstand nach nur einmaliger Zentrifugation durch eine engmaschige Gaze gefiltert und auf die anionische Austauschersäule gegeben. Die Filtration entfernte den nach Lyse verbleibenden Debris besser als die im Protokoll beschriebene erneute Zentrifugation des Lysates. (*ii*) Für die Isopropanolfällung und das anschließende Waschen des DNA-Pellets mit 70% EtOH wurden konische 15 ml Falcon Röhrchen verwendet, da sich dadurch die Gefahr des Verlustes des DNA-Pellets verringerte. Es wurde zunächst 60 min, dann 30 min jeweils mit 5000 g bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände dekantiert.

Das getrocknete DNA-Pellet wurde anschließend in $50 \,\mu$ l TE resuspendiert. Qualität und Ausbeute der DNA-Präparation wurden quantitativ mit dem Photometer und qualitativ durch Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

2.2.1.2 Isolierung von genomischer DNA

DNA aus Mausschwanzbiopsien und extraembryonalen Geweben: Schwanzspitzen (0,3–0,5 cm) wurden in 500 μ l TLS aufgenommen und mindestens 4 h oder über Nacht bei 55 °C inkubiert. Extraembryonales Gewebe wurde in 200 μ l TLS aufgenommen und 4 h bei 55 °C inkubiert. Haar-, Knorpel- und sonstige nicht verdaute Gewebereste wurden anschließend abzentrifugiert (14.000 rpm, 5 min, RT) und der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß dekantiert. Die genomische DNA wurde aus der Lösung durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde nach Zentrifugation (8.000 rpm, 5 min, RT) mit 500 μ l Ethanol, 70%ig, gewaschen und nach erneuter Zentrifugation getrocknet. Abhängig von der zu erwarteten Ausbeute wurde das DNA-Pellet in 50–500 μ l TE aufgenommen und bei 65 °C für 5 min gelöst. Die DNA konnte direkt für die PCR oder den Southern-Blot verwendet werden.

DNA aus embryonalen Stammzellen im 96er-Format: Zunächst wurden die adhärent wachsenden embryonalen Stammzellen zweimal mit 100 μ l PBS pro Schälchen gewaschen und in 50 μ l Lysispuffer aufgenommen. Nachdem die Zellen über Nacht bei 55 °C lysiert worden waren, konnte die DNA durch Aussalzen gefällt werden. Dazu wurde eine Lösung aus 100 μ l eiskaltem EtOH (96–98%) und 1,5 μ l NaCl 5M zu dem Zelllysat gegeben und 60 min bei RT inkubiert. Die ausgefallene DNA bleibt am Kunststoff der Zellkulturschale haften und konnte daher durch einfaches Dekantieren abgetrennt und dreimal mit je 200 μ l 70% EtOH gewaschen werden. Nach dem letzten Dekantieren wurde die DNA getrocknet, in 25 μ l TE gelöst und bei -20 °C gelagert oder direkt durch Restriktionsendonukleasen (Abschnitt 2.2.5.1) geschnitten.

2.2.1.3 Isolierung von RNA

TRIzol-Extraktion: Zur Extraktion zellulärer Gesamt-RNA aus ES Zellen und aus Gewebe wurde TRIzol verwendet. Die Methode entspricht dabei im wesentlichen dem Protokoll, das von P. Chomczynski und N. Sacchi entwickelt wurde [123]. TRIzol, ein monophasisches Gemisch, dessen Hauptbestandteile Phenol und Guanidinisothiocyanat sind, erhält die RNA Integrität, während andere Zellbestandteile denaturiert und ausgefällt werden. Nach Zugabe von Chloroform lässt sich das Gemisch in eine organische und eine wässrige Phase trennen, in welcher die RNA gelöst vorliegt. Die RNA kann schließlich aus der wässrigen Phase mit Isopropanol gefällt werden. 1 x10⁵ bis 1 x10⁷ durch Zentrifugation (5 min, 1000 rpm, RT) pelletierte ES Zellen wurden zunächst in 1 ml TRIzol aufgenommen und durch mehrfach wiederholtes Pipettieren homogenisiert. Anschließend wurde 5 min bei RT inkubiert, um ein vollständiges Dissoziieren der Nukleoproteinkomplexe zu gewährleisten. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform, kräftigem Schütteln, erneuter Inkubation (3 min, RT) und Zentrifugation (15 min, 12.000 g, 4 °C) ließ sich die RNA in der wässrigen Phase von der organischen Phase abtrennen. Durch die Zugabe von $500 \,\mu$ l Isopropanol und Inkubation (10 min bei RT) wurde die RNA gefällt. Nach Zentrifugation (10 min, 12.000 g, 4 °C) wurde das RNA-Pellet mit 1 ml 70% EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 7.500 g, 4 °C). Nach 5–10 min Trocknen wurde das RNA Pellet in 30– 50 µl RNase-freiem Wasser bei 55 °C 10 min gelöst. Qualität und Konzentration wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.1.7) und UV-Spektrometrie bestimmt.

Qiagen RNAeasy und RNAeasy MinElute Cleanup Kits: Für die Aufbereitung von RNA Proben, vor allem für Affymetrix-Array Hybridisierungen, aber auch vor der cDNA Synthese, wurden die Kits RNAeasy und RNAeasy MinElute Cleanup verwendet. Die Wahl des Kits war dabei abhängig von der eingesetzten RNA-Menge (RNAeasy Kit für mehr als 10 μ g eingesetzter RNA bzw. RNAeasy MinElute Cleanup Kit für weniger als 10 μ g eingesetzter RNA). Bei der Isolierung und Aufreinigung von RNA wurden die entsprechenden Protokolle (http://www.qiagen.com/literature/) eingehalten.

2.2.1.4 Phenol-Chloroform Extraktion

Die Reinigung von DNA-Präparationen von unerwünschten Kontaminationen erfolgte durch Phenol-Chloroform Extraktion. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Die zu reinigende Nukleinsäure wurde mit dem gleichen Volumen eines TE (pH 8,0) gesättigten Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Gemisches (25:24:1) ausgeschüttelt und anschließend in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (5 min, 14.000 rpm, RT). Die Kontaminationen wurden auf diese Weise denaturiert und sammelten sich in der organischen Phase und in der Interphase an. Die wässrige, nukleinsäurehaltige Phase wurde nun in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und restliches Phenol durch zweimaliges Ausschütteln mit Chloroform entfernt. Die wässrige Nukleinsäurephase ließ sich dabei jeweils durch Zentrifugation (5 min, 14.000 rpm, RT) von der organischen Chloroform-Phase trennen. Abschließend wurde die Nukleinsäure durch Isopropanol- oder Ethanolfällung von restlichen Rückständen des organischen Lösungsmittels befreit und in einem geeigneten Volumen 1x TE Puffer gelöst.

2.2.1.5 Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden zur weiteren Aufreinigung oder Konzentration durch Zusatz eines monovalenten Salzes (Tabelle 2.1) und Alkohols — Ethanol oder Isopropanol — aus der Lösung gefällt, abzentrifugiert und nach einem anschließendem Waschschritt mit 70% Ethanol in 1x TE Puffer aufgenommen.

Isopropanolfällung: Zunächst wurde ein in ddH₂O gelöstes, monovalentes Salz (Tabelle 2.1) zur Nukleinsäure gegeben. Die Nukleinsäure wurde nun durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Bei größeren zu fällenden Mengen DNA reichte eine Inkubation von 5 min bei RT aus, um die DNA vollständig aus der Lösung zu fällen. RNAund DNA-Proben mit Konzentrationen von weniger als $25 \text{ ng}/\mu$ l wurden vor Zentrifugation 0,5–24 h bei -20 °C inkubiert, um den Verlust der Nukleinsäure möglichst gering zu halten. Nach Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde das DNA- oder RNA-Pellet mit 500 μ l 70% EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min, 4 °C). Anschließend wurde das Ethanol vollständig abgezogen und das Pellet bei RT getrocknet. Abschließend wurde die DNA bzw. RNA in einem geeigneten Volumen 1x TE Puffer gelöst.

Ethanolfällung: Die Ethanolfällung wurde analog zur Isopropanolfällung durchgeführt. Im Unterschied zur Isopropanolfällung musste jedoch ein 2,5faches Volumen EtOH verwendet werden, um die Nukleinsäure aus der Lösung zu fällen. Dies ist ein entscheidender Nachteil zur Isopropanolfällung, da durch das größere EtOH Volumen häufig das Fassungsvermögen verwendeter Reaktionsgefäße überschritten wurde. Ein Vorteil bei Verwendung von EtOH lag jedoch darin, dass sich EtOH aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit leichter als Isopropanol wieder entfernen ließ.

Salz	c[End]	Bemerkung
Natriumacetat, 3 M, pH 4,8–5,2 Natriumchlorid, 5 M	0,3 M 0,2 M	SDS bleibt in 70% Ethanol löslich und kann mit dem Über-
Ammoniumacetat, 5 M	2–2.5 M	stand entfernt werden Nukleotide und DNA-Fragmente < 30 bp werden
		nicht kopräzipitiert. Ammoniumionen hemmen die T4- Polynukleotidkinase.

Tabelle 2.1: Vor- und Nachteile monovalenter Salze, die gewöhnlich zur Fällung von Nukleinsäuren Verwendung fanden. c[End], Endkonzentration.

2.2.1.6 Aufreinigung von PCR-Produkten und Extraktion von DNA aus Agarose

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und die Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe der QIAquick PCR Purification und Gel Extraction Kits durchgeführt. Dabei wurde nach den Protokollen des Herstellers verfahren (http:// www.qiagen.com/literature/).

2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Proben von Nukleinsäuren wurden routinemäßig mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Agarose-Konzentration betrug in Abhängigkeit vom aufzutrennenden Größenbereich i. d. R. 1% (w/v) für Fragmente oberhalb von 1000 bp, 1,5% für Fragmente zwischen 600 bp und 1000 bp, 2% für Fragmente zwischen etwa 400 bp und 600 bp sowie 3% für Fragmente zwischen 150 bp und 400 bp. Die Elektrophoresen wurden spannungslimitiert in TAE Puffer durchgeführt. Die Nukleinsäurefragmente wurden sichtbar gemacht durch UV-Fluoreszenzanregung des in den Gelen in einem Anteil von 10^{-5} % (w/v) enthaltenen Ethidiumbromids.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion entwickelt durch K. Mullis und Kollegen gehört mittlerweile zum Standardrepertoire der Molekularbiologie [124]. Sie dient zur selektiven Amplifizierung eines beliebigen Abschnittes auf einem DNA Molekül. Dabei ergänzt eine temperaturstabile Polymerase (z. B. Taq aus *Thermophilus aquaticus*) die durch Denaturierung des DNA-Moleküls aufgespaltenen DNA-Einzelstränge entsprechend ihrer Nukleotidsequenz semi-konservativ zu zwei neuen, identischen DNA Doppelsträngen. Die Initiation der Polynukleotidsynthese durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt die freien 3'-OH-Gruppen zweier Oligonukleotide (Primer), die komplementär an die beiden Einzelstränge der denaturierten DNA hybridisieren (Annealing). Durch zyklische Wiederholung dieser DNA-Synthese kommt es zur Verdopplung des durch die Oligonukleotide spezifizierten DNA Abschnitts nach jedem Zyklus und damit zu einer exponentiellen Amplifizierung des DNA Moleküls. Der Standard PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

$x \mu l$	1–200 ng DNA
$5 \mu l$	10x PCR Puffer
$10 \mu l$	5x CES (optional, bei schwierigen, GC reichen DNA-Abschnitten)
$0,4~\mu l$	dNTPs (100 mM)
$0,5\mu l$	Taq-Polymerase
$1-3 \mu l$	5'-Primer (10 pmol/ μ l)
$1-3 \mu l$	3'-Primer (10 pmol/ μ l)
ad 50 µl	ddH ₂ O

Das verwendete Temperaturprofil im Thermozykler lautete wie folgt: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min; 35 Zyklen Amplifizierung mit Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Primer-Annealing bei 55–68 °C für 30 s und Elongation bei 72 °C für 1 min pro 1 kb; finale Elongation bei 72 °C für 10 min und abschließendes Abkühlen der Probe auf 4 °C. Die genaue Temperatur für optimales Primer-Annealing ist abhängig von Länge und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide und ist im Anhang A.4 für die jeweiligen Primerpaare angegeben. Die korrekte Größe der PCR-Produkte wurde durch elektrophoretische Auftrennung im 0,8–2,0%igen TAE-Agarosegel verifiziert.

2.2.3 Sequenzierung

Die Nukleinsäuresequenz von Plasmid- und PCR-amplifizierter DNA wurde durch *Cycle Sequencing* [125] aufgeklärt. Das Sequenzieren durch *Cycle Sequencing* ähnelt einer PCR und basiert auf der von Sanger entwickelten Kettenabbruchmethode durch markierte Didesoxynukleotide [126]. Die Sequenzierreaktion wurde mit Hilfe des BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits durchgeführt. Der Ansatz pro Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

- x µl 100–150 ng Plasmid-DNA oder 500 ng PCR-Produkt
- $2 \mu l$ Primer 10 pmol/ μl
- $2 \mu l$ BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix
- ad 10 μ l ddH₂O

Die Kettenabbruchreaktion im Thermozykler wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung 60 s bei 96 °C; anschließend 25 Zyklen (PCR-Produkte) bzw. 35 Zyklen (Plasmide < 10 kb) Denaturierung bei 96 °C für 10–20 s, Primer-Annealing bei 55 °C für 5–10 s und Extension bei 60 °C für 4 min. Das fertige Sequenzierprodukt wurde über eine Ethanolfällung aufgereinigt, in Formamid gelöst und auf einem Kapillarsequenzierer ABI 3730 in der Servicegruppe Dr. R. Reinhardt, MPI für Molekulare Genetik, analysiert.

2.2.4 Synthese von cDNA — Nachweis und Quantifizierung von RNA-Transkripten

2.2.4.1 DNase I-Verdau

RNA-Präparationen enthalten für gewöhnlich Spuren von genomischer DNA. Diese Kontamination kann eine fehlerhafte Analyse der Genexpression zur Folge haben. Aus diesem Grund wurde ein DNase Verdau wie folgt durchgeführt: Zu 43 μ l isolierter RNA wurden 5 μ l DNase Puffer und 2 μ l DNase I (1 Unit/ μ l) hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l EDTA (25 mM) und Inkubation bei 65 °C für 10 min beendet. Abschließend wurde die RNA abhängig von der eingesetzten RNA-Menge über Qiagen RNAeasy- oder RNAeasy MinElute-Säulchen aufgereinigt. Isolierte RNA wurde mit SuperScript II Reverse Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben.

2.2.4.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription wird durch RNA-abhängige DNA-Polymerasen vermittelt, den sog. reversen Transkriptasen, meist isoliert aus dem Moloney Murine Leukemia Virus oder dem Avian Myeloblastosis Virus (AMV). In dieser Arbeit wurde die SuperScript II Reverse Transkriptase (gentechn. veränderte M-MuLV) verwendet. Die Reaktion (im $0,2 \mu$ l PCR Reaktionsgefäß, RNase-frei) setzte sich wie folgt zusammen :

- x μ l 0,5–1,0 μ g DNase I verdaute und aufgereinigte Gesamt-RNA
- 0,5 μ l randomisierte Hexamere (500 μ g/ml)
- 0,5 μ l Oligo(dT)₁₈ Primer (500 μ g/ml)
- 1,0 μ l dNTPs (10 μ M pro Nukleotidtriphosphat)
- ad 12 μ l Nuklease-freies ddH₂O

Nach Inkubation bei 65 °C für 5 min im Thermozykler wurde die Reaktion direkt auf Eis herunterkühlt. Zum Ansatz hinzugefügt wurden:

- 4,0 μl 5x RT-Reaktionspuffer
- 2,0 µl DTT 0,1 M
- 1,0 μ l Nuklease-freies ddH₂O

Nach Inkubation bei 25 °C für 2 min im Thermozykler wurde 1,0 μ l (200 U) SuperScript II Reverse Transkriptase dazugegeben; nach Inkubationen bei 25 °C (10 min) und 42 °C (50 min) wurde der Reaktionsansatz bei 70 °C (15 min) inaktiviert.

2.2.4.3 Semi-quantitative PCR

Bei der semi-quantitativen PCR handelt es sich prinzipiell um eine Standard PCR (siehe Abschnitt 2.2.2). Im Unterschied zur Standard PCR, die eine Amplifizierung des nach-

zuweisenden DNA-Abschnittes bis in den Bereich der Sättigung erlaubt, wird bei der semi-quantitativen PCR die Zahl der Amplifikationszyklen herabgesetzt, so dass die Reaktion vor Erreichen der Sättigungsschwelle endet. Entsprechend der Intensität der PCR-Banden im gefärbtem Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung lässt sich bei dieser Form der PCR eine semi-quantitative Aussage über die Kopienzahl der in unterschiedlichen Proben vorhandenen DNA-Matrizen treffen. Die Anzahl der Amplifikationszyklen wurde für jedes Gen experimentell ermittelt. Entsprechend dem Standard PCR-Protokoll setzte sich die semi-quantitative PCR wie folgt zusammen:

```
      1,0 \ \mul
      cDNA aus reverser Transkription, 1:5 verdünnt (\simeq 100-200 \ ng \ RNA-Aquivalent)

      5,0 \ \mul
      10x \ PCR \ Puffer

      10,0 \ \mul
      5x \ CES

      0,4 \ \mul
      dNTPs (100 mM)

      0,5 \ \mul
      Taq-Polymerase

      1,0 \ \mul
      5'-Primer (10 pmol/\mul)

      1,0 \ \mul
      3'-Primer (10 pmol/\mul)

      31,1 \ \mul
      ddH<sub>2</sub>O
```

Die semi-quantitative PCR wurde mit Standard-PCR Bedingungen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.2). Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide zum spezifischen Nachweis eines Transkripts, ihre Annealing-Temperaturen sowie die Größe der PCR-Produkte sind im Anhang A.4 aufgeführt.

2.2.4.4 Quantitative PCR (qPCR)

Mit der quantitativen PCR lassen sich relative (bei Erstellung einer Eichgeraden auch absolute) Expressionsunterschiede von Transkripten in unterschiedlichen Proben nachweisen. Für die Synthese der Primer galten folgende Bedingungen: GC-Gehalt 40–60%, Annealing-Temperatur T_m = 64–65 °C und PolyN ¹ <3. Die Amplicons sollten eine Länge von 70–120 bp besitzen. Weiterhin sollten die Amplicons nach Möglichkeit im Bereich des 3'-Endes der mRNA Transkripte liegen und eine Exon-Exon Grenze überspannen. Die Amplifizierungseffizienz der Primersysteme sollte vergleichbar sein. Die Bildung unspezifischer PCR-Produkte und Primerdimere wurde durch Erstellen von Dissoziationskurven ausgeschlossen. Die Sequenzen verwendeter Primer sind im Anhang A.4 aufgeführt. Für die relative Quantifizierung von mRNA Transkripten wurde ein SYBR Green PCR Master Mix verwendet. Der qPCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- $6,0 \mu l \quad ddH_2O$
- 3,0 µl 5'- und 3'-Primer Gemisch (2,5 mM je Primer)
- 1,0 μ l cDNA aus reverser Transkription, 1:5 verdünnt (\simeq 100–200 ng RNA-Aquivalent)
- $10 \,\mu l$ SYBR Green PCR Master Mix (2x)

¹PolyN steht für das Vorkommen einer Abfolge gleicher Nukleotide (Homopolymere).

Die qPCR-Bedingungen im ABI7900HT Gerät lauteten wie folgt: Initiale Denaturierung und Aktivierung der Polymerase bei 50 °C für 2 min und 95 °C für 10 min; anschließend 40 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 15 s, Primer-Annealing und Elongation bei 60 °C für 1 min. Die Aufnahme der Dissoziationskurven erfolgte unter folgenden Bedingungen: 95 °C für 15 s, 60 °C für 15 s und 95 °C für 15 s. Datenaufnahme und Auswertung wurde mit Hilfe der Software SDS 2.2.1 durchgeführt. Zur Auswertung der relativen Expression wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode nach Pfaffl verwendet [127], wobei die Änderung der Expression durch

Expressionsänderung = $2^{-(\Delta C_t Bedingung1 - \Delta C_t Bedingung2)}$

definiert ist.

2.2.5 Manipulation und Klonierung von DNA-Molekülen

2.2.5.1 Restriktionsverdau

DNA lässt sich sequenzspezifisch durch Restriktionsendonukleasen schneiden. Die resultierenden DNA-Fragmente lassen sich durch Ligation in anderer Kombination wieder verknüpfen. In der Regel wurden pro μ g zu verdauender DNA etwa 1–5 U Restriktionsendonuklease verwendet. Abhängig vom verwendeten Enzym enthält die Reaktion unterschiedliche Puffer und ggf. BSA. Plasmide und PCR-Produkte wurden 2 h bei 37 °C inkubiert, wenn das verwendete Restriktionsenzym keine anderen Bedingungen verlangte. Die Reaktion wurde anschließend 20 min bei 65-80 °C hitzeinaktiviert. Genomische DNA wurde entsprechend vorgeschriebenen Reaktionsbedingungen 16 h über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion hitzeinaktiviert. Für die genauen Reaktionsbedingungen der verwendeten Restriktionsendonukleasen wird auf den Katalog des Herstellers New England Biolabs verwiesen.

2.2.5.2 Dephosphorylierung

Durch die Abspaltung der 5'-Phosphate linearisierter Plasmide nach Restriktionsverdau lässt sich die spätere intramolekulare Ligation (Religation) des DNA Moleküls verhindern. In der Regel wurde die Dephosphorylierung durch die Antarctic Phosphatase mit der Restriktion der Plasmid DNA kombiniert, da das Enzym eine hohe Toleranz gegenüber den Reaktionsbedingungen besitzt und in allen verwendeten Puffersystemen eine ausreichend hohe Effizienz zeigt. Zur Dephosphorylierung von 1–2 μ g Plasmid-DNA wurde in der Regel 1 μ l Antarctic Phosphatase (5 U/ μ l) direkt zum Restriktionsverdau hinzugegeben und der Ansatz eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Phosphatase und auch das Restriktionsenzym 20 min bei 80 °C hitzeinaktiviert. Abschließend wurde die DNA über ein Agarosegel oder direkt über ein QIAquick-Säulchen aufgereinigt.

2.2.5.3 Ligation

Die Ligation einer freien 3'-Hydroxylgruppe mit einem endständigen 5'-Phosphatrest von Nukleinsäuren durch eine Ligase erlaubt es, zwei verschiedene DNA-Fragmente kovalent zu verbinden. Für die Ligation von PCR-Produkten und anderer DNA-Fragmente in die verschiedenen Vektoren (siehe Abschnitt 2.1.10) wurde die Ligase des Phagen T4 (NEB) verwendet. Der typische Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- $x \mu l$ 100 ng linearisierter, dephosphorylierter Vektor
- y μ l DNA-Fragment im molaren Verhältnis 5:1 zur Vektor DNA
- 1 µl 10x T4 Ligase Puffer
- 1 μ l T4 Ligase (40 U/ μ l)
- ad $10 \,\mu l$ ddH₂O

Entsprechend dieses Reaktionsansatzes wurde zur Kontrolle der Religation des Vektors eine weitere Ligation durchgeführt, in der das zu klonierende DNA Fragment durch ddH₂O ersetzt wurde. Die Ligation wurde 1–2 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend in kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

2.2.5.4 Transformation

Transformation elektrisch-kompetenter Zellen: Typischerweise wurde ein Fünftel des Volumens der Ligationsreaktion in 50 μ l auf Eis aufgetaute, elektrisch-kompetente *E.coli* Zellen durch Elektroporation transformiert. Um einen elektrischen Kurzschluss während der Elektroporation zu vermeiden, wurde die Reaktion vorher auf einem Mikrodialyse-filter 15 min entsalzt. 2 μ l der dialysierten Ligation wurden zu den Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine Elektroporationsküvette mit einer Spaltweite von 0,1 cm überführt. Die DNA wurde mit einem elektrischen Impuls von 2,0 kV bei einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 μ F in die Zellen elektroporiert. Sofort nach dem elektrischen Impuls wurden die Bakterien in 1 ml 37 °C warmem SOC-Medium aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 h bei 37 °C unter Schütteln (180–200 rpm) inkubiert, damit sich die Antibiotikaresistenz des transformierten Vektors entwickeln konnte. Die transformierten *E. coli* Zellen wurden auf LB-Agar Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C im Inkubator über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden einzelne Bakterienkolonien von der LB-Agar Platte isoliert und analysiert.

Transformation chemisch-kompetenter Zellen: Ein Fünftel der Ligationsreaktion (2 μ l) wurde zu 50 μ l auf Eis aufgetauter, chemisch-kompetenter Zellen pipettiert, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock (42 °C für 45 s) wurden die Zellen weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Aufnahme der transformierten Bakterien in 1 ml 37 °C warmem SOC-Medium wurde wie im Absatz "Transformation elektrisch-kompetenter Zellen" weiter verfahren.

2.2.5.5 Herstellung kompetenter E. coli Zellen

Elektrisch-kompetente *E. coli* Zellen zeigten mit 10^9-10^{10} Transformanten pro $1 \mu g$ super-spiralisierter pUC19 Plasmid-DNA eine höhere Transformationsrate als chemisch-kompetente Zellen (10^7-10^8 Transformanten pro $1 \mu g$ super-spiralisierter pUC19 Plasmid-DNA). Allerdings sind die Kosten für die Transformation elektrisch-kompetenter Zellen etwas höher und abhängig vom Vorhandensein einer Apparatur zur Elektroporation. Im Folgenden werden Protokolle zur Herstellung elektrisch- und chemisch-kompetenter Zellen beschrieben. Die kompetenten Zellen konnten bei -80 °C bis zu 6 Monate gelagert werden.

Herstellung elektrisch-kompetenter *E. coli* **Zellen:** Im ersten Schritt wurden 11 LB-Medium mit 10 ml einer frischen Vorkultur, die über Nacht in LB-Medium gewachsen war, inokuliert. Die Bakterien wurden dann bei 37 °C unter starkem Schütteln (200 rpm) bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600}=0,5$ herangezogen. Besonders hohe Kompetenz wurde erreicht, wenn die Zellen in ihrer logarithmischen Wachstumsphase geerntet wurden. Die Kultur wurde im Zentrifugenbecher 30 min auf Eis inkubiert und anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 g, 15 min bei 4 °C) im vorgekühlten Rotor geerntet. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 11 kaltem HEPES Puffer (1 mM, pH7,0) vorsichtig resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (4000 g, 15 min bei 4 °C) wurde das resultierende Pellet in 500 ml HEPES Puffer resuspendiert. Zwei weitere Zentrifugationen (4000 g, 15 min, bei 4 °C), erneutes Resuspendieren in 20 ml HEPES Puffer und schließlich in 4 ml 10%igem Glycerol schließen das Protokoll ab. Aliquots der kompetenten Zellen wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße pipettiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen nach Inoue *et al.* [128]: 250 ml SOB-Medium wurden mit 2,5 ml einer frischen, in LB-Medium über Nacht gewachsenen Vorkultur inokuliert und bei 18 °C unter Schütteln (200 rpm) bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600}=0,6$ kultiviert (1–2 Tage). Die 250 ml Bakterienkultur wurde dann im Zentrifugenbecher 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in der vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert (2500 g, 10 min bei 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 80 ml eiskaltem TB Puffer vorsichtig resuspendiert und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (2500 g, 10 min bei 4 °C) wurde das resultierende Pellet in 20 ml eiskaltem TB Puffer aufgenommen. Anschließend wurde unter leichtem Schwenken 1,5 ml DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% hinzugefügt. Schließlich wurden die Bakterien nach 10 min Inkubation auf Eis aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.6 Gateway Technologie

Die Gateway Technologie nutzt den Mechanismus der Signalsequenz-spezifischen Rekombination des Bakteriophagen Lambda zur Klonierung von PCR-Produkten mit den Signalsequenzen attP und attR in Gateway-Vektoren [129].

2.2.6.1 BP-Clonase Reaktion:

Diese *in vitro* Reaktion, vermittelt durch das Lambda Protein Integrase (Int) und den *E. coli* Integration Host Factor (IHF), katalysiert die Signalsequenz-spezifische Rekombination zwischen attB Signalsequenzen am 5'- bzw. 3'-Ende eines PCR-Produkts mit einem Vektor, der attP Signalsequenzen aufweist. Die attB Signalsequenzen wurden über die Primer (Anhang A.4) während der PCR Amplifizierung mit dem Standardprotokoll an das 5'- und 3'-Ende des Produktes angefügt. Die BP Clonase Reaktion wurde in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert:

 $x \mu l$ 150 ng PCR-Produkt $1 \mu l$ attP Vektor (150 ng/ μl) $2 \mu l$ BP Clonasead 10 μl 1x TE Puffer, pH 8,0

Nach Inkubation der Reaktion bei 25 °C für 1 h wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 1 μ l Proteinase K Lösung (2 μ g/ μ l) und Inkubation bei 37 °C für 10 min gestoppt. 1 μ l der Reaktion wurde anschließend in chemisch-kompetente *E. coli* Zellen transformiert und positive Klone selektiert (siehe Abschnitt 2.2.5.4).

2.2.6.2 LR-Clonase Reaktion:

Diese *in vitro* Reaktion, vermittelt durch die Lambda Proteine Integrase (Int) und Excisionase (Xis) sowie den *E. coli* Integration Host Factor (IHF), katalysiert die Signalsequenzspezifische Rekombination eines klonierten DNA-Fragments flankiert von attL Signalsequenzen (attL-Vektor) in einen anderen Vektor mit attR Signalsequenzen. Die LR Clonase Reaktion wurde in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert:

- x μ l attL Vektor (150 ng/ μ l)
- $1 \,\mu l$ attR Vektor (150 ng/ μl)
- $2 \mu l$ BP Clonase
- ad $10 \,\mu l$ 1x TE Puffer, pH 8,0

Nach Inkubation der Reaktion bei 25 °C für 1 h wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 1 μ l Proteinase K Lösung (2 μ g/ μ l) und Inkubation bei 37 °C für 10 min gestoppt. 1 μ l der Reaktion wurden anschließend in chemisch-kompetente *E. coli* Zellen transformiert und positive Klone selektiert (siehe Abschnitt 2.2.5.4).

2.2.7 RedET-Rekombination in E. coli

Die RedET vermittelte Integration einer selektierbaren Genkassette in einen BAC-Vektor durch homologe Rekombination in E. coli lässt sich in drei Schritte unterteilen (Abbildung 2.1 A). Im ersten Schritt wird das Plasmid pSC101-BAD-gbaA in den E. coli Stamm mit dem BAC transformiert. Das Plasmid trägt alle für die Rekombination erforderlichen Gene unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors des Arabinose Operons. Die Replikation des Plasmids ist temperatursensitiv. Bei 37 °C verliert der Vektor die Fähigkeit zur Replikation. Im zweiten Schritt wird die Expression der Gene, die die homologe Rekombination vermitteln, durch Zugabe von L-Arabinose und Erhöhung der Temperatur von 30 °C auf 37 °C induziert. Nach der Induktion wird eine PCR-amplifizierte Genkassette in die E. coli Zellen elektroporiert. Über die durch die PCR eingeführten 50 bp langen Sequenzen am 5'- und 3'-Ende der Genkassette, die homolog zur Integrationsstelle im BAC sind, wird nun die Rekombination vermittelt. Im dritten und letzten Schritt werden E. coli Kolonien mit erfolgreich modifiziertem BAC über die Antibiotikaresistenz der Genkassette auf LB-Agar Platten selektiert. Erfolgreich rekombinierte BACs werden durch Standard PCR und Restriktionsverdau bestätigt. Eine weitere Möglichkeit der RedET-Rekombination ist die Subklonierung einzelner Bereiche des BACs. Die Schritte sind mit der Integration einer Genkassette vergleichbar (Abbildung 2.1 B). Den entscheidenden Unterschied machen jedoch die seitenverkehrten homologen Sequenzen im PCR-Produkt aus, die den zu subklonierenden Bereich des BACs flankieren. Das PCR-Fragment enthält nur eine Antibiotikaresistenz und einen Replikationsursprung und bildet einen Minimalvektor. Die Rekombination entspricht einem "Copy&Paste"-Mechanismus. Der lineare Minimalvektor bildet nach der Subklonierung ein replikationskompetentes Plasmid mit dem gewünschten DNA-Bereich des BACs.

2.2.7.1 Transformation von pSC101-BAD-gbaA:

Am Vortag wurde 1 ml LB-Medium plus entsprechendem Antibiotikum (Tabelle 2.2) mit zehn gepickten Kolonien von dem BAC tragenden *E. coli* Stamm inokuliert und über



Abbildung 2.1: RedET-Rekombination in *E. coli*. Schematische Darstellung der Integration einer Genkassette (A) und der Subklonierung eines Gens aus einem BAC in einen Minimalvektor (B).

Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,4 ml LB-Medium (+ Antibiotikum) im 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 30 μ l Übernachtkultur angeimpft und 3 h bei 37 °C unter Schütteln (1100 rpm) inkubiert. Nach Inkubation wurden die *E. coli* Zellen in der Tischzentrifuge pelletiert (11.000 rpm, 30 s, 4 °C), das LB-Medium verworfen und die Zellen in 1 ml eiskaltem ddH₂O durch Pipettieren resuspendiert. Zentrifugation (11.000 rpm, 30 s, 4 °C) und anschließendes Resuspendieren in 1 ml eiskaltem ddH₂O wurde nochmals wiederholt. Nach dem Pelletieren der Zellen wurde das überstehende ddH₂O dekantiert und die Bakterien in 30 μ l eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Zu den *E. coli* Zellen wurden nun 20 ng des pSC101-BAD-gbaA Plasmids pipettiert. Die Zellen wurden dann in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (d = 1 mm) pipettiert, mit einem Impuls von 1350 V (10 μ F, 600 Ω) elektroporiert und anschließend mit der Pipette in 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium aus der Küvette in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 70 min Inkubation bei 30 °C unter Schütteln (1100 rpm) wurden 100 μ l der Zellsuspension auf LB-Agar Platten mit entsprechendem Antibiotikum (Chloramphenicol für pBac3.6-Vektoren) und zusätzlich $3 \mu g/ml$ Tetracyclin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei $30 \degree C$ inkubiert. Cm^{*R*}-Tet^{*R*} Kolonien sollten sowohl den ursprünglichen pBac3.6 Vektor als auch das Plasmid pSC101-BAD-gbaA besitzen.

2.2.7.2 Amplifizierung von Genkassetten für die RedET-Rekombination:

Für die Amplifizierung der Reportergenkassette wurde folgender PCR-Ansatz pipettiert:

- 1,0 μ l pDsRedExpress-NLS-IRES-Puro3 Vektor (10 ng/ μ l)
- 5,0 μ l 10x PCR Puffer
- 10,0 µl 5x CES
- $0,4 \,\mu l$ dNTPs (100 mM)
- 0,5 μ l Taq-Polymerase
- 3,0 μ l 5'-Sox17DsRedExpress-Homologie-Primer¹ (10 pmol/ μ l)
- 3,0 μ l 3'-Sox17DsRedExpress-Homologie-Primer¹ (10 pmol/ μ l)
- 27,1 µl ddH₂O

Die Amplifizierung fand unter folgenden Bedingungen statt: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min; 15 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Primer-Annealing bei 72 °C mit einem Inkrement von $\Delta T = -1$ °C pro Zyklus für 30 s und Elongation bei 72 °C für 4 min; 25 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Primer-Annealing bei 58 °C für 30 s und Elongation bei 72 °C für 4 min; finale Elongation bei 72 °C für 10 min und Herunterkühlen auf 4 °C. Das PCR-Produkt wurde im PCR Puffer 2 h bei 37 °C mit *Dpn* I verdaut und mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde auf 150 ng/ μ l eingestellt. Der Amp^{*R*}-oriC-Minimalvektor wurde folgendermaßen amplifiziert:

1,0 µl	pACYC177 Vektor DNA ($10 \text{ ng}/\mu l$)
5,0 µl	10x PCR Puffer
$0,4\mu\mathrm{l}$	dNTPs (100 mM)
0,5 µl	Taq-Polymerase
3,0 µl	5'-Amp ^{<i>R</i>} -oriC-Homologie-Primer ¹ (10 pmol/ μ l)
3,0 µl	3'-Amp ^{<i>R</i>} -oriC-Homologie-Primer ¹ (10 pmol/ μ l)
37,1 µl	ddH ₂ O

Das PCR Programm entsprach dem Standard (Abschnitt 2.2.2) mit einer Annealing-Temperatur für die Homologie-Primer von 68 °C und einer Elongationszeit von 2 min. Das PCR-Produkt wurde im PCR Puffer 2 h bei 37 °C mit *Dpn* I verdaut und mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde auf 150 ng/ μ l eingestellt.

¹Die Primersequenzen sind im Anhang A.4 aufgeführt.

2.2.7.3 RedET-Rekombination — Elektroporation von PCR-Produkten in pSC101-BAD-gbaA positive *E. coli* Bakterien:

Von dem pSC101-BAD-gbaA transformierten E. coli Stamm, der den zu modifizierenden BAC Vektor enthält, wurden Kulturen in 1 ml LB-Medium mit 3 µg/ml Tetracyclin und entsprechendem Antibiotikum zur Selektion des BAC Vektors angesetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 30 °C wurden pro Rekombination zweimal 1,4 ml LB-Medium (+ Antibiotika) im 1,5 ml Reaktionsgefäß mit $30 \,\mu$ l Übernachtkultur angeimpft und 2 h bei 30 °C unter Schütteln (1100 rpm) bis zu einer $OD_{600} \approx 0,2$ wachsen gelassen. Dann wurde die Expression der Rekombinationsenzyme des pSC101-BAD-gbaA Vektors durch Zugabe von 20 μ l 10% iger wässriger L-Arabinoselösung induziert. Zur Kontrolle wurde die zweite Kultur nicht induziert. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei 37 °C $(OD_{600} \approx 0.4)$ wurden die Zellen für die Elektroporation der PCR-Produkte vorbereitet. Dies geschah nach dem Protokoll zu Transformation des pSC101-BAD-gbaA Vektors (siehe oben). Nachdem die Bakterien mehrmals in ddH2O gewaschen worden waren, wurde 0,3 μ g PCR-Produkt in höchstens 1-2 μ l 1x TE zu den Zellen (L-Arabinose induziert und Kontrolle) gegeben, in Elektroporationsküvetten (d = 1 mm) pipettiert und mit einem Impuls von 1350 V ($10 \,\mu\text{F}$, $600 \,\Omega$) elektroporiert. Beide Ansätze wurden schließlich mit 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Während der folgenden Inkubation, 37 °C für 70 min und 1000 rpm, konnte die Rekombination der L-Arabinose induzierten Probe stattfinden und sich die Antibiotikaresistenz der Genkassette (Tabelle 2.2) entwickeln. Nach Ausplattieren der Rekombinationreaktionen auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika und Inkubation der Platten bei 37 °C über Nacht wurde auf positive Rekombinationsereignisse selektiert. Antibiotikaresistente Kolonien wurden gepickt, DNA mittels Miniprep isoliert und die erfolgreiche Rekombination mit Standard-PCR und Restriktionsverdau bestätigt.

Vektor/Conkassette	Antibiotikum	verwendete Konzentrationen		
vertor/ Genrassette	Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	
pBACe3.6	Chloramphenicol	30 mg/ml in 100% EtOH	15 µg/ml	
pSC101-BAD-gbaA	Tetracyclin	10 mg/ml in 75% EtOH	$3 \mu g/ml$	
p15A-Amp ^R Minimalvektor	Ampicillin	100 mg/ml in 50% EtOH	$50 \mu g/ml$	
DsRedExpress-NLS-IRES-Puro ^R	Kanamycin	$30 \mathrm{mg/ml}$ in ddH ₂ O	15 µg/ml	

Tabelle 2.2: Antibiotikaresistenzen von während der RedET-Rekombination verwendeten Vektoren und Genkassetten.

2.2.8 Southern-Blot

Der Southern-Blot dient dazu elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine Membran zu transferieren und zu fixieren. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde lassen sich dann einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachweisen [130].

2.2.8.1 Blotten der DNA auf Hybond-N⁺-Membranen

Um einen effizienten Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf eine Hybond-N⁺-Membran zu gewährleisten, musste das Agarosegel vorbehandelt werden. Dazu wurde das Agarosegel zunächst 30 min in 0,25 M HCl auf einer Wippe geschwenkt. Dies führte zu einer Depurinierung einzelner Basen in der DNA und schließlich zu DNA-Doppelstrangbrüchen. Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation in Denaturierungspuffer, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation in Neutralisierungspuffer. Zwischen dem Wechsel der Lösungen wurde das Gel kurz mit ddH₂O gespült. Der Southern-Blot wurde schließlich entsprechend der Abbildung 2.2 aufgebaut. Der DNA-Transfer erfolgte über Nacht durch die Kapillarkräfte, die durch das Aufsaugen des 10x SSC Puffers vom unteren Pufferreservoir durch das Gel in das saugfähige Papier entstanden.



Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau des Southern-Blots. Da die DNA aufgrund der Kapillarkräfte nach oben wandert, ist darauf zu achten, dass die Membran dem Agarosegel aufliegt.

2.2.8.2 Herstellung radioaktiver DNA Sonden

Die Herstellung der radioaktiv mit α^{32} P-dCTP markierten Sonde erfolgte mit dem Random Primed DNA Labeling Kit nach Herstellerangaben. Als Sonden-Matrize wurde 100 ng aufgereinigtes PCR-Produkt verwendet. Die radioaktiv markierte Sonde wurde über eine G-50 Säule aufgereinigt, um sämtliche nicht-inkorporierte Nukleotide zu entfernen.

2.2.8.3 Hybridisierung radioaktiver DNA Sonden auf Membranen

Die geblottete Membran wurde in 15 ml Church-Puffer bei 55 °C für einige Minuten inkubiert und dann mit der Sonde im Church-Puffer über Nacht bei 55 °C hybridisiert. Am Folgetag wurde die Membran kurz in Waschpuffer I gespült und dann 20 min in Waschpuffer I bei 60 °C gewaschen. Wenn die Membran mehr als 50 γ -Quanten beim Prüfen mit dem Geigerzähler aufwies, wurde so lange mit Waschpuffer II bei 65 °C gewaschen, bis der Wert auf ~50 Zerfallsereignisse gefallen war. Danach wurde die Membran getrocknet.

2.2.8.4 Signaldetektion von radioaktiv markierten Membranen

Die Signaldetektion auf der Membran erfolgte mittels einer α^{32} P-dCTP empfindlichen Oberfläche einer Phosphoimager-Platte. Nachdem die Membran für zwei bis vier Tage auf die Platte aufgelegt worden war, konnte das radioaktive Signal im Phosphoimager detektiert werden. Positive Signale wurden mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms ausgewertet.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten

2.3.1.1 Auftauen von eukaryotischen Zellen

Das Auftauen von Zellen im Kryoröhrchen erfolgte im 37 °C warmen Wasserbad. Die Zellsuspension wurde danach in warmes Waschmedium überführt und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min RT), um das DMSO des Kryomediums zu entfernen. Die pelletierten Zellen wurden anschließend in vollständig supplementiertem Medium (cGMEM oder cDMEM) aufgenommen. 0,5–1x10⁵ Zellen wurden in einer Zellkulturschale mit 6 cm Durchmesser ausplattiert und bei 37 °C, 5,0% CO₂ und 95,0% Humidität kultiviert.

2.3.1.2 Passage von eukaryotischen Zellen

Konfluent gewachsene, adhärente Zellen wurden zunächst mit einem geeigneten Volumen 37 °C warmen PBS gewaschen. Durch anschließende Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,25%, 1 mM) bei 37 °C für 5 min wurden die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe eines 5–10fachen Volumens Waschmedium gestoppt. Die Zellen wurden anschließend durch Pipettieren zu einer homogenen Zellsuspension resuspendiert. Abhängig von der Zelllinie wurde schließlich ein Teil (1/5–1/20) des Volumens von der Zellsuspension abgenommen und die darin enthaltenen Zellen durch Zentrifugation (1000 rpm, 5 min RT) pelletiert. Die Zellen wurden abschließend in einem geeigneten Volumen frischen Vollmediums resuspendiert, erneut ausplattiert und kultiviert.

2.3.1.3 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Konfluent gewachsene Zellen wurden trypsiniert, d.h. mit PBS ein- bis zweimal gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (0,25%, 1 mM) behandelt. Sobald sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale ablösten, wurde die Reaktion durch Zugabe eines 5–10fachen Volumens Waschmedium gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert (1000 rpm, 5 min RT). Das resultierende Pellet wurde in kaltem Kryomedium (10% (v/v) DMSO in FCS) aufgenommen und in Kryoröhrchen auf Eis überführt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend in einer vorgekühlten Styroporbox in einen -80 °C-Gefrierschrank gestellt und am Folgetag bis zum weiteren Gebrauch in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3.2 Kultur verschiedener eukaryotischer Zelllinien

2.3.2.1 HEK-293 und COS-1

Die Zelllinien HEK-293 und COS-1 wurden entsprechend der Standardverfahren in D-MEM mit 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/l D-Glucose, 1 mM Natriumpyruvat und 50 μ M β -Mercaptoethanol kultiviert. Die verwendete FCS Konzentration betrug 10%, zusätzlich wurde dem Medium noch ein Gemisch aus Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, 1%) hinzugefügt. Das Waschmedium enthielt 5% FCS und keine Antibiotika. Konfluent gewachsene HEK-293 Zellen wurden alle 2–3 Tage in einem Verhältnis von 1:20 passagiert, COS-1 Zellen wurden ebenfalls alle 2–3 Tage, jedoch in einem Verhältnis von 1:10, passagiert.

2.3.2.2 Embryonale Stammzellen

In dieser Arbeit wurde mit zwei unterschiedlichen ES Zelllinien gearbeitet: (*i*) ES Zellen, die sich aus C57BL/6 x 129/Sv hybriden Embryonen ableiten (F1-ES Zellen) und (*ii*) CGR8-ES Zellen. Erstere müssen auf einer Nährschicht wachstumsinhibierter embryonaler Fibroblasten der Maus (MEF) kultiviert werden, letztere können ohne eine solche Nährschicht kultiviert werden. Beide Zelllinien wurden in G-MEM mit 15% FCS, 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/L D-Glucose, 1 mM Natriumpyruvat, 50 μ M β -Mercaptoethanol und einem Gemisch nicht-essentieller Aminosäuren (1%), sowie 1% Pen/Strep kultiviert. Außerdem wurde dem Vollmedium das Cytokin LIF in einer Endkonzentration von 1000 U/ml zugesetzt. G-MEM supplementiert mit 5% FCS wurde als Waschmedium verwendet. Die in Kolonien wachsenden ES Zellen wurden entsprechend dem Standard-

protokoll in einem Verhältnis von 1:5 im Abstand von 2 Tagen passagiert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Zellkolonien während der Trypsin/EDTA-Behandlung vollständig dissoziieren, da aggregierte ES Zellen zur Differenzierung tendieren. Für die Kultur der F1-ES Zellen mußten am Vortag wachstumsinhibierte Fibroblasten (Abschnitt 2.3.2.3) als Nährschicht in die Zellkulturschalen ausgesät werden. Bevor die F1-ES Zellen am Folgetag auf die Nährschicht ausplattiert werden konnten, wurde das MEF Medium abgesaugt und die Oberfläche der Zellschicht mit ES-Waschmedium abgespült.

2.3.2.3 Embryonale Fibroblasten

Die embryonalen Fibroblasten wurden aus Tag 13,5 p.c. alten DR4 Mausembryonen gewonnen. Sie wurden in einem Verhältnis von 1:3-1:5 in cDMEM passagiert und nicht länger als 5 Passagen kultiviert. Vor ihrer Verwendung als Nährschicht wurden die Fibroblasten mit Mitomycin C behandelt. Mitomycin C inhibiert irreversibel das Wachstum der Zellen und sorgt damit dafür, dass die ES Zellen nicht von den Fibroblasten überwachsen werden. Für die Inaktivierung wurden die Fibroblasten für 2 h mit 10 μ g/ml Mitomycin C in cDMEM inkubiert. Anschließend wurden die inaktivierten Fibroblasten zweimal in PBS gewaschen und entweder direkt für die ES Zellkultur verwendet oder bis zu ihrem Gebrauch kryokonserviert.

2.3.3 Differenzierung embryonaler Stammzellen

2.3.3.1 Differenzierung im Monolayer

Murine ES Zellen differenzieren spontan, wenn Pluripotenz und Selbsterneuerung nicht durch die Zugabe von LIF im Zellkulturmedium aufrechterhalten werden. Diese spontane Differenzierung nach LIF Entfernung lässt sich durch die Veränderung der Zellkultur erkennen. Der Zellkörper der ES Zelle flacht ab, die ES Zellkolonie verliert ihre typische Morphologie und es bildet sich eine inhomogene Zellschicht (Monolayer) mit unterschiedlich differenzierten Zelltypen. CGR8 Zellen wurden im Monolayer differenziert indem 1x10⁶ Zellen pro 6 cm Zellkulturschale in ES Zell-Medium ausgesät wurden. Nach 12 h wurde das ES Zell-Medium durch Medium ohne LIF ersetzt (Tag 0) und danach alle zwei Tage erneuert. Differenzierte Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und analysiert.

2.3.3.2 Differenzierung über Embryoid Bodies

Embryoid Bodies (EBs) wurden mit dem "Hängenden-Tropfen"-Verfahren aus ES Zellen hergestellt. Dazu wurden die ES Zellen zunächst trypsiniert, gezählt und nach Zentrifugation (1000 rpm, 5 min, RT) auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml mit cIMDM gebracht. 1×10^6 Zellen wurden dann in 40 ml cIMDM aufgenommen. Nun wurde die Zellsuspension in Tropfen mit einem Volumen von 20 μ l auf die Deckelinnenfläche einer Petrischale pipettiert. Nach Auflegen des Deckels hingen die Tropfen kopfüber, und die Schwerkraft führte dazu, dass die ES Zellen am Meniskus des Tropfens aggregierten. Nach zwei Tagen wurden die gebildeten EBs mit 5 ml cIMDM vom Deckel der Schale abgespült und in Suspension in einem Volumen von 20 ml weitere vier bis acht Tage in nicht-adhäsiven, bakteriologischen Schalen kultiviert. Alle zwei Tage wurde die Hälfte des Medium abgesaugt und fehlendes Volumen anschließend durch frisches cIMDM ersetzt [131].

2.3.4 DNA Transfektion von Zellen

2.3.4.1 Stabile Transfektion von ES Zellen durch Elektroporation

Zwei Stunden vor Transfektion wurde zunächst noch einmal das Zellkulturmedium der CGR8- oder F1-ES Zellen gewechselt. Dann wurden die subkonfluent gewachsenen ES Zellen geerntet, in Waschmedium gewaschen, nach Zentrifugation (1000 rpm, 5 min, RT) in 10 ml Waschmedium resuspendiert und gezählt. Die embryonalen Fibroblasten störten während der Transfektion nicht, sollten aber beim Zählen der ES Zellen berücksichtigt werden. Fibroblasten und ES Zellen konnten aufgrund ihrer Größe unter dem Mikroskop unterschieden werden. Pro Transfektion wurden 1x10⁷ ES Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, pelletiert (1000 rpm, 5 min, RT), in 10 ml kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT). Die ES Zellen wurden schließlich in 800 μ l eiskaltem PBS aufgenommen und mit $20 \,\mu g$ linearisierter Plasmid-DNA vorsichtig gemischt, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (d = 0,4 cm) überführt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Elektroporation mit einem Stromimpuls von 250 V und einer Kapazität von 500 μ F wurden die Zellen weitere 5–10 min auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurden pro Transfektion 6 Zellkulturschalen (Ø 6 cm) mit Neomycin resistenten embryonalen Fibroblasten vorbereitet. Mit einer Pasteurpipette wurden die transfizierten Zellen aus der Küvette in 30 ml auf 37 °C vorgewärmtem, nicht-selektivem ES Zellmedium resuspendiert und auf die vorbereiteten Zellkulturschalen verteilt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5,0% CO₂ und 95,0% Humidität kultiviert. 24 h nach Transfektion wurde das ES Zellmedium durch ES Zellmedium mit $400 \,\mu g/ml$ Geneticin ersetzt. Die Selektion stabil transfizierter ES Zellen erfolgte über sieben weitere Tage mit täglichem Wechsel des selektiven Mediums. Acht Tage nach Transfektion wurden Geneticin resistente ES Zellkolonien unter dem Stereomikroskop einzeln gepickt und in Zellkulturplatten im 96er-Format kultiviert. Nach weiteren 3–5 Tagen konnten die ES Zellklone

passagiert und die Zellkulturplatten 3fach repliziert werden. Nach weiteren zwei Tagen konnten die ES Zellklone einer Zellkulturplatte kryokonserviert werden, während die anderen zwei Replikate für die Analyse auf stabile Integration und homologe Rekombinationsereignisse zur Verfügung standen.

2.3.4.2 Transiente Transfektion von HEK-293 und COS-1 Zellen mit Lipofectamin2000

Transiente Transfektionen wurden mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin2000 durchgeführt. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. 24 h vor Transfektion wurden 0.5×10^5 - 1.0×10^5 Zellen pro cm² in einem geeigneten Volumen Vollmedium ohne Antibiotikum ausplattiert. Am Folgetag wurde 2 h vor Transfektion das Medium nochmals gewechselt. Für jede zu transfizierende Probe wurde die geeignete Menge Plasmid-DNA und Lipofectamin2000 in Opti-MEM verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die verdünnte DNA mit dem Lipofectamin2000-Ansatz vermischt und weitere 20 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit konnten sich Komplexe zwischen liposomalem Transfektionsreagenz und der DNA bilden. Nach Inkubation wurde das DNA-Transfektionsreagenzgemisch auf die vorbereiteten Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken des Zellkulturgefäßes über die Zellen verteilt. Nach Inkubation der Zellen bei 37 °C, 5,0% CO₂, 95,0% Humidität wurden die transfizierten Zellen entsprechend der Fragestellung analysiert. Die Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über DNA-Mengen und Volumina, die standardmäßig für die Transfektion in verschiedenen Zell-kulturgefäßformaten verwendet wurden.

Zellkulturgefäß	Oberfläche	Zellkulturmedium	Volumina Opti-MEM	Lipofectamin2000	DNA-Menge
96er-Format	0,3 cm ²	$100 \mu l$	2x25 µl	0,5 µl	0,2 µg
24er-Format	$2 \mathrm{cm}^2$	$500 \mu l$	2x50 µl	2,0 µl	0,8 µg
12er-Format	$4 \mathrm{cm}^2$	1 ml	2x100 µl	4,0 µl	1,6 µg
6er-Format	10cm^2	2 ml	2x250 µl	$10 \mu l$	4,0 µg
6 cm Ø	20cm^2	5 ml	2x500 µl	$20 \mu l$	8,0 µg
10 cm Ø	$60 \mathrm{cm}^2$	15 ml	2x1,5 ml	60 µl	24 µg

Tabelle 2.3: Transfektion mit Lipofectamin2000. Angegeben sind die verwendeten Lipofectamin2000- und Mediumvolumina sowie die transfizierte DNA Menge für die Standardtransfektion in unterschiedlichen Zellkulturgefäßen.

2.3.5 Luciferase-Expressionsassays

Der Transkriptionsfaktor SOX17 wurde zunächst mit C- bzw. N-terminalem Myc-Tag mittels Gateway-Technologie in die Expressionsvektoren pDest474 und 701 kloniert. Dazu wurde zunächst cDNA von Gesamt-RNA, die aus *Sox17*::DsRed⁺ EB Zellen isoliert
worden war, revers transkribiert. Der 1245 bp große SOX17 ORF wurde dann mittels PCR amplifiziert. Über die PCR-Oligonukleotide (Anhang A.4) wurden die für die Clonase Reaktion benötigten attB Signalsequenzen eingeführt. Der SOX17 ORF wurde dann über eine BP Clonase Reaktion in den Vektor pDonor201 eingefügt. Schließlich wurde der SOX17 ORF über eine LR Clonase Reaktion in die Expressionsvektoren pDest474 bzw. 701 umkloniert.

Für die Reportergenkonstrukte wurde eine etwa 1,0 kb große Region 5' vom potentiellen in ENSEMBL annotierten Transkriptionsstart amplifiziert. Als DNA-Matrize für die PCR diente genomische DNA einer C57BL/6-Maus. AttB Signalsequenzen wurden über die PCR-Oligonukleotide angefügt (Anhang A.4). Die Promotorfragmente wurden über eine BP Clonase Reaktion in den promotorlosen pGL3 Vektor integriert. Der pGL3 Vektor kodiert das Reportergen Firefly-Luciferase. Die erfolgreiche Klonierung aller Konstrukte wurde durch PCR und/oder Sequenzierung bestätigt. Plasmide für die Luciferase-Expressionsassays wurden mittels Midiprep isoliert.

HEK-293 Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro Schälchen einer 96er Zellkulturplatte einen Tag vor Transfektion mit Lipofectamin2000 ausgesät. Die Zellen wurden am Folgetag entsprechend des Protokolls (Abschnitt 2.3.4.2) mit 100 ng der klonierten Firefly-Luciferasereporter, 5 ng pRL-TK Renilla-Luciferase (Transfektionskontrolle) und 5–250 ng des SOX17 Expressionsplasmids oder pUC19 Kontrolle kotransfiziert. Sechs Stunden nach Transfektion wurde LiCl (Endkonzentration 25 mM) zu einem Teil der Zellen hinzugefügt. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion geerntet und in PBS gewaschen. Der Luciferase-Expressionsassay wurde mit Hilfe des Dual-Glo Luciferase Assay Kits durchgeführt: Zellen wurden im Lysispuffer 15 min bei RT lysiert, Fireflyund Renilla-Luciferaseaktivität wurden nach Zugabe von 25 μ l Substrat im Luminometer (Moonlight 3010) gemessen. Die Daten wurden entsprechend der Transfektionseffizienz und den pUC19 Kontrollen normalisiert. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Daten wurden arithmetisch gemittelt.

2.3.6 Bestimmung des Karyotyps

Nachdem semi-konfluent gewachsenen ES Zellen trypsiniert und pelletiert worden waren, wurde das Pellet durch Anschnippen des Reaktionsgefäßes gelöst. Dann wurden die Zellen in einer wässrigen 75 mM KCl Lösung resuspendiert und 6 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Pelletieren wurden die Zellen durch vorsichtiges Resuspendieren in 10 ml eines 3:1 Gemischs aus Methanol und Eisessig fixiert. Dieser Arbeitsschritt wurde insgesamt dreimal wiederholt, bevor die Zellen in 500 μ l Fixativ aufgenommen wurden. 10 μ l dieser Zellsuspension wurde aus 10 cm Höhe auf einen Objektträger getropft. Nach Abdampfen der Fixierlösung wurden die getrockneten Präparate mit Deckgläschen

2 Material und Methoden

in 10 μ l Fluoromount-G/DAPI (0,5 μ /ml) eingedeckelt. Unter dem Mikroskop wurden mindestens 10 Metaphasen ausgezählt.

2.3.7 Durchflußcytometrie

2.3.7.1 FACS Analyse

Zellen wurden für die FACS Analyse geerntet und nach Zentrifugation (1000 rpm, 5 min, RT) mit kaltem PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (1000 rpm, 5 min, RT) in 200 μ l kaltem PBA (PBS, 1% BSA) resuspendiert. Die Zellen wurden an einem FACS-Calibur Durchflußcytometer vermessen. Tote Zellen wurden aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften im Vorwärts-/Seitwärtsgatter oder durch Färbung mit 2 μ l Propidiumiodid (PI, 50 μ g/ml in PBS, pH7,4) von der Analyse ausgeschlossen. Für jede zu analysierende Probe wurden mindestens 10.000 lebende Zellen analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software CellQuest Pro.

2.3.7.2 FACS Sortierung von Zellen

Die Isolation verschiedener, differenzierter Zellpopulationen aus EBs aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften wurde mit Unterstützung von Dipl. Ing. T. Kaiser in der Servicegruppe Durchflußcytometrie des Deutschen Rheumaforschungszentrums durchgeführt. Zunächst wurden etwa 10.000 acht Tage alte EBs in einem 50 ml Röhrchen gesammelt, in PBS gewaschen und anschließend vorsichtig 7 min lang bei 37 °C in 5 ml Accutase dissoziiert. Die Zellen wurden dann in 20 ml cIMDM resuspendiert. Verbliebene Zellklumpen wurden mit Hilfe eines Zellsiebes aus Nylon mit einer Porengröße von 70 µm aus der Zellsuspension entfernt. Die Zellen wurden pelletiert (1000 rpm, 5 min, RT) und in 37,5 ml cIMDM aufgenommen. Tote Zellen wurden vor der FACS Sortierung in einem diskontinuierlichen Gradienten entfernt. Dazu wurde in einem 50 ml Röhrchen 12,5 ml Biocoll-Lösung ($\delta = 1,077$ g/ml) vorsichtig mit den 37,5 ml der Zellsuspension überschichtet. Nach Gradientenzentrifugation mit 1000 rpm bei RT für 20 min ohne Bremse konnten die lebenden EB Zellen an der Phasengrenze mit einer Pasteurpipette abgezogen werden. Die pelletierten toten Zellen wurden verworfen. Die Zellen wurden schließlich nochmals in cIMDM gewaschen, zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT), in 1 ml PBA aufgenommen und durch einen MACS Pre-Separations Filter in ein FACS Röhrchen gefiltert. Die FACS Sortierung wurde in der Servicegruppe Zellsortierung (Flow Cytometry Core Facility, FCCF) des Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie an einem FACS-Vantage Durchflusscytometer mit Diva Option durchgeführt. Die sortierten Zellpopulationen wurden in verschiedene FACS Röhrchen gesammelt und pelletiert (1000 rpm,

5 min, RT). Schließlich wurden die Zellen direkt in 1 ml TRIzol aufgenommen und bis zur Isolierung der RNA bei -80 °C gelagert.

2.3.8 Mikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen der Reportergenexpression in EBs und in HEK-293 Zellen wurden mit einem konfokalen inversen Mikroskop (LSM 510 META, Axiovert 200M) durchgeführt. Transgene Mausembryonen wurden an einem Mikroskop mit Apoptom (Axiovert 200M) dokumentiert. Die Aufnahmen wurden mit der Software Zeiss AxioVision Rel. 4.7 gespeichert und mit Hilfe von AxioVision LE Rel. 4.2 für weitere Verwendungen bearbeitet.

2.4 Affymetrix-Array Analyse

2.4.1 Hybridisierung isolierter RNA auf Affymetrix-Arrays

Die Hybridisierung isolierter RNA auf Affymetrix-Array wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Experimentelle Genetik von Herzkreislauferkrankungen, Prof. N. Hübner, am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin durchgeführt. Totale RNA wurde aus EB-differenzierten, FACS-sortierten Sox17::DsRed⁺ und Sox17::DsRed⁻ Zellpopulationen sowie aus undifferenzierten Sox17::DsRed ES Zellen durch TRIzol Reagenz extrahiert. Genomische Kontamination wurde durch DNase I-Verdau entfernt. Anschließend wurde die RNA über Affinitätssäulen des RNAeasy MinElute Cleanup Kits aufgereinigt. Qualität und Konzentration der RNA-Präparationen wurden mit Hilfe des RNA 6000 Nano Chip Kits auf einer 2100 Bioanalyser Plattform entsprechend der Herstellerangaben überprüft. Drei unabhängige biologische Replikate, jeweils 2,0 μ g Gesamt-RNA von undifferenzierten Sox17::DsRed ES Zellen sowie Sox17::DsRed⁻ und Sox17::DsRed⁺ Zellen wurden mit Hilfe des One-Cycle Target Labeling & Control Reagent Pakets entsprechend der Herstellerbeschreibung markiert. Dabei wurde zunächst doppelsträngige cDNA mit Hilfe des One-cycle cDNA Synthese Moduls von der Gesamt-RNA revers transkribiert. Biotinylierte cRNA wurde durch in vitro Transkription (IVT) synthetisiert und anschließend aufgereinigt. Nach Fragmentierung der cRNA wurden $15 \mu g$ entsprechend des Affymetrix Standardprotokolls für 16h bei 45°C auf Mouse Genome 430v.2.0 GeneChips hybridisiert. Nach Hybridisierung wurden die Arrays gewaschen, mit Streptavidin-Phycoerythrin in einer Affymetrix Fluidics Station 450 gefärbt und schließlich mit dem Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 7G gescannt.

2.4.2 Bioinfomatische Auswertung der Affymetrix-Affay

2.4.2.1 Bildverarbeitung und Normalisierung der Affymetrix-Daten

Die gescannten Bilddaten der Affymetrix-Arrays wurden mit der GCOS 1.4 Software unter Verwendung der Affymetrix Standardeinstellungen analysiert. Nach RMA Normalisierung der Daten [132] wurden paarweise Vergleiche mit Hilfe eines Student's *t*-Test durchgeführt (ungepaart und unter Voraussetzung ungleicher Varianz). Ein Student's *t*-Test *p*-Wert \leq 0,05 und eine Änderung der Expression von \geq 2 wurden herangezogen, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren und deren Zahl zu begrenzen.

2.4.2.2 Cluster-Analyse

Hierarchische Clusteranalysen wurden für eine Schnittmenge von Genen durchgeführt, die (*i*) in undifferenzierten *Sox17*::DsRed ES Zellen und *Sox17*::DsRed⁺ Zellen und (*ii*) in *Sox17*::DsRed⁻ und *Sox17*::DsRed⁺ Zellen differentiell exprimiert waren. Für die Clusteranalyse wurde das Programm Cluster Version 3.0 verwendet [133,134]. *Average linkage clustering* mit nicht-zentrierter Korrelation wurde nach Zentrierung und Normalisierung der Mediane von Genen und Arrays durchgeführt. Die Ergebnisse der Clusteranalysen wurden mit dem Programm TreeView Version 1.1.3 dargestellt [135].

2.4.2.3 Funktionale Annotierung

Differentiell exprimierte Gene wurden entsprechend vordefinierter biologischer Pfade und funktioneller Kategorien annotiert. KEGG-, BioCarta- und GO-Annotierungen [136, 137] wurden mit Hilfe von DAVID (*Database for Annotation Visualisation and Integrated Discovery*) analysiert [138]. Für eine überrepräsentierte GO-, Biocarta- oder KEGG-Annotierung wurde ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ (exakter Fischer *t*-Test) gewählt. Ein Gen kann in mehr als einer KEGG-, BioCarta- oder GO-Kategorie vorkommen.

2.5 Embryologische Methoden

2.5.1 Blastozysteninjektion

Die Injektion genetisch manipulierter CGR8 und F1-ES Zellen zur Herstellung genetisch veränderter Mauslinien wurde von Dipl. Ing. I. Voigt im Tierhaus des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik durchgeführt. Genetisch veränderte CGR8-ES Zellen wurden für die Injektion entsprechend des Standardprotokolls geerntet und in 500 μ l Volumen von Waschmedium resuspendiert. Im Fall der F1-ES Zelllinie mussten zunächst die Nährzellen aus der ES Zellsuspension entfernt werden. Dies geschah durch sogenanntes *panning*: nach Trypsin/EDTA Behandlung (Abschnitt 2.3.1.2) wurden die Zellen zunächst gewaschen, zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT) und in ES Zellmedium erneut auf einer frischen Zellkulturschale ausplattiert. Da die embryonalen Fibroblasten schneller an der Zellkulturschale adhärieren, ließen sich die ES Zellen nach einer Stunde Inkubation im Zellkulturschale haften blieben. Danach wurden die F1-ES Zellen noch einmal zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT) und schließlich in 500 μ l Waschmedium aufgenommen. Insgesamt wurden pro Blastocyste 5–8 Einzelzellen aus der Suspension injiziert.

2.5.2 Whole-mount in situ Hybridisierung

Das hier beschriebene Protokoll wurde nach Wilkinson modifiziert [139]. Die Schritte der *in situ* Hybridisierung umfassen die Präparation der Embryonen unter RNase freien Bedingungen, die Fixierung durch Paraformaldehyd (PFA), die Entwässerung in Methanol und Rehydrierung sowie die Prozessierung der Embryonen, bevor sie anschließend mit einer genspezifischen RNA-Sonde hybridisiert und die Genexpression durch Immunfärbung sichtbar gemacht wird.

2.5.2.1 Präparation und Prozessierung von Mausembryonen

Stadien E8,5–10,5: NMRI Präparation von Mausembryonen der und Sox17^{tm1(DsRed)Tbnl} Weibchen wurden nach Verpaarung täglich auf die Ausbildung eines vaginalen Pfropfens (Plug) kontrolliert. Der Zeitpunkt der Bildung des vaginalen Plugs wurde mit E0,5 gleichgesetzt. Am Tag der Präparation wurden schwangere Weibchen durch zervikale Dislokation getötet und nach Öffnung des Abdomens der Uterus mit den Embryonen freigelegt und entnommen. Die weitere Präparation der Embryonen aus dem Uterus erfolgte mit Hilfe eines Binokulars. Die detaillierte Beschreibung der nötigen Präparationsschritte findet sich in "Manipulating the Mouse Embryo" (Protokolle 4.8 und 5.3 [26]). Die von extraembryonalen Membranen befreiten Embryonen wurden schließlich in eiskaltes PBS überführt.

Fixierung in Paraformaldehyd: Frisch präparierte Embryonen wurden vor der Fixierung 10 min in einem 50 ml Röhrchen in 20 ml PBS bei 4 °C gewaschen. Anschließend wurde das PBS durch 20 ml 4%ige Paraformaldehydlösung ersetzt. Die Embryonen wurden in der PFA-Lösung bei 4 °C über Nacht fixiert.

Entwässerung durch Methanol: Fixierte Embryonen wurden am Folgetag durch eine aufsteigende Methanolreihe entwässert und entfettet. Zunächst wurden die Embryonen in 20 ml PBST für 15 min gewaschen. Anschließend wurde PBST durch je 20 ml 25%-, 50%- und 75% iges Methanol/PBST ersetzt (Inkubation für jeweils 15 min). Die Embryonen wurden schließlich in 100% Methanol aufgenommen. Bis zu ihrer weiteren Verwendung konnten die Embryonen nun bei -20 °C in Methanol gelagert werden.

Prozessierung der Embryonen vor der Hybridisierung: Die Embryonen wurden zunächst durch eine absteigende Methanolreihe wieder rehydriert und in PBST überführt. Dazu wurden die Embryonen im 50 ml Reaktionsgefäß je 15 min bei 4 °C mit 75%-, 50%und 25% igem Methanol/PBST gewaschen. Nachdem die Embryonen zweimal für 15 min bei 4 °C mit PBST gewaschen worden waren, wurden sie durch Behandlung mit einer 6% igen H₂O₂-PBST Lösung gebleicht. Durch die H₂O₂ Behandlung werden zudem endogene Enzyme, vor allem alkalische Phosphatasen, inaktiviert. Nachdem die Embryonen zweimal für 15 min bei 4 °C mit PBST gewaschen worden waren, wurden sie in PBST/Formamid (1:1) überführt und bis zur Hybridisierung bei -20 °C gelagert.

2.5.2.2 Herstellung und Hybridisierung genspezifischer RNA-Sonden

RNA-Sonden wurden durch *in vitro* Transkription einer PCR-amplifizierten DNA-Matrize mittels T7-RNA-Polymerase hergestellt. Dabei wurde zunächst ein 100–500 bp großer Abschnitt der cDNA des zu untersuchenden Gens amplifiziert. Über genspezifische PCR-Primer (Anhang A.4) wurde die für die *in vitro* Transkription benötigte T7-Promotorsequenz am 3'-Ende des amplifizierten Genabschnitts eingefügt (siehe Abbildung 2.3).

PCR-Amplifizierung der Sonden: Auf Eis wurde folgender Ansatz in $0,2 \mu$ l PCR-Reaktionsgefäße pipettiert:

 $\begin{array}{rrrr} x \ \mu l & 20-100 \ ng \ cDNA \\ 5 \ \mu l & 10x \ PCR \ Puffer \\ 10 \ \mu l & 5x \ CES \\ 0,4 \ \mu l & dNTPs \ (100 \ mM) \\ 0,5 \ \mu l & Taq \ Polymerase \\ 1,0 \ \mu l & 5'-Primer \ (100 \ pmol/\mu l) \\ 1,0 \ \mu l & 3'-T7-Primer \ (100 \ pmol/\mu l) \\ ad \ 50 \ \mu l & ddH_2O \end{array}$

Das verwendete Temperaturprofil im Thermozykler lautete wie folgt: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min; 30 Zyklen Amplifizierung mit Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Primer-Annealing bei 58 °C für 30 s und Elongation bei 72 °C für 1 min; finale Elongation 72 °C für 10 min und abschließendes Abkühlen auf 4 °C. Die Größe der PCR-Produkte wurde durch Gelelektrophorese im 1%igen TAE-Agarosegel überprüft und anschließend wurde die amplifizierte DNA mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits aufgereinigt. Die DNA-Konzentration aufgereinigter PCR-Produkte wurde photometrisch bestimmt.

In vitro **Transkription:** Für die Herstellung der RNA Sonden mittels *in vitro* Transkription wurde der MAXIscript Kit verwendet. Die Sonden wurden durch den Einbau von Digoxygenin (DIG) enthaltenden UTP-Analoga markiert. Pro Sonde wurde folgender Ansatz bei RT im 0,2 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

- x μ l 1 μ g T7-PCR-Produkt, aufgereinigt
- $2 \mu l$ 10x Transkriptionspuffer
- $1 \,\mu l$ ATP (10 mM)
- 1 μl CTP (10 mM)
- $1 \,\mu l$ GTP (10 mM)
- 0,6 μl UTP (10 mM)
- 0,4 μl DIG-UTP (10 mM)
- $2 \mu l$ T7 Polymerase
- ad 20 μ l Nuklease-freies ddH₂O

Der Reaktionsansatz wurde im Heizblock bei 37 °C für 2 h inkubiert. Die DNA-Matrize wurde anschließend durch Zugabe von 1 μ l DNase und 15-minütiger Inkubation bei 37 °C verdaut. Die Reaktion wurde abschließend durch Zugabe von 1 μ l 0,5 M EDTA 5 min bei 65 °C gestoppt. Nicht eingebaute Nukleotide und Reste der DNA-Matrize wurden schließlich durch Ammoniumacetat/EtOH-Fällung wie folgt abgetrennt: Zunächst





wurde die Transkriptionsreaktion mit 28 μ l Nuklease-freiem ddH₂O auf ein Volumen von 50 μ l gebracht. Dann wurden 5 μ l 5 M Ammoniumacetat und 150 μ l 100% EtOH hinzuge-fügt und gemischt. Die RNA wurde nun durch mindestens 30-minütige Inkubation bei -20 °C gefällt und anschließend durch Zentrifugation (14.000 g, 15 min, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde schließlich mit eiskaltem 70% EtOH gewaschen, erneut zentrifugiert (14.000 g, 15 min, 4 °C) und nach Verwerfen des Überstandes getrocknet. Die RNA-Sonde wurde zuletzt in Nuklease-freiem Wasser gelöst. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der RNA-Integrität durch Elektrophorese im 1% igem TAE-Agarosegel wurde die RNA-Konzentration auf 200 ng/ μ l eingestellt und Formamid bis zu 50% (v/v) hinzugefügt. Die Sonden konnten bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

2.5.2.3 Hybridisierung der Sonden:

In einer Zellkulturschale (24er-Format) wurden abhängig vom Alter der Embryonen 250– 500 μ l Hybridisierungspuffer vorgelegt. Pro zu hybridisierender Sonde wurden etwa 4–8 Embryonen (E 8,5–10,5) aus dem Formamid-haltigen Lagerungspuffer in die Zellkulturschalen überführt. Embryonen jünger als E 8,5 wurden in nicht-adhäsiven 1,5 ml Reaktionsgefäßen hybridisiert. Die Embryonen wurden nun bei 68 °C im Hybridisierungsofen für 2 h prähybridisiert. Anschließend wurden 2,5–5 μ l DIG-markierter RNA-Sonde (100 ng/ μ l; Endkonzentration 1 μ g/ml) hinzugefügt und die Embryonen wurden mit der Sonde bei 68 °C im Hybridisierungsofen über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Embryonen in Netzkontainer überführt und wie folgt gewaschen: 2 x 30 min Lsg.1 bei 68 °C, 2 x 30 min Lsg.3T bei 68 °C und 2 x 60 min Lsg.3T bei 68 °C. Anschließend wurden die Embryonen in einer auf 68 °C vorgewärmten Lsg.3T/MABT Lösung (1:1) bei RT 15 min inkubiert und nochmals 3 x 15 min in MABT bei RT gewaschen.

2.5.2.4 Färbung der Embryonen mit Alkalischer Phosphatase

Der Nachweis der spezifisch hybridisierten RNA-Sonde erfolgt mit Hilfe eines Antikörper Fab-Fragmentes, das spezifisch an die DIG-Markierung der RNA-Sonde bindet. An das anti-DIG Fab-Fragment ist eine alkalische Phosphatase gekoppelt. Das über das Fab-Fragment an der Sonde immobilisierte Enzym setzt das Substrat NBT/BCIP zu einem farbigen Präzipitat um.

Blockierung freier Bindestellen und Antikörperbindung: Um eine unspezifische Bindung des anti-Digoxigenin Fab-Fragmentes zu verhindern, wurden die Embryonen mit der Blocklösung bei RT eine Stunde gewaschen und anschließend für eine weitere Stunde in Blocklösung/FCS (1:1) inkubiert. Das anti-DIG-AP Fab-AP Konjugat wurde 1:2000 in Blocklösung/FCS verdünnt und zu den Embryonen gegeben. Die Antikörperbindung fand über Nacht bei 4 °C statt. Während der folgenden Tage wurden die Embryonen 3 x 15 min, 3 x 60 min und 2–3 x 24 h in MABT bei 4 °C gewaschen.

Peroxidase-Farbreaktion: Das für die Farbreaktion benötigte alkalische Milieu wurde durch Wechsel des Puffers von MABT zu NTMT erreicht. Der Wechsel der Puffer erfolgte durch 2 x 10 min Waschen der Embryonen in NTMT und anschließend einer weiteren Inkubation in NTMT für 40 min bei RT. Die Embryonen wurden in einer Lösung aus 200 ml NTMT mit 900 μ l NBT und 700 μ l BCIP bei RT im Dunkeln gefärbt. Da die Dauer der Farbreaktion abhängig von der Anzahl nachzuweisender Transkripte war, wurde das Fortschreiten der Farbreaktion in zeitlichen Abständen, anfangs alle 10–15 min (erste Stunde), anschließend stündlich, kontrolliert. Die Farbreaktion wurde durch einfaches Auswaschen des NBT/BCIP Substrates mit PBST gestoppt. Abschließend wurden die Embryonen in 80% Glycerol/PBST überführt, was zur Klärung und Stabilität der hybridisierten Embryonen führte. Die Embryonen konnten bis zur fotographischen Dokumentation mit Hilfe eines Stereomikroskops (Zeiss Stemi-DV4) bei 4 °C gelagert werden.

Die vorliegende Arbeit untersucht das Transkriptom von endodermal festgelegten Zelltypen mit Hilfe von genetisch veränderten ES Zellen. Der Abschnitt 3.1 dieses Kapitels befasst sich mit der Etablierung und Charakterisierung einer ES Zelllinie, die es ermöglicht, endodermale Differenzierung mit Hilfe des Reportergens DsRedExpress — im Folgenden verkürzt DsRed genannt — unter der Kontrolle des endodermalen *Sox17* Promotors zu verfolgen. Der Abschnitt 3.2 untersucht die Expression des Reportergens *in vivo* am Modell der transgenen Mauslinie *Sox17*^{tm1(DsRed)Tbnl}. Die Isolierung *Sox17*::DsRed⁺ endodermaler Zellen und eine globale Charakterisierung des Transkriptoms ist Inhalt des Abschnitts 3.3. Der Abschnitt 3.4 versucht schließlich, neu gewonnene Erkenntnisse über das Endoderm-spezifische Transkriptom zu verifizieren — Transkripte, deren Funktion während der Endodermentwicklung der Maus bisher nicht bekannt waren, werden *in vivo* durch *whole-mount in situ* Hybridisierung und *in vitro* durch Luciferase-Expressionstests näher untersucht.

3.1 Etablierung und Charakterisierung einer *Sox17*::DsRed ES Zelllinie

3.1.1 Struktur des Sox17 Gens der Maus

Der *Sox17* Locus innerhalb der Bande A1 auf Chromosom 1 umfasst, startend an Position 4,48 Mb, einen Bereich von 6,43 kb. Zwei primäre Transkripte mit einer Länge von 5,49 kb bzw. 5,96 kb werden vom reversen DNA Strang abgelesen. (Abbildung 3.1 A und C). Die Transkripte werden durch alternatives Spleißen zu zwei mRNAs mit einer Länge von 3130 und 3242 Ribonukleotiden prozessiert. Die SOX17 Proteine unterscheiden sich dadurch am N-Terminus in einer Länge von 128 Aminosäuren. Der N-Terminus kodiert für die DNA bindende *High Mobility Group (HMG)* Domäne. Daher ist das verkürzte SOX17 Protein nicht in der Lage, spezifisch DNA zu binden. Die Analyse von *Expressed Sequence Tags* (EST) lässt auf verschiedene Transkriptionsstartstellen (TSS) der beiden primären *Sox17* Transkripte schließen (Abbildung 3.1 E). Obwohl Kanai-Azuma *et al.* [99] eine gewebespezifische Expression der alternativen Spleißvarianten während der Spermatogenese nachweisen konnten, ist über die Struktur des *Sox17* Promotors und dessen Regulation nur wenig bekannt. SOX17 ist in der Lage, mit β -Catenin, einer Komponente des kanonischen WNT-Signalweges, physikalisch zu interagieren und die Expression endodermaler Zielgene (z.B. *Hnf1b*, *Foxa2*) stromabwärts zu regulieren [140]. *Sox17* ist innerhalb der Vertebraten sowohl auf molekularer als auch auf funktioneller Ebene stark konserviert (Abbildung 3.1 D).

3.1.2 Identifizierung von Sox17 Bacterial Artificial Chromosome Klonen

Das sequenzierte Mausgenom ermöglichte über Sequenzvergleich und Recherche in den Datenbanken *ENSEMBL* (http://www.ensembl.org/) und *UCSC Genome Browser* (http://genome.ucsc.edu/) die schnelle Identifizierung von *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) Klonen, die den offenen Leserahmen (ORF) des *Sox17* Gens kodieren. Durch



Abbildung 3.1: Organisation des murinen *Sox17* **Locus.** Der Transkriptionsfaktor *Sox17* ist innerhalb der Bande A1 des Chromosoms 1 im Bereich zwischen 4.481 kb und 4.487 kb lokalisiert (A). Abgedeckt wird dieser genomische Bereich von den BACs RP23-285G23 und RP23-37D15 (B). Der *Sox17* Locus kodiert für die 5,96 kb und 5,49 kb langen primären in *ENSEMBL* annotierten Transkripte ENSMUST00000116652 und ENSMUST00000027035. Die Lage der N-terminalen DNA-bindenden HMG Proteindomäne ist durch die gestrichelte Box gekennzeichnet (C). Die Konservierung des *Sox17* Locus wird durch das Alignment über 30 Spezies (Vertebraten) wiedergegeben. Gezeigt ist in (D) neben der Konservierung auch ein paarweiser Vergleich ausgewählter Spezies (*UCSC Genome Browser, Assembly July 2007 (mm9)*). (E) Annotierte ESTs der Maus lassen Genstruktur und Verwendung verschiedener Transkriptionsstartstellen erkennen.

Abgleich der BAC Endsequenzen mit dem Mausgenom konnten insgesamt 29 BACs aus den beiden Klonbanken RP23 und RP24 des Roswell Park Cancer Institute identifiziert werden, die im Bereich des Sox17 Locus liegen. Von 19 BACs war entweder nur die 5'- oder die 3'-Endsequenz bekannt, so dass eine genaue Lokalisierung nicht möglich war. Start oder Endposition mussten in diesen Fällen interpoliert werden. Der BAC RP24-254F17 enthält nur einen Teil der 5'-Sequenz des Transkriptionsfaktors. Die restlichen acht in Tabelle 3.1 aufgelisteten BACs überspannen den vollständigen Sox17 ORF. Ein weiteres Kriterium für die Auswahl eines BACs war die Länge des 5'-Bereichs stromaufwärts des Sox17 Gens, der die regulatorischen Sequenzen des Promotors beinhaltet. So konnte, trotz fehlender Kenntnis über die genaue regulatorische Struktur des Sox17 Promotors, eine möglichst Sox17-ähnliche Expression des DsRed Reporters erwartet werden - insbesondere auch dann, wenn der veränderte Sox17::DsRed BAC illegitim mit dem Genom der ES Zelle rekombinieren sollte. Die BACs 37D15 und 285G23 besitzen 5' der TSS etwa 119,51 kb respektive 51,14 kb zusätzliche genetische Information und erfüllten somit dieses Kriterium. Darüber hinaus sind die beiden BACs im Rahmen des Maus-Genom-Projektes vollständig sequenziert worden [9]. Die entsprechenden Stichkulturen wurden vom Deutschen Ressourcenzentrum in Berlin (RZPD) bezogen. Die Klonidentität wurde durch PCR mit Sox17-spezifischen Primern und Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt. Die Integrität der BACs wurde durch EcoRI Restriktionsverdau überprüft. Es konnten keinerlei größere Deletionen innerhalb der Konstrukte festgestellt werden (nicht gezeigt).

BAC-Klon	Start-Position -	End-Position	Insert-Größe
RP24-274C21	4.442.962 Mb –	4.671.376 Mb	228,414 kb
RP23-459F12	4.288.419 Mb -	4.490.940 Mb	202,521 kb
RP23-459C9	4.310.289 Mb –	4.490.981 Mb	180,692 kb
RP23-445L18	4.413.811 Mb –	4.594.062 Mb	180,251 kb
RP23-37D15	4.439.353 Mb –	4.606.640 Mb	167,287 kb
RP23-307O7	4.423.969 Mb –	4.603.941 Mb	179,972 kb
RP23-112I17	4.321.210 Mb –	4.536.982 Mb	215,772 kb
RP23-285G23	4.362.187 Mb –	4.538.578 Mb	176,391 kb
RP23-287E20	4.362.179 Mb –	4.537.000 Mb	174,821 kb

Tabelle 3.1: Kartierte *Sox17* **BAC Klone.** Aufgelistet sind Klone aus den Banken RP23 und RP24 des *Roswell Park Cancer Institute* [117], die im Bereich des murinen *Sox17* Locus auf Chromosom 1 kartieren. Start- und Endposition der BACs sind entsprechend der Annotierung von *ENSEMBL Mouse Assembly m37* angegeben. Die Größe der BACs in kb ist aus den angegebenen Start- und Endpositionen berechnet.

3.1.3 Klonierung der Reportergenkassetten

Ausgehend von dem Expressionsvektor pIRES2 eGFP wurden die Reportergenkassetten in Abbildung 3.2 A für die gezielte Veränderung ausgewählter BACs kloniert. Im ers-

ten Schritt wurde die eGFP Expressionskassette durch eine Puromycinresistenz (Puro^{*R*}) ausgetauscht. Die Puromycinresistenz wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Xmn*I und *Mfe*I aus dem Vektor pIRES puro3 (Abbildung 3.2 B) isoliert und in den ebenfalls mit *Xmn*I und *Mfe*I geschnittenen und dephosphorylierten pIRES2 Vektor mit T4 Ligase ligiert. Der modifizierte Vektor wurde anschließend transformiert. Klone wurden auf LB-Agar-Platten mit Kanamycin selektiert und durch Restriktionsverdau analysiert (Abbildung 3.2 A–C). Positive Klone wurden anschließend sequenziert.

Im zweiten Schritt wurde der offene Leserahmen von eGFP in die *Multiple Cloning Site* (MCS) des Vektors pIRES2 puro3 einkloniert. Der eGFP Leserahmen wurde dafür zunächst mittels PCR von pIRES2eGFP amplifiziert. Bei der Amplifizierung wurde über das 3'-Oligonukleotid ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) des Simian Virus 40 (SV40)



Abbildung 3.2: Klonierung der Reportergenkassetten. In der schematischen Darstellung der Vektoren pI-RES2 EGFP (A), pIRES puro3 (B) und pEGFP NLS IRES2 puro3 (C) sind die wichtigsten Strukturelemente der Vektoren, sowie die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen und deren Nukleotidpositionen eingezeichnet. (D) *Xmn*I und *Mfe*I Restriktionsverdau von pIRES2 eGFP und pIRES puro3; die Puro^R Kassette ist mit * gekennzeichnet. (E) Restriktionsverdau der Vektoren pEGFP IRES2 puro3 mit und ohne NLS; die eGFP Kassette ist mit schwarzer, die eGFP-NLS Kassette mit roter Pfeilspitze markiert. HEK-293 Zellen 24 h nach Transfektion mit eGFP (F, I), DsRed (G, J) und eCFP (H, K) Reportergenkassetten ohne NLS (F–H) und mit NLS Sequenz (I–K).

eingebracht [141–143], der endogene Translationsstopp ersetzt und eine *Xho*I Schnittstelle zwischen eGFP ORF und SV40 NLS eingefügt. Das resultierende PCR-Produkt wurde direktional über die in den Oligonukleotiden befindlichen Schnittstellen *Nhe*I und *Eco*RI in den Vektor einkloniert. Positive Klone wurden wiederum mittels Restriktion isolierter Plasmid-DNA identifiziert und durch Sequenzierung verifiziert. Durch eine zusätzliche *Xho*I Schnittstelle zwischen eGFP und SV40 NLS konnten in einem weiteren Schritt DsRedExpress und eCFP anstelle von eGFP in den Vektor einkloniert werden. Dazu wurden beide Reportergene mittels PCR amplifiziert. Auch hier wurden über die Primer die Restriktionsschnittstellen *Nhe*I und *Xho*I 5' bzw. 3' des Leserahmens eingeführt, um eine direktionale Klonierung der Gene in den Vektor zu ermöglichen. Darüber hinaus wurden zusätzliche Reportergenkassetten kloniert, die keine NLS besitzen.

Die Funktionalität der Reportergenkassetten wurde durch eine Transfektion der Plasmide in HEK239 Zellen verifiziert. Die CMV Promotor vermittelte Expression der fluoreszierenden Reporter eGFP, DsRedExpress und eCFP konnte 24 h nach Transfektion beobachtet werden. In den Abbildungen 3.2 F–H ist die Expression der Reportergene mit und in den Abbildungen 3.2 I–K ist die Expression ohne zusätzliche NLS dargestellt.

3.1.4 RedET Rekombination

Die DsRedExpress Reportergenkassette wurde durch RedET-Rekombination in den *Sox17* Locus integriert. Dazu wurde die Reportergenkassette zunächst mittels PCR amplifiziert. Über die PCR-Oligonukleotide wurden 50 bp lange Sequenzabschnitte an das 5′- und 3′-Ende des PCR-Produkts angefügt. Beide Sequenzabschnitte waren homolog zu Sequenzen des *Sox17* Locus auf den ausgewählten BACs. Dabei umfasste die 5′ homologe Sequenz das ATG Startcodon der HMG-Box kodierenden Spleißvariante (Position -50 bis 0). Die 3′ Homologie umfasste 50 bp an der Exon-Intron Grenze hinter dem *Sox17* Translationsstart (Position +178 bis +228, Abbildung 3.3 B). Nach erfolgreicher Rekombination liegt die kodierende Sequenz des Reportergens stromabwärts des ATG Startcodons der *Sox17* mRNA Spleißvariante, die das vollständige *Sox17* Genprodukt kodiert. Der übrige Genbereich des *Sox17* Locus bleibt intakt und das alternative Spleißen der zweiten *Sox17* mRNA Variante wird nicht beeinträchtigt.

Die Abbildung 3.3 A zeigt schematisch den experimentellen Ablauf der RedET-Rekombination in *E. coli*. Zunächst wurde das Plasmid pSC101 BAD-gbaA^{tet} in den *Sox17* BAC tragenden Bakterienstamm transfiziert. pSC101 BAD-gbaA^{tet} exprimiert unter der Regulation des Arabinose-induzierbaren Promotors alle für die Rekombination benötigten Enzyme: Red E und Red T des RAC Phagen spielen dabei für die Rekombination eine entscheidende Rolle, während das gam Protein des λ -Phagens die Degradierung des zu rekombinierenden PCR-Produktes durch das *recBCD* System von *E. coli* verhin-

dert. Durch die Expression des *recA* Gens ist die RedET-Rekombination zusätzlich auch in *recA* defizienten *E. coli* Stämmen möglich, da das DNA-Einzelstrang-bindende Protein RecA für die durch die Rekombination induzierten DNA Reparaturprozesse benötigt wird. Anschließend wurde nach Induktion der Proteinexpression durch L-Arabinose die amplifizierte DsRed Reportergenkassette in den rekombinationskompetenten *E. coli* Stamm transformiert. Positive Rekombinanten wurden auf LB-Agar-Platten mit Kanamycin und Chloramphenicol selektiert und durch Kolonie-PCR und Restriktionsverdau analysiert. Die Reportergenkassette ließ sich durch Amplifizierung eines 4,5 kb großen PCR-Produkts in Klonen nachweisen, die den rekombinierten *Sox17* Locus tragen (Abbildung 3.3 C). Positive Rekombinanten zeigten zudem ein verändertes Restriktionsprofil, welches durch eine zusätzliche *Xho*I Restriktionsschnittstelle innerhalb der Reportergen-



Abbildung 3.3: RedET-Rekombination in *E. coli*. (A) Ablauf des RedET-Rekombinationsexperiments. (B) Schematische Darstellung der *Sox17*::DsRed Reportergenkassette vor und nach Integration in den *Sox17* Locus durch RedET-Rekombination. (C) PCR und (D) Restriktionsverdau des modifizierten *Sox17* BACs RP23-37D15 nach Integration der Reportergenkassette. Der Wildtyp von *Sox17* (**) und die Reportergenkassette (*) zeigen unterschiedlich große PCR-Fragmente bei der Verwendung von flankierenden Primern, bzw. eine zusätzliche Bande (*) im *Xho*I Verdau. (E) Subklonierung des veränderten *Sox17* Gens in einen Amp^R-oriC-Minimalvektor. Das *Sox17*::DsRed Konstrukt (schwarze Pfeilspitzen) lässt sich nach *Pvu*I-Verdau vom Amp^R-oriC Minimalvektor (rote Pfeilspitze) aufreinigen.

kassette hervorgerufen wurde (Abbildung 3.3 D). Die Integrationsstellen der Reportergenkassette in den *Sox17* Locus des BACs wurden schließlich sequenziert.

Aufgrund der Größe des Sox17 BACs von >167 kb eignete sich das so dargestellte Sox17::DsRed Konstrukt nicht für die homologe Rekombination in ES Zellen. In einem nächsten Schritt wurde daher der Sox17 Locus durch RedET-Rekombination subkloniert. Dabei wurde darauf geachtet, dass 3' und 5' des modifizierten Sox17 Locus mindestes 3 kb lange Sequenzen für die homologe Rekombination in ES Zellen erhalten blieben, da die Effizienz der Rekombination mit der Länge der Endsequenzen steigt. Die Subklonierung durch RedET-Rekombination ähnelt der Integration einer Genkassette. Im ersten Schritt wurde ein Minimalvektor bestehend aus Amp^R und p15A-oriC amplifiziert. Die PCR Oligonukleotide besaßen auch hier 50 bp Mikrohomologien zum Sox17 BAC, nur diesmal in invertierter Orientierung, so dass es bei der folgenden Rekombination des Amp^R-oriC-Minimalvektors nicht zu einer Integration, sondern zu einer "Cut&Paste" Reaktion des von den homologen Sequenzen eingeschlossenen Bereichs des Sox17 BACs kommen konnte. Positive Amp^R/Kan^R Subklone wurden wiederum durch PCR und Restriktionsverdau identifiziert. Durch zusätzlich in die PCR Oligonukleotide eingefügte PvuI Restriktionsschnittstellen, die den Amp^R-oriC-Minimalvektor flankieren, konnte die Sox17::DsRed Reportergenkassette direkt aus dem Vektor isoliert und aufgereinigt werden.

3.1.5 Homologe Rekombination in ES Zellen

Zur Herstellung der *Sox17*::DsRed ES Zelllinie wurde zunächst die Reportergenkassette, flankiert von 5' und 3' Sequenzen des *Sox17* Locus, aus dem Amp^{*R*}-p15A-oriC Minimalvektor isoliert. Dazu wurden 15 μ g des Plasmids mit dem Restriktionsenzym *Pvu*I verdaut und die beiden resultierenden Fragmente von 2,045 kb und 19,682 kb in einem 0,8%igem Agarosegel elektrophoretisch voneinander getrennt. Die Bande des 19,682 kb großen *Sox17* Targeting-Konstrukts wurde aus dem Gel herausgeschnitten, die DNA aus der Agarose extrahiert und aufgereinigt (Abbildung 3.3 D). Insgesamt wurden zweimal 1x10⁷ subkonfluent gewachsener CGR8 ES Zellen mit je 10 μ g des Konstrukts durch Elek-

Zellzahl CGR8 ES	Can ^R Zallan		Analyse Southern-Blot	
	Gen Zellen	Klone analysiert	homolog rekombiniert	in %
2x10 ⁷	> 600	524	2	0,4

Tabelle 3.2: Homologe Rekombination des *Sox17::***DsRed Reporters in CGR8 ES Zellen.** Zellzahl CGR8 ES gibt die Zahl transfizierter ES Zellen an. Die Zahl Geneticin-resistenter ES Zellkolonien ist eine Abschätzung nach Zählung der ES Zellkolonien einer Zellkulturschale.

troporation transfiziert. ES Zellen, die das rekombinante DNA Fragment stabil in ihr Genom integrierten, bildeten acht Tage nach Selektion mit Geneticin unter dem Stereomikroskop bei 10facher Gesamtvergrößerung sichtbare Stammzellkolonien. Insgesamt 576 Geneticin resistente (Gen^{*R*}) Kolonien, hervorgegangen aus zwei Transfektionen, wurden isoliert und klonal in Zellkulturplatten expandiert. Von allen Klonen wurden Aliquots kryokonserviert, aus einem Teil der ES Zellklone wurde die genomische DNA zur Ana-



Abbildung 3.4: Homologe Rekombination in ES Zellen. (A) Schematische Übersicht über die homologe Rekombination des *Sox17*::DsRed Konstrukts in CGR8 ES Zellen. Im *PvuI* prozessierten Konstrukt wird die Reportergenkassette 5' und 3' durch 9,6 kb bzw. 5,5 kb lange Sequenzen homolog zum *Sox17* Locus eingeschlossen. (B) Southern-Blot zur Identifizierung homolog rekombinierter ES Zellklone. (C) Bestätigung der Integration der Reportergenkassette durch PCR mit den Oligonukleotiden P1 und P2 für das *Sox17* Wildtypallel bzw. P1 und P3 für die Reportergenkassette.

lyse auf homologe Rekombination des Konstrukts innerhalb des endogenen Sox17 Locus isoliert. Aus 91% der gepickten Kolonien ließ sich für die Analyse mittels Southern-Blot ausreichend genomische DNA isolieren (Tabelle 3.2).

Einen Überblick über die Southern-Blot Strategie gibt die Abbildung 3.4 A. Spel Restriktionsverdau erzeugt im Sox17 Wildtypallel ein DNA Fragment mit der Größe von 17,1 kb. Homologe Rekombination eines Sox17 Allels mit dem Konstrukt führt dazu, dass das durch Spel Restriktionsverdau erzeugte Fragment 4,4 kb größer ist als das entsprechende Fragment des Sox17 Wildtyps. Beide Fragmente werden mit einer α -CTP radioaktiv markierten Sonde auf der Membran markiert und ermöglichen somit eine Identifizierung des Rekombinationsereignisses. Illegitime Rekombinationen, also die zufällige, ungerichtete Integration des Konstrukts in einen anderen Bereich des Mausgenoms außerhalb des Sox17 Locus, werden nicht durch die Sonde erkannt, da die Sonde keine Homologie zu DNA Sequenzen innerhalb des Konstrukts aufweist. Unter den 524 analysierten resistenten ES Zellklonen konnten zwei homologe Rekombinationsereignisse nachgewiesen werden, die im Weiteren die Bezeichnung D8 und D11 erhielten. Damit ergab sich eine Frequenz der homologen Rekombination von 0,4%. Nachdem die identifizierten ES Zellklone expandiert und weitere Aliquots kryokonserviert waren, wurde das Southern-Blot Ergebnis nochmals bestätigt (Abbildung 3.4 B). Der Southern-Blot zeigt eine deutliche Bande bei 17,1 kb für Wildtyp CGR8 ES Zellen. Homologe Rekombination bei den Klonen D8 und D11 lässt sich an der zusätzlichen 21,5 kb großen Bande erkennen. Eine zusätzlich Bestätigung durch PCR mit den Primerpaaren P1/P2 und P1/P3 unterscheidet Wildtyp und rekombinanten ES Zellklon (Abbildung 3.4C). Der Karyotyp der Sox17:DsRed ES Zellklone D8 und D11 wurde bestimmt und es wurden keine Abweichungen vom normalen 40,XY Chromosomensatz gefunden. (Abbildung 3.5 B).

3.1.6 Endodermale Differenzierung

3.1.6.1 Spontane ES Zell Differenzierung nach Entfernung von LIF

Die *Sox17*::DsRed ES Zellklone D8 und D11 wurden in Zellkulturschalen zunächst in Anwesenheit von 1000 U/ml LIF kultiviert, so dass Pluripotenz und Selbsterneuerung der Zellen erhalten blieben. Das Aussehen der Zellen beider Klone unter lichtmikroskopischer Vergrößerung entsprach einer für die verwendete CGR8 ES Zelllinie unter diesen Bedingungen typischen Morphologie: die ES Zellen bildeten spätestens zwei Tage nach der Aussaat runde Kolonien von wenigen hundert Zellen mit einem scharf abgegrenzten Rand. Zellgrenzen innerhalb der Kolonie ließen sich nicht deutlich erkennen. Spontane Differenzierung der ES Zellklone wurde durch LIF-Entzug induziert. Die Zellen wurden anschließend über weitere vier Passagen bis zu zehn Tage ohne LIF kultiviert. Wäh-



Abbildung 3.5: Spontane Differenzierung nach LIF-Entzug. (A) Veränderung der Zellmorphologie bei spontaner ES Zell Differenzierung der Klone *Sox17*::DsRed D8 und D11 nach LIF Entzug. Mikroskopische Aufnahmen wurden nach 4 Passagen von ES Zellkulturen mit 1000 U/ml LIF (+LIF) und ohne LIF (-LIF) angefertigt. (B) Karyotypen der Klone *Sox17*::DsRed D8 und D11 zeigen keine größeren Aberrationen und mit einem Karyotyp von 40,XY keinen Verlust einzelner Chromosomen. Die mikroskopischen Aufnahmen sind repräsentativ für insgesamt 10 ausgezählte Metaphasen pro Klon.

rend dieser Zeit fand eine Veränderung der Zellmorphologie statt: die differenzierenden Zellen bildeten keine scharf abgegrenzten Kolonien mehr, die Zellkörper flachten zunehmend ab und Zellgrenzen traten deutlich hervor. Die Zahl der Zellen mit typischer ES Zellmorphologie nahm ab, während die Zahl Fibroblasten-ähnlicher Zellen zunahm (Abbildung 3.5 A). Beobachtung der spontan differenzierten Zellen zwischen Tag 4 und Tag 10 nach LIF Entzug unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte aber keinerlei Expression des unter der Kontrolle des *Sox17* Promotors stehenden DsRed Reportergens. RT-PCR mit *Sox17* und DsRed-spezifischen Primern deutete auf eine sehr schwache Expression von *Sox17* und von DsRed hin (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt lässt dieses Ergebnis vermuten, dass die spontane Differenzierung von ES Zellen durch LIF Entzug (*i*) nicht hinreichend ist, um genügend differenzierte endodermale Zellen zu generieren und (*ii*), dass das Expressionsniveau des Reporters unter den gewählten Bedingungen nicht ausreichend ist, um ein detektierbares Fluoreszenzsignal zu erzeugen.

3.1.6.2 Differenzierung durch ES Zell-Aggregation in Embryo-ähnliche Strukturen — *Embryoid Body* Differenzierung

Die Sox17::DsRed ES Zelllinien D8 und D11 wurden zu Embryoid Bodies (EBs) differenziert. In der Literatur sind verschiedene Methoden der EB Differenzierung beschrieben [144]. Während dieser Arbeit wurden zwei dieser Methoden verwendet, (i) Differenzierung der EBs in Suspension [145] und (ii) Differenzierung im "hängenden Tropfen" [131]. Die erste Methode basiert auf der Bildung von EBs ausgehend von kleinen ES Zellaggregaten nach unvollständiger Dissoziation mit Trypsin/EDTA in nicht-adhäsiven, bakteriologischen Kulturschalen. Im Gegensatz dazu startet die Methode des "hängenden Tropfens" mit einer definierten Anzahl von vollständig dissoziierten ES Zellen in einem definierten Volumen eines Tropfen Zellkulturmediums, der an den Deckel einer Zellkulturschale haften bleibt. Nach Absinken der Zellen an den Meniskus des Tropfen kommt es zur Aggregation der Zellen und damit zur Bildung eines EBs pro Tropfen. Ein Vorteil der arbeitsintensiven Methode des "hängenden Tropfens" ist die Homogenität der gebildeten EBs in Größe und Form. Die Sox17-spezifische Expression des Reportergens wurde durch semi-quantitative und quantitative RT-PCR, Durchflußcytometrie sowie Fluoreszenzmikroskopie nach EB Differenzierung in regelmäßigen Zeitintervallen untersucht (Abbildung 3.6 A–C).

Semi-quantitative und quantitative RT-PCR Analysen von DsRed, Sox17 sowie zusätzlichen Endoderm- und Stammzellmarkern zeigten ein charakteristisches Expressionsprofil EB-differenzierter Zellen. Während die mRNA der Stammzellmarker Oct4 und Nanog im zeitlichen Verlauf der EB Differenzierung abnimmt und damit den Verlust von Pluripotenz und der Kapazität der Selbsterneuerung anzeigt, konnte die Expression endodermaler, mesodermaler und in einem geringeren Umfang auch ektodermaler Markergene nachgewiesen werden, d.h. die EBs haben das Potential alle drei Keimbahnblätter hervorzubringen (Abbildung 3.6 D und Daten nicht gezeigt). Die Expression von Sox17 und DsRed Transkripten startet an Tag 3 nach Beginn der EB Differenzierung, erreicht ein Maximum an Tag 4 und fällt anschließend beginnend von Tag 5 bis Tag 8 langsam ab. DsRed Fluoreszenz im EB ließ sich an Tag 4 erstmals nachweisen und nahm im Verlauf der Zeit bis Tag 8 zu. Während Sox17::DsRed⁺ Zellen zunächst eine zufällige Verteilung innerhalb des EBs zeigten, bedeckten die DsRed-exprimierenden Zellen nach acht Tagen die gesamte Oberfläche des EBs und bildeten eine Epithel-ähnliche Zellschicht zu späteren Zeitpunkten (Abbildung 3.6 A). Die Lokalisation der DsRed-exprimierenden Zellen entsprach damit den visceralen Endoderm-ähnlichen Zellen auf der EB Oberfläche, wie sie in der Literatur beschrieben wird [107, 146]. Darüber hinaus konnten auch innerhalb der EBs kleine Ansammlungen DsRed⁺ Zellen beobachtet werden. DsRed⁺ Zellen wurden während des EB Wachstums durch Durchflußcytometrie quantifiziert. Das

Reportergen war entsprechend des Ergebnisses der Fluoreszenzmikroskopie zuerst an Tag 4 nachweisbar. Die Verzögerung von 12 h bis 24 h zwischen dem ersten Nachweis der DsRed mRNA und dem fluoreszenten Protein lässt sich durch die Phasenverschiebung zwischen Transkription, Translation und der Bildung des aktiven fluoreszierenden Proteins erklären. Darüber hinaus zeigte das DsRed Protein aufgrund seiner hohen Stabilität eine geringere Abbaurate als sein Transkript und akkumulierte in den endoder-



Abbildung 3.6: EB Differenzierung von *Sox17::***DsRed ES Zellen.** (A) Fluoreszenz-Mikroskopie von EBs an Tag 1–8; obere Reihe Hellfeld, untere Reihe DsRed-Filtersatz und Fluoreszenz-Beleuchtung; der Maßstabsbalken entspricht 50μ m. (B, C) Bestimmung des Anteils DsRed-positiver Zellen (in %) im EB mittels FACS. (D) Expressionsanalyse von DsRed und anderen Markergenen mittels qPCR während der EB Differenzierung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von je drei Replikaten.

malen *Sox17*-positiven Zelltypen innerhalb der EBs. Daher markiert der DsRed Reporter nicht nur transient *Sox17*-exprimierende Zellen, sondern auch die endodermalen Zellen während des fortschreitenden Differenzierungsprozesses. Interessanterweise konnte die vom *Sox17* Promotor abhängige DsRed Expression durch Fluoreszenzmikroskopie und Durchflußcytometrie nur dann in EBs in ausreichendem Maße nachgewiesen werden, wenn die EBs im "hängenden Tropfen" gebildet wurden. DsRed Expression konnte also aufgrund zu geringer *Sox17* Promotoraktivität weder durch LIF Entfernung (Abschnitt 3.1.6.1) noch durch EB Differenzierung direkt in Suspension (Suspensionsprotokoll) nachgewiesen werden. Um die direkte Abhängigkeit der DsRed Expression vom *Sox17* Promotor und dessen regulatorischen Elementen nachzuweisen und um zu beweisen, dass nicht-endodermale *Sox17*::DsRed⁻ Zellen kein DsRed bilden, wurden mRNA Transkripte von FACS-isolierten *Sox17*::DsRed⁺ und *Sox17*::DsRed⁻ Zellpopulationen mit RT-PCR nachgewiesen (Abschnitt 3.3.1).

3.2 Die Expression des DsRed Reportergens in vivo

3.2.1 Herstellung der Mauslinie Sox17^{tm1(DsRed)Tbnl}

Für die Herstellung einer transgen Mauslinie, die das DsRed Reportergen unter der Kontrolle der regulatorischen Elemente des *Sox17* Promotors exprimiert, wurde das in Abschnitt 3.1.4 beschriebene Konstrukt in F1 Stammzellen transfiziert. Diese ES Zelllinie wurde aus der Kreuzung der Mauslinien C57BL/6 und 129/Sv gewonnen und zeichnet sich, verglichen mit der zuvor beschriebenen CGR8 Linie, durch höhere Keimbahntransmissionsraten aus. Nach wiederholter Transfektion von $1x10^7$ Zellen mit je 10 μ g DNA des DsRed-Konstrukts konnten insgesamt 600 Geneticin-resistente ES Zellklone isoliert werden. Nach Southern-Blot konnte in drei Klonen die homologe Rekombination der DsRed Reportergenkassette im Sox17 Locus nachgewiesen werden, was einer Rekombinationseffizienz von 0,5% entspricht (Tabelle 3.3).

Zellzahl	Can ^R Zallan		Analyse Southern-Blot	
	Gen Zellen	Klone analysiert	homolog rekombiniert	in %
2x10 ⁷	> 750	576	3	0,5

Tabelle 3.3: Homologe Rekombination des *Sox17::***DsRed Reporters in C57BL/6 x 129/Sv F1 ES Zellen.** Die Zellzahl gibt die Zahl transfizierter ES Zellen an. Die Zahl Geneticin-resistenter ES Zellkolonien ist eine Abschätzung nach Zählung der ES Zellkolonien einer einzelnen Zellkulturschale.

Durch FACS und Fluoreszenzmikroskopie konnte nach EB Differenzierung die Expression des DsRed Reporters in der C57BL/6 x 129/Sv abgeleiteten Stammzelllinie nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nach der Injektion von zwei Klonen in C57BL/6 Blastozysten konnten insgesamt drei männliche chimäre Mäuse erzeugt werden, die sich auf den ES Zellklon B6 zurückführen ließen. Ein Tier zeigte dabei etwa 50% Chimärismus, während die anderen zwei Tiere über 95% Fellfarbenchimärität aufwiesen und weiter verwendet wurden. Keimbahntransmission konnte nach Kreuzung der zwei Chimären mit C57BL/6 in 15 von 33 Nachkommen (46%) nachgewiesen werden (Tabelle 3.4).

Stommzolllinia	Blastozysten injiziert	Chimäron	Keimbahntransmission	
		Chimaren	ď	ę
<i>Sox17</i> -F1-H5	—	_	_	-
		312-0214 (50%)	nicht weite	rverpaart
Sox17-F1-B6	42	312-0215 (≥95%)	6/10 (60%)	3/9 (33%)
		312-0216 (≥95%)	3/5 (60%)	3/9 (33%)
<i>Sox17</i> -F1-H6	37	_	_	-

Tabelle 3.4: Tabellarische Übersicht über *Sox17::Ds***Red ES Zelllinien und der daraus hervorgegangenen Mauslinie** *Sox17*^{tm1(DsRed)Tbnl}. Der Grad des Chimärismus wurde über die Fellfarbe der Tiere abgeschätzt und ist in (%) hinter der jeweiligen Identifikationsnummer des chimären Tiers angegeben. Die Anzahl der Mäuse mit nachgewiesener Keimbahntransmission wurde als Quotient "Anzahl nachgewiesener Keimbahntransmissionen" / "Gesamtzahl geborener Nachkommen" für weibliche (Q) und männliche (d) Tiere getrennt angegeben.

3.2.2 Analyse der *Sox17*^{tm1(DsRed)Tbnl} Mauslinie

3.2.2.1 Gewebespezifische Expression des Sox17::DsRed Reporters

Männliche *Sox17^{DsRed/+}* Tiere wurden mit NMRI Tieren verpaart. Die Bildung des vaginalen Plugs wurde als Tag E 0,5 definiert. Schwangere Weibchen wurden zwischen E 5,5 und E 8,5 getötet und die Embryonen präpariert. Insgesamt waren 43% der Embryonen heterozygot für den DsRed Reporter und wurden für die Analysen am Fluoreszenzmikroskop und für *whole-mount in situ* Hybridisierung mit einer *Sox17-* und einer DsRedspezifischen RNA Sonde verwendet. *In situ* Hybridisierung einer DsRed-spezifischen Sonde weist die Expression des Reportergens im endodermalen Gewebe nach (Abbildung 3.8 A und B). Im Embryonalstadium 7,0 p.c. lässt sich die DsRed mRNA im VE und im entstehenden DE im anterioren Bereich des Embryos finden (Abbildung 3.7 A). Im Tag 8,5 p.c. alten Embryo lassen sich DsRed Transkripte im Epithel des embryonalen Enddarms und in der Enddarmtasche nachweisen (Abbildung 3.7 B). Das Ergebnis der *in situ* Hybridisierung mit einer DsRed-spezifischen Sonde entspricht damit dem *Sox17* Expressionsmuster im endodermalen Gewebe [84]. An E7,5–E8,0 kann man deutlich die Expression des DsRed Reporters im Bereich um die primitive Furche beobachten (Abbildung 3.7 C–F). Dabei ist die Expression des Reporters nur in epithelialen Zellen des Embryos zu beobachten, während Zellen innerhalb der primitiven Furche keine Expression des Reporters zeigen. Die Lage der DsRed⁺ Zellen entspricht den Zellen, die während der Gastrulation durch die primitive Furche wandern und das endodermale Keimblatt des Embryos bilden. Die Expression des Reportergens ist *in vivo* also auf endodermale Zellen des Embryos beschränkt.



Abbildung 3.7: Expression des *Sox17::***DsRed Transgens während der Embryogenese** (A, B) *In situ* Hybridisierung einer DsRed-spezifischen Sonde zeigt die Endoderm-assoziierte Expression des Transgens in 7,0 p.c. und 8,5 p.c alten *Sox17^{DsRed/+}* Embryonen. (C–F) Direkte Visualisierung der DsRed Fluoreszenz im Endoderm von 7,5 p.c. und 8,0 p.c alten *Sox17^{DsRed/+}* Embryonen. Gezeigt sind je zwei unterschiedliche optische Schnitte durch die Embryonen (epc, ektoplazentaler Konus; al, Allantois; ac, amniotischer Hohlraum).

3.2.2.2 Phänotypen heterozygoter und homozygoter Mäuse

Die verwendete DsRed Reportergenkassette wurde homolog in den *Sox17* Locus integriert, wobei das endogene ATG Startcodon in Exon 2 des *Sox17* Gens den Translationstart des DsRed Reporters markiert. Damit ist DsRed nicht nur ein Indikator für die Expression des *Sox17* Gens, sondern führt auch zur Deletion des Exons 4 von *Sox17* und

zur Bildung eines Nullallels. *Sox17^{DsRed/+}* heterozygote Tiere sind in ihrer Embryonalentwicklung normal und fertil. *Sox17^{DsRed/+}* Tiere wurden untereinander verpaart und die homozygoten *Sox17^{DsRed/DsRed}* Nachkommen wurden analysiert. *Sox17^{DsRed/DsRed}* Embryonen konnten bis Tag 10,5 p.c. der Embryonalentwicklung isoliert werden (Tabelle 3.5). In den frühen *Sox17^{DsRed/DsRed}* Embryonen ist die Entwicklung des DEs gestört und die Bildung des embryonalen Darms defekt, während die Bildung von VE und PE nicht beeinträchtigt wird. Die anatomische Begutachtung der *Sox17^{DsRed/DsRed}* Embryonen zeigt keine offensichtlichen Defekte in der Embryonalentwicklung bis zur Bildung



Abbildung 3.8: *Sox17*^{DsRed/DsRed} **knock-out Phänotyp.** (A) Integration der DsRed Reportergenkassette in den *Sox17* Locus führt zur Zerstörung des Allels. Mit Hilfe der Primerpaare P1/P2 und P1/P3 lassen sich Wildtyp und *Sox17* Nullallel voneinander unterscheiden. (B) PCR Ergebnisse für die Typisierung von Wildtyp (+/+), homozygoten (DsRed/DsRed) und heterozygoten (DsRed/+) Mausembryonen. (C) Phänotypen des *Sox17*^{DsRed/DsRed} knock-out im Stadium E9,5. Der *Sox17*^{DsRed/DsRed} Embryo zeigt Wachstumsretardierung und ein Fehlen der Rotation (Pfeil) um die Körperhauptachse.

der erster Somiten an Tag 8,25 p.c. Ab Tag 8.5 p.c und später lassen sich $Sox17^{DsRed/DsRed}$ von $Sox17^{DsRed/+}$ Embryonen durch das Fehlen der Rotation der Körperhauptachse (Pfeil in Abbildung 3.8 C) und durch Wachstumsretardierung unterscheiden. Die Entwicklung von Strukturen wie Neuralrohr, optische Evagination, otisches Vesikel, Branchialbögen und Herztubus sind normal bis Tag 9,5 p.c. Das Wachstum und die Morphogenese des posterior gelegenen Rumpfes ist hingegen ab Tag 9,5 p.c. stark beeinträchtigt. Damit entspricht der knock-out Phänotyp der $Sox17^{tm1(DsRed)Tbnl}$ Linie dem Phänotyp des von Kanai-Azuma *et al.* beschriebenen Sox17 knock-outs [84] und ist ein weiterer Hinweis auf die Endoderm-spezifische Expression des DsRed Reportergens.

Vorpaarung	Gesamtzahl	Embryonalstadien			E1 Constation
verpaarung	der Tiere	8,5 p.c.	9,5 p.c.	10,5 p.c.	I I Generation
${Sox17^{DsRed/+} \times Sox17^{DsRed/+}}$ wt x Sox17^{DsRed/+}	68 85	6/25 (24%) 	4/17 (23%)	2/11 (18%)	(5/10/0) (43/42/-)

Tabelle 3.5: Mendel-Vererbung des *Sox17::DsRed Allels.* Angegeben ist die Gesamtzahl der untersuchten Nachkommen. Für die Verpaarung *Sox17^{DsRed/+}* x *Sox17^{DsRed/+}* sind nur die Ergebnisse der homozygoten Sox17^{DsRed/DsRed} Embryonalstadien 8,5 p.c., 9,5 p.c. und 10,5 p.c. in der Form (*Sox17^{DsRed/DsRed}*/Gesamtzahl) angegeben. Das Mendel-Verhältnis der Embryonalstadien aus der Verpaarung von wt x *Sox17^{DsRed/+}* wurde nicht bestimmt. Für die F1 Generation wurde die Zahl der Nachkommen in der Form (wt/*Sox17^{DsRed/+}/Sox17^{DsRed/+}/Sox17^{DsRed/-DsRed}*) angegeben.

3.3 Analyse des Transkriptoms von *Sox17*::DsRed-positiven Zellen

Das Transkriptom *Sox17*-exprimierender, endodermaler Vorläuferzellen wurde mit Hilfe von Affymetrix-Expressionsanalysen aufgeklärt. Dazu wurden pro biologischem Replikat zunächst 3-5x10⁶ *Sox17*::DsRed ES Zellen zu EBs differenziert. Nach achttägiger Differenzierung konnten die *Sox17*-exprimierenden Zellen anhand des Reporterproteins DsRed durch FACS isoliert werden.

3.3.1 Isolierung Sox17::DsRed-exprimierender Zellpopulationen durch FACS

Acht Tage alte EBs wurden vorsichtig in Accutase dissoziiert und durch ein Zellsieb gefiltert. Da ein Teil der Zellen durch die Dissoziation stirbt und auch apoptotische Zellen in den EBs vorhanden sind, wurde vor der FACS Sortierung der DsRed-exprimierenden Zellen eine diskontinuierliche Ficoll-Dichtegradientzentrifugation durchgeführt, um diese toten Zellen zu entfernen. Dies war wichtig, da die toten und apoptotischen Zellen eine DsRed-ähnliche Autofluoreszenz aufweisen und es dadurch, wie Testexperimente zeig-

ten, zu einer schlechten Trennung von DsRed-positiven und -negativen Zellen kommt. In drei biologischen Replikaten wurden insgesamt je 1×10^8 differenzierte *Sox17*::DsRed ES Zellen in DsRed-positive und -negative Zellen sortiert. Die Frequenz DsRed-positiver Zellen lag zwischen 8,0% und 10,0% der sortierten Gesamtpopulation. 40%–50% der Zellen entsprachen nicht dem streng angelegten Vorwärts-/Seitwärtsgatter-Kriterium und wurden keiner sortierten Fraktion zugeordnet und damit ausgeschlossen. Die Analyse der FACS-sortierten Zellpopulationen zeigt die erfolgreiche Anreicherung der DsRednegativen (3.9 A 2) und der DsRed-positiven (3.9 A 3) Zellpopulation verglichen mit der nicht sortierten Eingangspopulation (3.9 A 1). Die DsRed-negativen Zellen zeigten eine Anreicherung von 98,1%, die DsRed-positiven Zellen konnten von einer Frequenz von etwa 4,1% vor Sortierung auf einen Anteil von 90,5% nach FACS angereichert werden. Dies entsprach einem Faktor 20. Danach wurde die Gesamt-RNA von undifferenzierten *Sox17*::DsRed ES Zellen sowie von den angereicherten DsRed-positiven und -negativen



Abbildung 3.9: FACS Sortierung der *Sox17*::DsRed ES Zelllinie nach achttägiger EB Differenzierung. (A) FACS Analyse der Zellpopulationen DsRed⁺ und DsRed⁻ vor und nach der Sortierung. Die Reinheit der DsRed⁺ Zellpopulation betrug 90,5%, während die der DsRed⁻ Fraktion bei 98,1% lag. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für drei biologische Replikate. (B) Semi-quantitative RT-PCR zur Analyse der Expression der Stammzellmarker *Oct4*, *Nanog* und *Sox2*, der endodermalen Marker *Sox17*, *Hnf4*, *Afp*, *CollagenIV* und *Foxa2*, sowie des knock-in DsRed in den drei isolierten Zellpopulationen ES undifferenziert, DsRed⁺ und DsRed⁻. (C) qPCR für die Marker Oct4, Nanog, Sox17 und DsRed in den drei Zellfraktionen (n = 3, biologische Replikate).

Zellpopulationen mit TRIzol extrahiert. Kontaminationen von genomischer DNA wurden durch DNase I-Verdau entfernt. Anschließend wurde die RNA nochmals über eine Affinitätssäule aufgereinigt. Die Integrität und Konzentration der RNA wurde durch elektrophoretische Auftrennung auf einem RNA 6000 Nano Chip kontrolliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Als Maß für die Qualität isolierter totaler RNA wurde der Quotient aus den Konzentrationen der ribosomalen 28S und 18S rRNA sowie eine von Schröder *et al.* eingeführte *RNA integrity number* (RIN) herangezogen [147,148]. Der Quotient 28S/18S rRNA sollte bei 2,0 (\pm 0,3) liegen, während eine RIN \geq 9,0 für hohe Qualität und geringe RNA Degradation gewertet wurde.

n	Probe	c[RNA]	rRNA [28S/18S]	RIN
	ES undifferenziert	3809 ng/µl	1,8	9,9
1	DsRed (+)	298 ng/µl	1,9	9,6
	DsRed (-)	1527 ng/µl	1,8	9,9
	ES undifferenziert	3285 ng/µl	1,7	9,6
2	DsRed (+)	769 ng/μl	2,0	9,8
	DsRed (-)	1853 ng/µl	1,8	10,0
	ES undifferenziert	1118 ng/µl	1,8	9,5
3	DsRed (+)	251 ng/µl	1,9	9,1
	DsRed (-)	584 ng/µl	2,1	9,3

Tabelle 3.6: Bestimmung von Konzentration und Integrität isolierter RNA für die Transkriptomanalyse endodermaler Sox17-positiver Vorläuferzellen. Die Konzentration c[RNA] ist in ng/ μ l angegeben. n, biologisches Replikat; RIN, *RNA integrity number*.

Die semi-quantitative PCR zeigt eine deutliche Reduktion der mRNA Expression der Stammzellmarker *Oct4, Nanog* und *Sox2* in der DsRed⁺ Zellpopulation verglichen zu undifferenzierten *Sox17*::DsRed ES Zellen (Abbildung 3.9 B). Auch eine geringere Expression aller drei Stammzellmarker in der DsRed⁻ Zellpopulation wäre zu erwarten, da es sich auch hierbei um differenzierte Zellen handelt, wenn auch um eine an *Sox17*-exprimierenden Zellen verarmte Population. Eine Reduktion der Stammzellmarker mRNA lässt sich jedoch in der DsRed⁻ Fraktion nur im Fall von *Sox2* deutlich beobachten. Eine Verminderung der *Oct4* und *Nanog* mRNA in DsRed-negativen Zellen lässt sich entgegen der Erwartung mit semi-quantitativer RT-PCR nicht eindeutig nachweisen. Die Analyse der *Oct4* und *Nanog* Expression durch qPCR konnte aber zeigen, dass auch in der negativen Population eine Reduktion der Expression zu beobachten war (Abbildung 3.9 C).

3.3.2 Affymetrix-Analysen der Sox17::DsRed ES Zelllinie

Für die Affymetrix-Analysen endodermal differenzierter Zellen wurden RNAs von undifferenzierten *Sox17*::DsRed ES Zellen sowie von FACS isolierten *Sox17*::DsRed-

positiven und -negativen Zellen nach EB Differenzierung eingesetzt. Die Hybridisierung der RNA auf *Mouse Genome 430 2.0 Arrays*, sowie die Normalisierung der Daten und die (Tabelle 3.8) wurden im Rahmen des europäischen Verbundprojektes *Functional Genomics in engineered ES cells (FunGenES)* von der Arbeitsgruppe Prof. N. Hübner am Max-Delbrück-Zentrum, Berlin, als Service übernommen. Die *Mouse Genome 430 2.0 Arrays* decken mit 45 101 Probesets insgesamt mehr als 39 000 Transkripte und Varianten von über 34 000 charakterisierten Mausgenen ab. Dabei ist jedes Probeset durch 11 *in situ* synthetisierte Oligonukleotide, einschließlich sogenannter *perfect match* und *mismatch* Sonden, auf dem Array repräsentiert. Die Oligonukleotide der Probesets wurden entsprechend der Sequenzen aus GenBank, dbEST und RefSeq ausgewählt. Die Eigenschaften der Affymetrix-Arrays sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Anzahl der Felder pro Array	1
Anzahl der Probesets	> 45 000
Feldgröße	11 μm
Länge der Oligonukleotide	25-mer
Oligopaare/Sequenz	11
Kontrollsequenzen auf dem Arra	ay:
Hybridisierungskontrollen	bioB, bioC, bioD und cre
Poly-A Kontrollen	dap, lys, phe und thr
Normalisierungskontrollen	100 Probesets
<i>Housekeeping-</i> /Kontrollgene	Gapdh, β -Actin, Transferrin Rezeptor, Pyruvatcarboxylase

Tabelle 3.7: Eigenschaften der Mouse Genome 430 2.0 Arrays. Die Sensitivität der Arrays ist vom Hersteller mit 1:100 000 angegeben und wurde gemessen mit markierten Maus cDNAs vor einem komplexen DNA Hintergrund.

3.3.2.1 Vergleich der Affymetrix-Daten und quantitativer PCR

Zur Verifizierung der Affymetrix-Daten wurden die relativen Expressionen des endodermalen Markers *Sox17*, der Stammzellmarker *Oct4* und *Nanog* sowie des mesodermalen Markers Brachyury mit den Ergebnissen quantitativer PCR (qPCR) verglichen (Abbildung 3.10). Sowohl im Affymetrix-Datensatz als auch in der qPCR nimmt die relative Expression der Stammzellmarker *Oct4* und *Nanog* während der achttägigen EB Differenzierung ab. Die Expression der Stammzellmarker ist in der *Sox17*::DsRed⁺ Population niedriger als in der *Sox17*::DsRed⁻ Population. Die *Sox17* Expression ist im Vergleich zur *Sox17*::DsRed⁺ Population in undifferenzierten ES Zellen und in *Sox17*::DsRed⁻ Zellen deutlich verringert (> 80%). Das umgekehrte Bild ergibt sich für den mesodermalen Marker Brachyury, der in der *Sox17*::DsRed⁻ Population maximal exprimiert ist. Zusammengefaßt kann man somit sagen, dass die relativen Expressionsniveaus der untersuchten



Markergene im Affymetrix-Datensatz durch die Ergebnisse der qPCR bestätigt werden konnten.

Abbildung 3.10: Vergleich von Affymetrix-Array Daten mit Ergebnissen von quantitativer PCR ausgewählter Stammzell- und Differenzierungsmarker. Die Änderung der Expression der Marker Oct4, Nanog, Sox17 und Brachyury wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ Methode berechnet [127]. Die resultierenden Expressionsänderungen sind prozentual zur maximalen Expression (100%) für das jeweilige Gen innerhalb eines Experiments als geometrische Mittel \pm Standardabweichung dargestellt (n = 3, biologische Replikate).

3.3.2.2 Expression typischer Marker in isolierten Sox17::DsRed ES Zellen

Im Folgenden wurde die Expression von Haushaltsgenen, typischen Stammzell- und Differenzierungsmarkern der drei Keimblätter in undifferenzierten ES Zellen und in EBdifferenzierten *Sox17*::DsRed Zellen untersucht. Dabei sollte die Expression endodermaler Gene in den *Sox17*::DsRed⁺ Zellen deutlich über der Expression dieser Gene in der *Sox17*::DsRed⁻ Zellen liegen. Dagegen sollte die Expression mesodermaler und ektodermaler Transkripte in der *Sox17*::DsRed⁻ Zellpopulation hoch und in der *Sox17*::DsRed⁺ Zellpopulation niedrig sein. Die Expression von Stammzellmarkern, die zur Aufrecht-

erhaltung von Selbsterneuerung und Pluripotenz in ES Zellen wichtig sind, sollte nur in den undifferenzierten ES Zellen nachzuweisen sein, während Haushaltsgene stabil in allen drei Populationen exprimiert werden sollten.

Die Expression von Haushaltsgenen. Die Abbildung 3.11 A zeigt die Expression von Haushaltsgenen, die üblicherweise bei Expressionsanalysen zur Normalisierung verwendet werden. Während die Expression von β -Actin, *Gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) und der ribosomalen 18S RNA in undifferenzierten *Sox17*::DsRed ES Zellen und in den beiden EB-differenzierten Zellpopulationen innerhalb der Fehlergrenzen ausreichend stabil ist, zeigt die Expression von *Hprt* (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) einen deutlichen Abfall nach Differenzierung der Zellen. Daher konnte *Hprt* nicht zur Normalisierung von qPCR Daten unter den gegebenen Differenzierungsbedingungen verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür ausschließlich *Gapdh* verwendet.

Stammzellmarker während der EB Differenzierung. In den undifferenzierten ES Zellen werden die klassischen Stammzellmarker *Nanog*, *Oct4*, *Sox2* und *Zpf42* (zinc finger



Abbildung 3.11: Expression von Haushaltsgenen und ausgesuchten Markergenen in *Sox17::DsRed Zellen am Tag 8 nach EB Differenzierung innerhalb des Affymetrix-Datensatzes.* Dargestellt ist das relative Expressionsniveau von Haushaltsgenen (A), Pluripotenzmarkern (B), mesodermalern (C) und ektodermalen Markergenen (D). Die Expression der einzelnen Gene wurde normalisiert und die maximale Expression auf 100% gesetzt. Alle Ergebnisse sind gemittelt aus drei unabhängigen biologischen Replikaten.

protein 42) exprimiert. Differenzierung von ES Zellen zu EBs führt zur starken Reduzierung der Expression aller Stammzellmarker innerhalb der ersten drei Tage der EB Differenzierung (Abbildung 3.6 D). Diese Abnahme der Expression lässt sich auch in der *Sox17*::DsRed⁻ und *Sox17*::DsRed⁺ Population feststellen, wobei das Expressionsniveau in den *Sox17*::DsRed⁺ Zellen noch einmal deutlich geringer ist als in den *Sox17*::DsRed⁻ Zellen. Dies weist darauf hin, dass in der *Sox17*::DsRed⁺ Population Zellen mit embryonalen Stammzelleigenschaften zum größten Teil aussortiert wurden. Im Gegensatz dazu ist in der *Sox17*::DsRed⁻ Zellpopulation ein, wenn auch kleiner, Anteil undifferenzierter oder unvollständig differenzierter Zellen zu finden (Abbildung 3.11 B). Ebenso wie die Pluripotenzgene sind auch die Gene *Tcl1* (T-cell lymphoma breakpoint 1) und *Esrrb* (Estrogen-related receptor β), deren Zusammenhang mit Selbsterneuerung und ES Zell Pluripotenz gezeigt werden konnte [57], kaum in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen exprimiert (Daten nicht gezeigt).

Expression ektodermaler, mesodermaler und mesendodermaler Marker. Eomes (eomesodermin homolog, Xenopus laevis) ist verglichen mit den Kontrollpopulationen Sox17::DsRed⁻ und Sox17::DsRed ES Zellen in der Sox17::DsRed⁺ Population stark exprimiert. Expressionsniveaus von Flk1 und Brachyury in der Sox17::DsRed⁺ Population entsprechen etwa 50% des Niveaus in der Sox17::DsRed⁻ Population. Beide Transkriptionsfaktoren sind aber kaum in undifferenzierten Sox17::DsRed ES Zellen exprimiert. Alle drei Gene sind in vivo im Mesendoderm exprimiert, wobei die Brachyury Expression auch im mesodermalen Keimblatt aufrecht erhalten bleibt. Die Markergene Bmp4, Cfc1 (Cripto) und Foxf1a (forkhead box F1a) lassen kaum eine Unterscheidung der DsRed-exprimierenden Zellpopulationen zu (Abbildung 3.11C). Sox1 Transkripte als Marker für Vorläuferzellen neuroektodermaler Zelllinien sind in Sox17::DsRed Zellen um mehr als 60% vermindert. Nes (Nestin), Nog (Noggin) und Ncam1 (neural cell adhesion molecule 1) sind stärker in der Sox17::DsRed⁺ Population nachzuweisen (Abbildung 3.11 D). Insgesamt lässt sich feststellen, dass mesodermale und ektodermale Marker in der Sox17::DsRed⁺ Zellpopulation nachzuweisen sind, jedoch — mit Ausnahme von Eomes — ist die Expression der Marker teilweise deutlich reduziert gegenüber den Kontrollpopulationen Sox17::DsRed⁻ und undifferenzierten Sox17::DsRed ES Zellen.

Expression endodermaler Marker in der Sox17::DsRed⁺ **Zellpopulation.** EBdifferenzierte *Sox17::*DsRed ES Zellen regulieren die Marker des pimitiven Endoderms *Pdgfr2, Gata4* und *Gata6* herauf. Da der Wachstumsfaktorrezeptor *Pdgfr2* nicht exklusiv von Zellen des PrEs exprimiert wird, sondern auch in Subpopulationen mesodermaler Zellen vorkommt, ist *Pdgfr2* auch in der *Sox17::*DsRed⁻Population nachzuweisen. Eben-

so verhält es sich mit dem Transkript des Adapterproteins GRB2, das in den Signaltransduktionsweg des Pdgf-Rezeptors eingreift (nicht gezeigt). Die Transkriptionsfaktoren Gata4 und Gata6 lassen sich, wenn auch mit geringerem Expressionsniveau — etwa 40% für Gata4 bzw. 70% für Gata6 — in der Sox17::DsRed⁻ Zellpopulation nachweisen. Dab2 (disabled homolog 2, Drosophila), das für die Etablierung von Zellpolarität epithelialer Gewebe benötigt wird, ist weitgehend auf die *Sox17*::DsRed⁺ Population beschränkt. Die Transkriptionsfaktoren Hnf4a, Hnf1b, Foxa1 und Foxa2 sind verglichen mit undifferenzierten ES und Sox17::DsRed⁻ Zellen deutlich in der Sox17::DsRed⁺ Population exprimiert. Die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren der HNF Familie - Hnfla, Foxa3 und *Onecut1* — lässt sich in den EB-differenzierten *Sox17*::DsRed⁺ Zellen nachweisen, wenn auch zum Teil nicht ausschließlich (nicht gezeigt). Afp, hier stellvertretend für weitere Serumproteine wie z.B. Transthyretin (Ttr) und Albumin (Alb), das vom VE gebildet wird, ist vorwiegend in den endodermalen Sox17::DsRed⁺ Zellen exprimiert. Sox7, ein Marker, der nicht im DE exprimiert wird, zeigt keine stark ausgeprägte differentielle Expression in irgendeiner der drei untersuchten Populationen. Der Chemokinrezeptor Cxcr4, der zusammen mit Sox17 DE eindeutig markiert, ist hingegen in der Sox17::DsRed⁺ Population ungefähr doppelt so stark exprimiert wie in der Sox17::DsRed⁻ Population (Abbildung 3.12). Cxcr4 wird in vielen Zelltypen des hämatopoetischen Systems exprimiert, die



Abbildung 3.12: Expression von Endodermmarkern in *Sox17*::DsRed Zellen an Tag 8 nach EB Differenzierung. Relatives Expressionsniveau von Genen, die im primitiven, extraembryonalen und definitiven Endoderm während der embryonalen Entwicklung zwischen E4,5–E7,5 (Implantation und Gastrulation) exprimiert werden. Die Expressionsstärken der einzelnen Gene wurden normalisiert und die maximale Expression auf 100% gesetzt. Alle Ergebnisse sind gemittelt aus drei unabhängigen biologischen Experimenten.

jedoch negativ für *Sox17* sind. Insgesamt lässt sich aus der Analyse der Affymetrix-Daten ausgewählter Markergene sagen, dass die *Sox17*::DsRed⁺ Population aus endodermal differenzierten EB Zellen besteht und neben den Markern des ExEs auch Merkmale von PrE (*Pdgfr2* und *Gata6*) und DE (*Cxcr4*) aufweist.

3.3.2.3 Analyse differentiell exprimierter Gene in der Sox17::DsRed ES Zelllinie

Nach RMA Normalisierung der Affymetrix-Expressionsrohdaten wurden Wahrscheinlichkeitswerte (*p*-Werte) mittels parametrischem ANOVA (F-Test) und Student's *t*-Test (bei Annahme unabhängiger Stichproben und ungleicher Varianz) berechnet, um die statistische Signifikanz differentieller Expression zu ermitteln. Dabei wurde der Student's *t*-Test jeweils paarweise für *Sox17*::DsRed ES vs. *Sox17*::DsRed⁻, *Sox17*::DsRed ES vs. *Sox17*::DsRed⁺ und *Sox17*::DsRed⁻ vs. *Sox17*::DsRed⁺ bestimmt. Der ANOVA F-Test berücksichtigt alle drei Bedingungen gleichzeitig. Zur Abschätzung falsch-positiver Ergebnisse wurde die sogenannte False Discovery Rate (FDR) nach Benjamini und Hochberg ermittelt [149]. Eine Übersicht über ermittelte FDR und *p*-Werte gibt die Tabelle 3.8.

Transkripte innerhalb des Sox17::DsRed Affymetrix-Datensatzes wurden als differentiell exprimiert gewertet, wenn bei dem Vergleich zweier Zellpopulationen (i) die Anderung der Expression eines Probesets um den Faktor ≥ 2 im Fall eines hochregulierten bzw. \leq -2 im Fall eines herunterregulierten Gens war und (*ii*) der *p*-Wert des statistischen Tests ein Signifikanzniveau von \leq 0,05 besaß. Aufgrund dieser Kriterien konnten insgesamt 5095 Probesets identifiziert werden, die zwischen undifferenzierten Sox17::DsRed ES Zellen und Sox17::DsRed⁻ Zellen differentiell exprimiert werden. Vergleicht man die Sox17::DsRed⁺ Zellpopulation mit dem undifferenzierten Zustand, so waren 6689 Probesets differentiell exprimiert. Dabei waren 2914 Probesets in Sox17::DsRed- und 3809 Probesets in Sox17::DsRed⁺ Zellen hochreguliert. Nach der Beseitigung redundanter Probesets entsprach dies 2032 bzw. 2640 Transkripten (Abbildung 3.13 A). Eine Abnahme der Transkription um den Faktor \leq -2 konnte bei 1692 Probesets in der *Sox17*::DsRed⁻ Zellpopulation und bei 2180 Probesets in der Sox17::DsRed⁺ Zellpopulation festgestellt werden. Zur bildlichen Darstellung des charakteristischen Expressionsprofils der Sox17::DsRed⁻ und Sox17::DsRed⁺ Zellen wurden die Probesets nach Hierarchie geclustert und als sogenannte *Heatmap* dargestellt (Anhang A.1).

Die Schnittmenge der Gene, die in *Sox17*::DsRed⁻ und *Sox17*::DsRed⁺ herauf- bzw. herunterreguliert waren, beträgt 1810 Probesets für die hochregulierten und 1539 Probesets für die herunterregulierten Transkripte (Abbildung 3.13 B). Die großen Schnittmengen weisen darauf hin, dass während der EB Differenzierung große Veränderungen im ES Zell Transkriptom stattfinden, wohingegen nur geringe Veränderungen im Transkriptom die endodermale Identität der Sox17-positiven Zellen im Vergleich zu der differenzierten

Student's <i>t</i> -Test ES vs. <i>Sox</i> 17::DsRed ⁻			Student's <i>t</i> -Test ES vs. <i>Sox</i> 17::DsRed ⁺		
<u>n</u>	<i>p</i> -Wert	FDR	<u> </u>	<i>p</i> -Wert	FDR
14510	0,05	$1,55204 \ge 10^{-1}$	17462	0,05	1,29138 x 10 ⁻¹
7302	0,01	$6,17388 \ge 10^{-2}$	9780	0,01	$4,61045 \ge 10^{-2}$
2153	10^{-3}	$2,09267 \times 10^{-2}$	3333	10^{-3}	$1,35293 \ge 10^{-2}$
519	10^{-4}	8,64796 x 10 ⁻³	854	10^{-4}	$5,24656 \ge 10^{-3}$
116	10^{-5}	$3,81530 \times 10^{-3}$	172	10^{-5}	$2,57343 \times 10^{-3}$
15	10^{-6}	$2,82298 \times 10^{-3}$	22	10^{-6}	$1,89897 \ge 10^{-3}$
1	10^{-7}	$2,37647 \times 10^{-3}$	2	10^{-7}	$1,36240 \times 10^{-3}$
			1	10^{-8}	$3,95148 \ge 10^{-4}$
t-Test Sox1	17::DsRed ⁻ vs	. Sox17::DsRed ⁺	ANOVA		
<u>n</u>	<i>p</i> -Wert	FDR	<u>n</u>	<i>p</i> -Wert	FDR
5890	0,05	$3,82516 \ge 10^{-1}$	20461	0,05	$1,10206 \ge 10^{-1}$
1852	0,01	$2,43305 \times 10^{-1}$	13999	0,01	$3,22156 \ge 10^{-2}$
268	10^{-3}	$1,67008 \ge 10^{-1}$	8025	10^{-3}	$5,61240 \ge 10^{-3}$
39	10^{-4}	$1,10866 \ge 10^{-1}$	4077	10^{-4}	$1,10604 \ge 10^{-3}$
1	10^{-5}	$9,42938 \ge 10^{-2}$	1702	10^{-5}	$2,64545 \ge 10^{-4}$
			594	10^{-6}	7,58789 x 10 ⁻⁵
			187	10^{-7}	2,39942 x 10 ⁻⁵
			46	10^{-8}	9,61655 x 10 ⁻⁶
			6	10^{-9}	6,36991 x 10 ⁻⁶
			1	10^{-10}	$1.37418 \ge 10^{-6}$

Sox17-negativen Kontrollpopulation definieren. Dieses Ergebnis wird auch durch eine Hauptkomponentenanalyse gestützt (nicht gezeigt, im Abschnitt 4.2.2 diskutiert).

Tabelle 3.8: ANOVA und Student's t-Test *p***-Werte.** Der parametrische ANOVA (F-tests) und die paarweisen Vergleiche von ES vs. *Sox17*::DsRed⁻, ES vs. *Sox17*::DsRed⁺ und *Sox17*::DsRed⁻ vs. *Sox17*::DsRed⁺ Werten mit Hilfe des Student's *t*-Test wurden nach RMA Normalisierung des Affymetrix-Datensatzes durchgeführt. Die sogenannte *false discovery rate* (FDR) wurde nach der von Benjamini und Hochberg beschriebenen Methode ermittelt [149]. Daten von H. Schulz, MDC Berlin, ermittelt.

3.3.2.4 Gen-Ontologie differentiell exprimierter Transkripte

Um die Anzahl differentiell exprimierter Gene für eine Gen-Ontologie (GO)-Analyse zu reduzieren, wurden Probesets mit einem Student's *t*-Test *p*-Wert von \leq 0,05 ausgewählt. Die Schnittmenge der Probesets aus den drei paarweisen Vergleichen der Zellpopulationen — ES vs. *Sox17*::DsRed⁻ (n=14 510 Probesets), ES vs. *Sox17*::DsRed⁺ (n=17 462 Probesets) und *Sox17*::DsRed⁻ vs. *Sox17*::DsRed⁺ (n=5 890 Probesets) — wurde für die weitere Analyse gebildet (n=4393 Probesets). Affymetrix-Identifikationsnummern (IDs) wurden zum korrespondierenden Transkript konvertiert und Duplikate sowie nicht annotierte
Gene wurden von der weiteren Analyse ausgeklammert. 1107 Transkripte sind im reduzierten Datensatz um den Faktor ≥ 2 in *Sox17*::DsRed⁺ im Vergleich zu wenigstens einer der Kontrollpopulationen — Sox17 ES Zellen oder *Sox17*::DsRed⁻ Zellen — heraufreguliert. Eine Expressionsänderung um den Faktor ≤ -2 in *Sox17*::DsRed⁺ ist im Vergleich zu den Kontrollen in 716 Transkripten zu beobachten und in Abbildung 3.13 B dargestellt. Transkripte, deren Expression in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen hochreguliert ist, können weiter in die vier folgenden Unterkategorien eingeteilt werden: (*i*) \geq 2fach hochreguliert in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen im Vergleich zu beiden Kontrollpopulationen, (*ii*) und (*iii*) hochreguliert in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen im Vergleich zu Sox17 ES oder *Sox17*::DsRed⁻ Zellen, aber um den Faktor ≤ -2 herunterreguliert in der jeweils anderen Zellpopulation (6 Transkripte herunterreguliert in ES Zellen (0,6%) und 19 Transkripte herunterreguliert in *Sox17*::DsRed⁻ Zellen (2,2%)) und schließlich (*iv*) die restlichen 917 Transkripte (62,5%), die im Vergleich zu einer Kontrollpopulationen in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen um den Faktor ≥ 2 hochreguliert sind, aber in der jeweils anderen Zellpopulation keine Regulation um den Faktor ≤ -2 zeigen (Abbildung 3.13 B).

Die 385 \geq 2fach hochregulierten Gene der ersten Unterkategorie stellen das für die endodermal differenzierten Sox17::DsRed⁺ Zellen spezifische Transkriptom dar. In Abbildung 3.13 D ist das hierarchische Cluster der 525 Probesets dieser Gene zu sehen. Das für endodermal differenzierte Zellen charakteristische Expressionsmuster zeigt hohe Expressionsniveaus der Transkripte (Spalten 7-9) im Vergleich zu undifferenzierten ES Zellen (Spalten 1-3) und zu Sox17::DsRed⁻ Zellen. Es lassen sich zwei ähnlich große Subcluster A (196 Transkripte) und B (176 Transkripte) erkennen. Subcluster A umfaßt Gene mit signifikanter Expression in Sox17::DsRed⁺ Zellen und geringer Expression sowohl in Sox17::DsRed⁻ als auch in undifferenzierten Zellen. Gene mit niedriger Expression in ES Zellen und moderater Expression in Sox17::DsRed⁻ bilden Subcluster B, während nur wenige Gene (13 Transkripte) in Subcluster C eine niedrige Expression in Sox17::DsRed⁻ Zellen und eine moderate Expression in den undifferenzierten ES Zellen aufweisen. Für die funktionale Annotierung und die Analyse überrepräsentierter Annotierungen innerhalb der Gruppe der herauf- bzw. herunterregulierten Transkripte in den Kategorien Gen-Ontologie [136] und KEGG-Pathway [137] wurde auf die DAVID Datenbank und deren Werkzeuge zur Annotierung zurückgegriffen.



Abbildung 3.13: Übersicht über Anzahl und hierarchische Clusteranalyse differentiell exprimierter Transkripte in *Sox17*::DsRed⁺, *Sox17*::DsRed⁻ und undifferenzierten *Sox17*::DsRed ES Zellen. (A) Proportionales Venn Diagramm herauf- und herunterregulierter Transkripte in *Sox17*::DsRed Zellen im Vergleich zur undifferenzierten ES Zellpopulation (\geq 2fach, Student's *t*-Test *p*-Wert \leq 0,05). (B) Verteilung von \geq 2fach herauf- und herunterregulierten Probesets in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen im Vergleich zu *Sox17*::DsRed⁺ Zellen (Student's *t*-Test *p*-Wert \leq 0,05). Hierarchische Clusteranalyse von Probesets, die in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen herauf- (D) bzw. herunterreguliert (C) sind. Die farbige *Heatmap* veranschaulicht das Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse von Probesets, die in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen im Vergleich zur undifferenzierten *Sox17*::DsRed ES Zellpopulation und zur *Sox17*::DsRed⁻ ein 2fach höheres bzw. 2fach niedrigeres Expressionsniveau aufzeigen. Jedes Probeset wird durch eine Zeile farbiger Rechtecke repräsentiert; jeder Affymetrix-Array wird durch eine Spalte repräsentiert. Probesets sind rot gefärbt und herunterregulierte Probesets sind grün gefärbt, wobei die Farbintensität proportional zur Stärke der Regulation ist. Das Dendrogramm auf der linken Seite der *Heatmap* repräsentiert eine Ähnlichkeitsmatrix der Probesets. Subcluster sind am rechten Rand mit Großbuchstaben gekennzeichnet.

GO-Annotierung hochregulierter Gene. KEGG- und GO-Terme, die in der Liste der 385 in Sox17::DsRed⁺ Zellen hochregulierten Probesets überproportional oft vertreten sind, gibt die Tabelle 3.9 wieder. Darunter sind in den Kategorien "Biologischer Prozess" (GOTERM_BP), "Zelluläre Komponente" (GOTERM_CC) und "Molekulare Funktion" (GOTERM_MF) vor allem GO-Terme enthalten, die (i) mit Angiogenese, (ii) mit der Bildung interzellulärer Verknüpfungen, sogenannter Tight junctions, in der apikal-lateralen Plasmamembran und (iii) mit der Bildung von visceralem, parietalem und definitivem Endoderm vor und während der Gastrulation sowie der Bildung endodermal abgeleiteter Gewebe (embryonaler Darm, Lunge) assoziiert sind. Die GO-Terme "angiogenesis", "vasculature development", "blood vessel development" und "blood vessel morphogenesis" mit einem *p*-Wert von \leq 8,61 x 10–5 gehören zur Kategorie "Biologischer Prozess" und können Gruppe (*i*) zugeordnet werden. Mit einem geringen *p*-Wert ($\leq 6,86 \times 10-8$) in der Kategorie "Zelluläre Komponente" können die GO-Terme "apical junction complex", "intercellular junction" und "cell junction" der Gruppe (ii) zugeordnet werden. Auch die KEGG-Pathways "Tight junction" und "Cell Communication" (*p*-Wert ($\leq 1.57 \times 10-3$) lassen sich zur zweiten Gruppe zählen. Die Gruppe (iii) umfasst die GO-Terme, die mit der Bildung endodermaler Zelltypen assoziiert sind: "endoderm development", "gastrulation", "embryonic foregut morphogenesis", "embryonic gut morphogenesis" u.ä. sowie "lung development" und "respiratory tube development". Darüber hinaus sind weitere GO-Terme in der Liste zu finden, die direkt oder indirekt mit der Funktion endodermaler Gewebe in Beziehung stehen, wie zum Beispiel "epithelial cell differentiation" und "branching morphogenesis of a tube". Die Gene mit den zugeordneten GO-Termen und ihre Expressionsänderungen während der Differenzierung der Sox17::DsRed ES Zellen sind in den Tabellen 4.1-4.8 aufgeführt und werden im Abschnitt 4.2.3 ausführlich diskutiert. Die vollständige Liste der Transkripte aller GO-Kategorien mit einem Fisher's

Exact-Test p -Wert $\leq 10^{-2}$ und die Ände	rung de	r Expression	werden ir	n Rahmen	einer
Publikation öffentlich zur Verfügung ges	stellt.				

Kategorie	Term	Zähler	Anreicherung	<i>p</i> -Wert
GOTERM_BP_5	angiogenesis	14	4,32	2,02E-05
GOTERM_BP_5	vasculature development	17	3,51	2,65E-05
GOTERM_BP_5	organ morphogenesis	27	2,47	3,10E-05
GOTERM_BP_5	blood vessel morphogenesis	15	3,64	6,30E-05
GOTERM_BP_5	blood vessel development	16	3,34	8,61E-05
GOTERM_BP_5	branching morphogenesis of a tube	8	6,12	3,04E-04
GOTERM_BP_5	cell morphogenesis	22	2,08	2,02E-03
GOTERM_BP_5	cell part morphogenesis	15	2,54	2,35E-03
GOTERM_BP_5	cell projection morphogenesis	15	2,54	2,35E-03
GOTERM_BP_5	cell projection organization and biogenesis	15	2,54	2,35E-03
GOTERM_BP_5	small GTPase mediated signal transduction	18	2,24	2,79E-03
GOTERM_BP_5	embryonic ectodermal gut morphogenesis	3	24,85	5,68E-03
GOTERM_BP_5	cholesterol transport	4	10,46	6,05E-03
GOTERM_BP_5	sterol transport	4	9,94	7,02E-03
GOTERM_BP_5	blood vessel endothelial cell migration	3	21,30	7,84E-03
GOTERM_BP_5	proteolysis	25	1,75	8,15E-03
GOTERM_BP_5	epithelial cell differentiation	5	6,06	8,86E-03
GOTERM_BP_5	embryonic organ morphogenesis	4	9,04	9,20E-03
GOTERM_BP_5	embryonic gut morphogenesis	3	18,64	1,03E-02
GOTERM_BP_5	embryonic digestive tract morphogenesis	3	16,57	1,31E-02
GOTERM_BP_5	gastrulation with mouth forming second	4	7,65	1,47E-02
GOTERM_BP_5	patterning of blood vessels	4	7,65	1,47E-02
GOTERM_BP_5	gastrulation (sensu Vertebrata)	4	7,65	1,47E-02
GOTERM_BP_5	lipoprotein metabolic process	6	4,09	1,53E-02
GOTERM_BP_5	ectodermal gut development	3	14,91	1,62E-02
GOTERM_BP_5	ectodermal gut morphogenesis	3	14,91	1,62E-02
GOTERM_BP_5	acylglycerol metabolic process	4	7,10	1,79E-02
GOTERM_BP_5	neutral lipid metabolic process	4	7,10	1,79E-02
GOTERM_BP_5	gut morphogenesis	3	13,56	1,95E-02
GOTERM_BP_5	glycerolipid metabolic process	4	6,86	1,97E-02
GOTERM_BP_5	endothelial cell migration	3	12,43	2,31E-02
GOTERM_BP_5	neuron development	11	2,27	2,32E-02
GOTERM_BP_5	regulation of epithelial cell proliferation	4	6,21	2,56E-02
GOTERM_BP_5	digestive tract morphogenesis	3	11,47	2,69E-02
GOTERM_BP_5	regulation of small GTPase mediated signal transduction	9	2,46	2,99E-02
GOTERM_BP_5	embryonic gut development	3	10,65	3,10E-02
GOTERM_BP_5	tissue regeneration	3	10,65	3,10E-02
GOTERM_BP_5	positive regulation of transferase activity	7	2,92	3,22E-02
GOTERM_BP_5	embryonic organ development	4	5,37	3,73E-02
GOTERM_BP_5	regulation of blood vessel endothelial cell migration	2	49,71	3,96E-02
GOTERM_BP_5	neuron differentiation	12	1,96	4,29E-02
GOTERM_BP_5	tissue development	12	1,94	4,52E-02
GOTERM_BP_5	negative regulation of cellular component organization and biogenesis	4	4,85	4,84E-02
GOTERM BP 5	regulation of cell migration	5	3,60	4,93E-02
GOTERM_BP_5	lung development	5	3,55	5,15E-02

Tabelle 3.9

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

3.3	Analyse	des Trar	nskriptoms	von Sox17	::DsRed-	positiven	Zellen
	/						

(Fortcotzung)	
(FULSELLUNG)	

Kategorie	Term	Zähler	Anreicherung	<i>p</i> -Wert
GOTERM_BP_5	cellular morphogenesis during differentiation	9	2,19	5,27E-02
GOTERM_BP_5	respiratory tube development	5	3,50	5,37E-02
GOTERM_BP_5	endoderm development	3	7,85	5,46E-02
GOTERM_BP_5	gut development	3	7,85	5,46E-02
GOTERM_BP_5	actin filament-based process	9	2,17	5,52E-02
GOTERM_BP_5	negative regulation of angiogenesis	3	7,46	5,99E-02
GOTERM_BP_5	positive regulation of cell migration	3	7,46	5,99E-02
GOTERM_BP_5	regulation of organelle organization and biogenesis	4	4,42	6,08E-02
GOTERM_BP_5	regulation of cytoskeleton organization and biogenesis	4	4,42	6,08E-02
GOTERM_BP_5	kidney development	5	3,31	6,33E-02
GOTERM_BP_5	central nervous system development	10	1,99	6,41E-02
GOTERM_BP_5	regulation of kinase activity	8	2,25	6,51E-02
GOTERM_BP_5	positive regulation of epithelial cell proliferation	3	7,10	6,53E-02
GOTERM_BP_5	protein polymerization	4	4,14	7,10E-02
GOTERM_BP_5	neurogenesis	13	1,73	7,26E-02
GOTERM_BP_5	chordate embryonic development	9	2,02	7,66E-02
GOTERM_BP_5	negative regulation of actin filament depolymerization	3	6,48	7,67E-02
GOTERM_BP_5	embryonic foregut morphogenesis	2	24,85	7,77E-02
GOTERM_BP_5	positive regulation of cell motility	3	6,21	8,26E-02
GOTERM_BP_5	anion transport	8	2,10	8,55E-02
GOTERM_BP_5	regulation of actin filament depolymerization	3	5,96	8,86E-02
GOTERM_BP_5	actin filament depolymerization	3	5,96	8,86E-02
GOTERM_BP_5	foregut morphogenesis	2	19,88	9,62E-02
GOTERM_BP_5	regulation of cholesterol absorption	2	19,88	9,62E-02
GOTERM_BP_5	negative regulation of protein metabolic process	5	2,82	9,99E-02
GOTERM_CC_5	apical junction complex	17	9,42	2,19E-11
GOTERM_CC_5	apicolateral plasma membrane	17	9,21	3,12E-11
GOTERM_CC_5	intercellular junction	20	6,62	1,44E-10
GOTERM_CC_5	cell junction	27	3,45	6,86E-08
GOTERM_CC_5	plasma membrane part	52	1,97	1,98E-06
GOTERM_CC_5	integral to membrane	110	1,29	6,35E-04
GOTERM_CC_5	intrinsic to membrane	110	1,29	7,64E-04
GOTERM_CC_5	apical plasma membrane	7	6,27	8,07E-04
GOTERM_CC_5	cytoplasmic vesicle	17	2,49	1,31E-03
GOTERM_CC_5	microsome	11	3,39	1,51E-03
GOTERM_CC_5	vesicular fraction	11	3,29	1,90E-03
GOTERM_CC_5	endoplasmic reticulum	27	1,80	4,01E-03
GOTERM_CC_5	cytoplasmic membrane-bound vesicle	12	2,46	9,58E-03
GOTERM_CC_5	coated vesicle	7	2,83	3,72E-02
GOTERM_CC_5	intercalated disc	4	4,70	5,25E-02
GOTERM_CC_5	cytoskeleton	26	1,45	5,55E-02
GOTERM_CC_5	coated pit	4	4,29	6,55E-02
GOTERM_CC_5	actin cytoskeleton	9	2,08	6,72E-02
GOTERM_CC_5	endosome	8	2,22	6,93E-02
GUIEKM_CC_5		δ	2,14	7,92E-02
GOTERM_MF_5	serine-type endopeptidase activity	11	2,61	9,29E-03
GOTERM_MF_5	glucuronosyltransferase activity	4	8,76	9,93E-03
GOTERM_MF_5	GPI anchor binding	7	2,75	4,10E-02

Tabelle 3.9

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

3 Ergebnisse

(Fortsetzung)							
Kategorie	Term	Zähler	Anreicherung	<i>p</i> -Wert			
GOTERM_MF_5	cysteine-type endopeptidase activity	6	2,79	6,30E-02			
GOTERM_MF_5	nickel ion binding	2	22,99	8,38E-02			
GOTERM_MF_5	symporter activity	7	2,25	8,95E-02			
KEGG_PATHWAY	Pentose and glucuronate interconversions	7	11,89	1,60E-05			
KEGG_PATHWAY	Porphyrin and chlorophyll metabolism	7	7,27	3,08E-04			
KEGG_PATHWAY	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	9	4,87	4,11E-04			
KEGG_PATHWAY	Tight junction	12	3,45	5,66E-04			
KEGG_PATHWAY	Cell Communication	11	3,29	1,57E-03			
KEGG_PATHWAY	Androgen and estrogen metabolism	7	5,13	2,06E-03			
KEGG_PATHWAY	Starch and sucrose metabolism	7	4,22	5,57E-03			
KEGG_PATHWAY	Sphingolipid metabolism	5	5,50	1,18E-02			
KEGG_PATHWAY	Complement and coagulation cascades	7	3,58	1,22E-02			
KEGG_PATHWAY	Leukocyte transendothelial migration	8	2,58	3,32E-02			
KEGG_PATHWAY	Maturity onset diabetes of the young	4	5,15	4,02E-02			
KEGG_PATHWAY	Nitrogen metabolism	3	5,61	9,71E-02			

Tabelle 3.9: Überrepräsentierte funktionale Annotierungen innerhalb der in Sox17::DsRed⁺ Zellen hochregulierten Transkripte. Transkripte in der Analyse sind in Sox17::DsRed⁺ Zellen im Vergleich zu *Sox17*::DsRed ES and *Sox17*::DsRed⁻ Zellen hochreguliert (\geq 2fache Expressionsänderung, Student's *t*-Test p-Wert $\leq 0, 05$). Die erste Spalte gibt die Anzahl der Transkripte in der jeweiligen Kategorie wieder. Der p-Wert des Fisher's Exact t-Test wird von DAVID als Maß für die Überrepräsentierung einer GO-Annotierung verwendet. GO-Terme, die in Abschnitt 4.2.3 diskutiert werden, sind durch Fettdruck hervorgehoben.

GO-Annotierung herunterregulierter Gene. Eine Analyse der Anreicherung spezifischer GO-Terme wurde für 95 Probesets durchgeführt, die eine mehr als zweifache Reduzierung der Expression des Transkripts in Sox17::DsRed⁺ Zellen im Vergleich sowohl zur undifferenzierten als auch zur *Sox17*::DsRed⁻ Population zeigten. Diese 95 Probesets entsprechen insgesamt 77 annotierten Genen. KEGG und GO-Terme, die in der Liste der herunterregulierten Probesets überproportional oft vertreten sind, gibt die Tabelle 3.10 wieder. Darunter sind in der Kategorie "Biologischer Prozess" (GOTERM_BP) vor allem GO-Terme enthalten, die mit der Aminosäurebiosynthese assoziiert sind. Mit einer Anzahl von insgesamt acht Genen und einem *p*-Wert von $7,03x10^{-2}$ ist eine Anreicherung von Komponenten mit dem GO-Term "cell death" zu finden, die in Sox17::DsRed+ EB Zellen herunterreguliert sind.

Kategorie	Term	Zähler	Anreicherung	<i>p</i> -Wert
GOTERM_BP_5	amino acid biosynthetic process	5	20.76	8.67E-05
GOTERM_BP_5	amine biosynthetic process	5	13.37	4.80E-04
GOTERM_BP_5	sulfur amino acid metabolic process	3	30.81	4.02E-03
GOTERM_BP_5	amino acid metabolic process	6	4.50	9.62E-03
Tabelle 3.10		1	Fortsetzung auf der ni	ächsten Seite

Fortsetzung auf der nächsten Seite

(Fortsetzung)							
Kategorie	Term	Zähler	Anreicherung	<i>p</i> -Wert			
GOTERM_BP_5	cysteine metabolic process	2	65.05	2.98E-02			
GOTERM_BP_5	carboxylic acid transport	3	8.87	4.34E-02			
GOTERM_BP_5	regulation of kinase activity	4	4.41	5.93E-02			
GOTERM_BP_5	regulation of small GTPase mediated signal transduction	4	4.29	6.34E-02			
GOTERM_BP_5	sulfur amino acid biosynthetic process	2	30.02	6.35E-02			
GOTERM_BP_5	cell death	8	2.15	7.03E-02			
GOTERM_BP_5	nucleoside monophosphate biosynthetic process	2	21.68	8.68E-02			
GOTERM_BP_5	aspartate family amino acid metabolic process	2	21.68	8.68E-02			
GOTERM_BP_5	tricarboxylic acid cycle intermediate metabolic process	2	21.68	8.68E-02			
GOTERM_BP_5	serine family amino acid metabolic process	2	20.54	9.14E-02			
GOTERM_MF_5	carboxylic acid transmembrane transporter activity	3	9.59	3.69E-02			
KEGG_PATHWAY	Synthesis and degradation of ketone bodies	2	28.75	6.50E-02			
KEGG_PATHWAY	PPAR signaling pathway	3	6.32	7.52E-02			
KEGG_PATHWAY	Cysteine metabolism	2	18.60	9.87E-02			

Tabelle 3.10: Überrepräsentierte funktionale Annotierungen innerhalb der in *Sox17::*DsRed⁺ Zellen herunterregulierten Transkripte. Transkripte in der Analyse sind in *Sox17::*DsRed⁺ Zellen im Vergleich zu *Sox17::*DsRed ES und *Sox17::*DsRed⁻ Zellen herunterreguliert (\leq -2fache Expressionsänderung, Student's *t*-Test *p*-Wert \leq 0,05). Die erste Spalte gibt die Anzahl der Transkripte in der jeweiligen Kategorie wieder. Der *p*-Wert des Fisher's Exact *t*-Test wird von *DAVID* als Maß für die Überrepräsentierung einer GO-Annotierung verwendet.

3.4 Analyse endodermaler Kandidatengene

Die gezielte Analyse endodermaler Markergene des *Sox17*-spezifischen Transkriptoms zeigte, dass die *Sox17*::DsRed⁺ Zellpopulation Merkmale des ExEs (VE und PE) und DEs besaßen und zusätzlich Marker des embryonalen Darms und anderer Gewebe endodermalen Ursprungs exprimierten. Darüber hinaus zeigte die GO-Analyse \geq 2-fach hochregulierter Transkripte, dass neben Endoderm und Endoderm-assoziierten organspezifischen GO-Termen vor allem GO-Terme überrepräsentiert sind, die für die Angiogenese und Vaskulogenese von Bedeutung sind. Neben den bereits bekannten, Endodermassoziierten und GO-annotierten Transkripten konnten weitere Transkripte mit unbekannter Funktion oder Transkripte, die bisher nicht mit der Entwicklung endodermaler Gewebe und Sox17 in Verbindung gebracht wurden, identifiziert werden, die in der *Sox17*::DsRed-positiven Population hochreguliert waren. Um eine endodermale Assoziation dieser unzureichend charakterisierten Gene aufzuzeigen, wurde die räumliche Expression der Transkripte während der Mausembryogenese zwischen den Stadien E9,0 und E10,0 durch *in situ* Hybridisierung von Mausembryonen (*whole-mount*) untersucht (Abschnitt 3.4.2). Darüber hinaus wurde ein möglicher Einfluß von SOX17 auf die Pro-

3 Ergebnisse

motoren ausgesuchter Transkripte durch Expressionsanalysen mit Hilfe eines Luciferase-Reportergens überprüft (Abschnitt 3.4.3).

3.4.1 Identifizierung bisher nicht beschriebener Sox17-regulierter Gene

Um die Anzahl der Transkripte für die weiteren Untersuchungen zu begrenzen, wurden folgende Kriterien auf den Affymetrix-Datensatz angewendet: (*i*) Ausgewählt wurden Probesets mit einer \geq 2,5-fach hochregulierten Expression in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen verglichen mit undifferenzierten *Sox17*::DsRed ES und *Sox17*::DsRed⁻ Zellen, (*ii*) der ANOVA-Wert der Probesets sollte \leq 0,005 sein und (*iii*) redundante Probesets wurden eleminiert. Insgesamt umfasst die Liste 229 unterschiedliche Gene (Anhang A.3). Gut charakterisierte Markergene wie *Hnf1b*, *Hnf4*, *Foxa2*, *Afp* u.a. wurden von dieser Liste gestrichen. Ebenso wurden die Gene , die durch die systematische Analyse von Zellen endodermalen Ursprungs identifiziert werden konnten [109, 150, 151], von weiteren Unter-



Abbildung 3.14: Bestätigung ausgewählter endodermaler Kandidatengene des Affymetrix-Datensatzes durch quantitative PCR. Quantitativer Nachweis der differentiellen Expression ausgewählter Gene in *Sox17*::DsRed⁺, *Sox17*::DsRed⁻ und undifferenzierten *Sox17*::DsRed ES Zellen. Die qPCR Ergebnisse einzelner Gene wurden gegen die *Gapdh* Expression normalisiert und die maximale Expression auf 100% gesetzt. Alle Ergebnisse sind gemittelt aus drei unabhängigen biologischen Experimenten.

suchungen ausgeschlossen (Tabelle 4.9). Schließlich wurden auch Gene des Affymetrix-Datensatzes nicht weiter analysiert, die nach Literaturrecherche eindeutig nicht mit der endodermalen Identität in Verbindung stehen und möglicherweise als falsch-positiv zu werten sind. Die Tabelle 3.11 gibt die letztlich ausgewählten achtzehn Kandidatengene wieder. Ihre Expression in der *Sox17*::DsRed⁺ Zellpopulation konnte mit Hilfe quantitativer PCR bestätigt werden (Abbildung 3.14).

			Ех	ressionsär	nderung	
Probeset	Gen-Symbol	Gen-Name	ES vs. Sox17	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺	ANOVA
1453004_at	Slc22a23	Solute carrier family 22, member 23	6.87	23.91	3.48	9.14E-07
1460411_s_at	Pkdcc	Protein kinase domain containing, cyto- plasmic	9.41	21.29	2.62	9.86E-06
1452861_at	2010300C02Rik	RIKEN cDNA 2010300C02 gene	1.73	5.35	3.10	4.99E-06
1429417_at	Chsy3	Chondroitin sulfate synthase 3	3.42	18.49	5.41	1.67E-05
1440220_at	Ocln	Occludin	1.29	5.27	4.10	1.72E-05
1452227_at	Sel1l3	Suppressor of lin-12-like 3 (C. elegans)	5.50	21.34	3.88	2.45E-05
1450288_at	Cdh6	Cadherin 6 (K-Cadherin)	3.10	10.68	3.44	2.63E-05
1439489_at	Gpr120	G protein-coupled receptor 120	1.15	7.28	6.32	4.79E-05
1428809_at	1810010H24Rik	RIKEN cDNA 1810010H24 gene	1.06	3.73	3.53	6.38E-05
1427878_at	0610010O12Rik	RIKEN cDNA 0610010O12 gene	-1.53	2.53	3.11	1.68E-04
1424463_at	Mfsd6	Major facilitator superfamily domain containing 6	1.31	5.18	3.95	2.48E-04
1457349_at	Ttc6	Tetratricopeptide repeat domain 6	1.22	6.26	5.13	2.87E-04
1457613_at	Rfx6	Regulatory factor X, 6	2.19	17.77	8.13	3.13E-04
1450947_at	2610528J11Rik	RIKEN cDNA 2610528J11 gene	1.53	9.92	6.49	3.40E-04
1423933_a_at	Plet1	Placenta expressed transcript 1	-2.45	2.56	5.05	4.27E-04
1429953_at	2210011C24Rik	RIKEN cDNA 2210011C24	-2.18	3.24	7.07	5.25E-04
1436287_at	Gm10664	Gene model 10664	-1.18	2.73	3.22	1.02E-03
1422682_s_at	Prss3	Protease, Serine, 3 (Mesotrypsin)	1.76	12.32	7.02	4.46E-03

Tabelle 3.11: Auswahl endodermaler Kandidatengene aus dem Affymetrix-Datensatz für weitere Untersuchungen. Die Liste enthält eine Auswahl bisher nicht mit der Endodermentwicklung in Zusammenhang gebrachter Gene, die in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen nach 8-tägiger EB Differenzierung im Vergleich zu undifferenzierten ES Zellen und *Sox17*::DsRed⁻ Zellen hochreguliert sind (Expressionsänderung \geq 2,5 und ANOVA *p*-Wert \leq 0,005).

3.4.2 Expressionsanalyse der Kandidatengene in vivo

Für die Herstellung der *in situ* Sonden wurden mit Transkript-spezifischen Primern (Anhang A.4) cDNA Abschnitte der Kandidatengene aus der RNA *Sox17*::DsRed⁺ Zellen PCR-amplifiziert. Über T7-Promotorsequenzen am 5'-Primer wurden die anti-sense Sonden durch *in vitro*-Transkription der PCR Produkte mit Digoxigenin markiert (Abschnitt 2.5.2.2). Die Tabelle 3.12 gibt eine Übersicht der verwendeten RNA-Sonden. Für

die zwei Gene 2610528J11Rik und Pkdcc wurden die in situ Sonden direkt von den cDNA
Klonen H4048G04 bzw. H3118B09 der cDNA Klon Banken des National Institute on Aging
(NIA) hergestellt [119–121].

Gen	RefSea-Id]	Position im Tran	Größe	in situ Sonde	
Gen	helbey h	Chr.	5'-Primer	3'-Primer	GIOLE	in sin sonae
Prss3	NM_011645	6	92	789	698 bp	\checkmark
Plet1	NM_029639	9	264	943	680 kb	\checkmark
Mfsd6	NM_133829	1	3113	3799	687 bp	\checkmark
0610010O12Rik	NM_001081365	18	21	559	539 bp	\checkmark
1810010H24Rik	NM_001163473	11	167	914	748 bp	
Chsy3	NM_001081328	18	1660	2424	765 bp	\checkmark
2210011C24Rik	AK_008705	8	47	594	548 bp	\checkmark
Gm10664	AK_014119	8	108	711	604 bp	\checkmark
Sel1l3	NM_172710	5	2192	2913	722 bp	\checkmark
Ocln	NM_008756	8	176	587	412 bp	
Cdh6	NM_007666	15	786	1404	619 bp	\checkmark
Slc22a23	NM_001033167	13	2747	342	676 bp	\checkmark
Gpr120	NM_181748	19	320	841	522 bp	\checkmark
Ttc6	TC_1697455	12	1036	1712	677 bp	\checkmark
Rfx6	NM_177306	10	1695	2312	618 bp	
2010300C02Rik	NM_028096	1	2488	3168	681 bp	\checkmark

Tabelle 3.12: Amplifizierung von PCR-Fragmenten zur Herstellung von in situ RNA-Sonden durch *in vitro* **Transkription.** Die Tabelle listet die ausgewählten Kandidatengene mit ihrer RefSeq-ID und der Position des PCR-amplifizierten Fragments bezüglich der UCSC annotierten Transkripte auf. Die Größe der PCR-Fragmente ist in Basenpaaren (bp) angegeben. Die erfolgreiche Herstellung der RNA-Sonde für die *in situ* Hybridisierung ist durch ein Häkchen in der letzten Tabellenspalte symbolisiert.

Die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungen sind in Abbildung 3.15 A–M dargestellt. Die Expression von Prss3 ist im Embryonalstadium E9,5 vor allem im Gehirn (Telencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon) zu finden (Abbildung 3.15 A), lässt sich aber auch im embryonalem Endoderm nachweisen. Besonders ausgeprägt ist die Prss3 Expression im Enddarm und in der Enddarmtasche (Abbildung 3.15 A, schwarze Pfeilspitzen), aber sie ist auch im Darmepithel des Mittel- und Vorderdarms zu erkennen. Eine schwache Prss3 Expression läßt sich zudem in Leber- und Pankreasprimordien des ventralen Vorderdarms nachweisen (Abbildung 3.15 A, weiße Pfeilspitzen). Ferner markiert die Prss3-Sonde optische und otische Vesikel. Plet1 ist in der Vorderdarmregion exprimiert (Abbildung 3.15 B). Darüber hinaus ist *Plet1* in der pharyngealen Region im oralen Ektoderm und im Taschenendoderm exprimiert. Eine mögliche Expression im Ektoderm der sich bildenden Gaumenspalte und in den epibranchialen Plakoden, die sich ebenfalls aus dem Oberflächenektoderm der Region ableiten, kann nicht ausgeschlossen werden. Das Transkript Mfsd6 (Abbildung 3.15C) ist nicht im embryonalen Darm oder in anderen endodermal abgeleiteten Strukturen zu finden. Mfsd6 Expression ist nur im Telencephalon und im Bereich der optischen Vesikel nachzuweisen. Die Expression

der drei Transkripte 061000012Rik (Abbildung 3.15 D), 2210011C24Rik (Abbildung 3.15 F) und 2010300C02Rik (Abbildung 3.15 M) ist unterschiedlich stark im Vorder-, Mittel- und Enddarm (Tabelle 3.13) ausgeprägt. Weiterhin ist eine Expression im Oberflächenektoderm zu beobachten. Das Riken-Transkript 2210011C24 zeigt auch eine Expression im Bereich des ersten Branchialbogens. Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Assoziation dieser drei Transkripte mit der Endodermidentität oder -entwicklung ist die Tatsache, dass die korrespondierenden cDNAs vermehrt sowohl aus Embryo- als auch aus Pankreas-, Darm- oder Lebergewebe kloniert wurden. In der Literatur ist eine mögliche Funktion der drei Transkripte bisher nicht beschrieben. Chsy3 ist vor allem im Enddarm und in der Enddarmtasche exprimiert (Abbildung 3.15 E). Weiterhin kann eine Expression von Chsy3 im Gehirn festgestellt werden. Expression des Transkripts Gm10664 lässt sich besonders stark in der Enddarmtasche des embryonalen Enddarms und im angrenzenden, unsegmentierten Mesoderm nachweisen. Schwache Expression von Gm10664 lässt sich im otischen Vesikel, aber auch im Bereich des Neuralrohrs nachweisen (Abbildung 3.15 G). Sel113 ist im gesamten Epithel des Vorderdarms und im Mitteldarm einschließlich der Primordien von Leber und Pankreas exprimiert. Darüber hinaus ist Expression auch im Endarm und in der Enddarmtasche festzustellen (Abbildung 3.15 H). *Cdh6* ist ubiquitär im Nervensystem exprimiert. Die Expression ist dabei im gesamten Areal des künftigen Gehirns und in anderen neuroektodermalen Geweben zu finden, z.B. in wandernden Neuralleistenzellen (schwarze Pfeilspitzen), im Trigeminalganglion (rote Pfeilspitze) und im facialen/akustischen Ganglion (weiße Pfeilspitze). Aber auch in endodermal abgeleiteten Geweben, besonders im Bereich des Vorderdarms, des Septum transversums und im Areal der Branchialbögen lässt sich das Cdh6 Transkript nachweisen (Abbildung 3.15 I). In Abbildung 3.15 J ist eine Expression von Slc22a23 in Vorderund Mitteldarm und den entsprechenden Organanlagen von Lunge und Leber zu sehen (Pfeilspitzen). Darüber hinaus ist das Transkript im Neuroektoderm des Telencephalons, Mesencephalons und Rhombencephalons nachzuweisen. Expression von *Pkdcc* kann in E 9,5 Embryonen im Mitteldarm einschließlich der Leber- und Lungenanlagen sowie dem Septum transversum (weiße Pfeilspitze) und in der anterioren Region des Enddarms nachgewiesen werden (Abbildung 3.15 K). Die stärkste Expression des Transkripts ist jedoch im oberflächlichen Ektoderm der Vordergliedknospe zu sehen. Wesentlich schwächer ist das Signal im oberflächlichen Ektoderm in der Region des Rhombencephalons und der ersten Branchialbögen sowie in den ventral und dorsal gelegenen Dermamyotomen.

3 Ergebnisse



Abbildung 3.15: *Whole-mount in situ* **Hybridisierung.** Präparate 9,0–10,0 p.c. Tage alter Mausembryonen wurden nach Hybridisierung fotografiert und anschließend annotiert. Es gelten folgende Abkürzungen: bb I, erster Branchialbogen; fg, embryonaler Vorderdarm; hg, embryonaler Enddarm; hp, Enddarmtasche; lb, Vordergliedknospe; mc, Mesencephalon; mg, embryonaler Mitteldarm; nc, Neuralrohr; op, optisches Vesikel; ov, otisches Vesikel; pm, präsomitisches Mesoderm; pT1–3, pharyngale Taschen 1–3; rb, Rhombomere; st, Septum transversum; tb, Schwanzknospe; tc, Telencephalon.

Der G-Protein gekoppelte Rezeptor (*Gpr120*) weist starke Expression im Neuroektoderm von Telencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon und im optischen Vesikel einschließlich des Sehnervs auf. Aber auch im Enddarm lässt sich Expression des Transkripts nachweisen (Abbildung 3.15 L). *Ttc6* (Abbildung 3.15 M) Transkripte lassen sich im Bereich des embryonalen Hinterdarms nachweisen. Die Tabelle 3.13 fasst die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungen übersichtlich zusammen.

	Gen	Gewebsexpression				
	Con	Vorderdarm ^a	Mitteldarm ^b	Enddarm ^c	sonstige Keimblattderivate	
A	Prss3	_	+	++	Neuroektoderm des Tc, Mc und Rb	
В	Plet1	+	-	-	pharyngale Taschen I-III, Somiten, Me- senchym	
С	Mfsd6	_	_	_	2	
D	061000012Rik	++	++	+++		
Е	Chsy3	_	+	++	Neuroektoderm des Tc, Mc und Rb	
F	2210011C24Rik	++	++	++	Oberflächenektoderm von Tc, Mc und	
					Rb; erster Branchialbogen	
G	Gm10664	_	_	+++	Mesoderm der Schwanzknospe	
Η	Sel1l3	++	+++	++	*	
Ι	Cdh6	+	+	+	ubiquitär exprimiert; u.a Neuroekto-	
					derm; Neuralleistenzellen; Urogenital- leiste	
J	Slc22a23	+	++	_		
K	Pkdcc (AW548124) +	++	+	Vordergliedknospe, Branchialbögen, Rhombomere, Dermamvotome	
L	Gpr120	_	-	+	Neuroektoderm des Tc, Mc und Rb; Ov	
Μ	Ttc6	_	_	++		
Ν	2010300C02Rik	+	+++	+++		

Tabelle 3.13: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den *in situ* **Hybridisierungen.** Die Expression im endodermalen Gewebe ausgewählter Transkripte aus Abbildung 3.15 A–T wurde entsprechend der Region des embryonalen Darms klassifiziert, wobei nicht exprimiert durch (–), schwach exprimiert durch (+), mäßig exprimiert durch (++) und stark exprimiert durch (+++) symbolisiert wird. Darüber hinaus ist die Expression der Transkripte außerhalb des endodermalen Keimblattes unabhängig von ihrer Stärke in der Spalte "sonstige" dokumentiert. Tc, Telencephalon; Mc, Mesencephalon; Rb, Rhombencephalon; Ov, optisches Vesikel.

^{*a*}einschließlich Lungenanlage

^bmit Leber- und Pankreasknospe sowie Septum transversum

^cinsbesondere Enddarmtasche

3.4.3 Einfluss von SOX17 auf die Expression untersuchter endodermaler Gene *in vitro*

Der Einfluss von SOX17 auf die Promotoraktivität der endodermalen Gene, die in der *Sox17*::DsRed⁺ Zellpopulation heraufreguliert waren, wurde mit Luciferase-Reportertests in HEK-293 Zellen untersucht. Potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) in der Promotorregion bis zu 1 kb stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle (TSS) wurden durch phylogenetisches *Footprinting* identifiziert.

3.4.3.1 Luciferase-Reportertests

Um den Einfluß von SOX17 auf die Promotoraktivität endodermaler Gene zu untersuchen, wurde ein Luciferase-Reportertest etabliert. Dafür wurde der *Sox17* ORF aus der RNA, die aus *Sox17*::DsRed⁺ EB Zellen isoliert worden war, zuerst revers transkribiert und dann PCR amplifiziert. Über die PCR Primer wurden attB Signalsequenzen für die Gateway-Klonierung an das 5'- und 3'-Ende des PCR-Produkts angehängt. Parallel dazu wurde ein zweiter *Sox17* ORF ohne Translationsstoppcodon amplifiziert. Beide Versionen des *Sox17* ORFs (mit und ohne Stoppcodon) wurden dann in pDonor201 mittels BP-

Gen-Symbol	RefSeq-Id		Position im Genom			Klonierung
Gen by mbor	Reiber Ia	Chr.	5'-Primer	3'-Primer	GIODE	Riomerung
Hnf1b	NM_009330	11	83663101	83664483	1,383 kb	\checkmark
Prss3	NM_011645	6	41395845	41397314	1,470 kb	\checkmark
Plet1	NM_029639	9	50301485	50302800	1,316 kb	\checkmark
Mfsd6	NM_133829	1	52783974	52785404	1,431 kb	\checkmark
0610010O12Rik	NM_001081365	18	36507033	36508481	1,449 kb	\checkmark
1810010H24Rik	NM_001163473	11	106888470	106889929	1,460 kb	
Chsy3	NM_001081328	18	59334042	59335475	1,434 kb	\checkmark
2210011C24Rik	AK_008705	8	86534975	86536452	1,478 kb	\checkmark
Gm10664	AK014119	8	67561155	67562654	1,500 kb	
Sel1l3	NM_172710	5	53604364	53605850	1,487 kb	
Ocln	NM_008756	8	73894097	73895592	1,496 kb	\checkmark
Cdh6	NM_007666	15	13103157	13104561	1,405 kb	\checkmark
Slc22a23	NM_001033167	13	34436841	34438287	1,447 kb	
2610528J11Rik	NM_025572	4	118198400	118199763	1,364 kb	\checkmark
Pkdcc (AW548124)	NM_134117	17	83613474	83614884	1,411 kb	
Gpr120	NM_181748	19	38170407	38171783	1,376 kb	
Ttc6	TC_1697455	12	58830355	58838021	7,667 kb	
Rfx6	NM_177306	10	51404045	51405425	1,381 kb	\checkmark
2010300C02Rik	NM_028096	1	37776250	37777719	1,470 kb	

Tabelle 3.14: Klonierung von Promotoren zur Herstellung der Luciferase-Reporterkonstrukte. Die Tabelle listet die ausgewählten Kandidatengene mit ihrer RefSeq-ID und der Position des PCR amplifizierten Promotor-Fragments bezüglich des *UCSC Genome Browser* annotierten Mausgenoms auf. Die Größe der PCR Fragmente ist in kb angegeben. Die erfolgreiche Klonierung in den Luciferase-Reportervektor pGL3-attP ist durch das Häkchen in der letzten Tabellenspalte symbolisiert. Clonase Reaktion einkloniert und schließlich mittels LR-Clonase Reaktion in die Expressionsvektoren pDest701 und pDest424 umkloniert — die *Sox17* Variante mit Translationsstopp in pDest701 und die ohne Stoppcodon in pDest424 (Abbildung 3.16 A). Die Promotoren ausgewählter Gene wurden in den promotorlosen Luciferase-Reportervektor



Abbildung 3.16: Luciferase-Expressionstests. Im ersten Schritt wurden SOX17-Expressions- und Promotor-Luciferase-Reporterkonstrukte kloniert. (A) Der *Sox17* ORF wurden in die Expressionsvektoren pDest747 oder 701 (nicht gezeigt) mit Hilfe einer LR-Clonase Reaktion (Gateway-Klonierung) kloniert. (B) Die Promotorregion 1 kb stromaufwärts des im *UCSC Genome Browser* (http://genome.ucsc.edu/) annotierten Transkriptionsstarts ausgewählter Gene wurde PCR amplifiziert und in den Luciferase-Reportervektor pGL3attP mittels BP-Clonase Reaktion kloniert. (C) Im zweiten Schritt wurden beide Vektoren in HEK-293 Zellen kotransfiziert. Die Luciferaseaktivität gibt einen Hinweis auf die Fähigkeit des Transkriptionsfaktors SOX17 untersuchte Promotoren zu aktivieren.

3 Ergebnisse



Abbildung 3.17: Schematische Abbildung des kanonischen WNT-Signalwegs. (A) Ohne WNT-Signal wird β -Catenin (β -Cat) in einem Komplex mit APC und Axin von GSK3 und CK1 phosphoryliert. Phosphoryliertes β -Catenin wird schließlich von β -Trcp ubiquitiniert und über das Proteasom degradiert. TCF/LEF-1 ist nicht in der Lage, die Transkription seiner Zielgene zu aktivieren. (B) Bindet WNT an den Rezeptor Frizzeled (FZ), wird der Komplex über Dvl zum Rezeptor rekrutiert. β -Catenin verlässt den Proteinkomplex und wird in den Nukleus transloziert und interagiert dort mit TCF/LEF1 und SOX17. Als Folge können SOX17-Zielgene aktiviert werden. LiCl ist ein spezifischer Inhibitor von GSK3 und führt so ebenfalls zur Stabilisierung von β -Catenin. Abbildung verändert nach He *et al* [155]. APC, Adenomatous polyposis coli; Dvl, Dishevelled; TCF, T-cell factor; LEF-1, Lymphoid enhancer-binding factor 1; GSK3, Glykogen synthase kinase 3; CK1, Casein kinase 1; β -Trcp, β -Transducin repeat containing protein.

pGL3-attP mittels BP-Clonase Reaktion kloniert. Dazu wurde ein etwa 1,0 kb großes Fragment des Promotors mittels PCR amplifiziert. Promotorsequenzen wurden aufgrund der im *UCSC Genome Browser* annotierten TSS ausgewählt. Der 3'-Primer wurde in das erste Exon der 5' untranslatierten Region (UTR) gelegt, der 5'-Primer lag etwa 1,0 kb stromaufwärts davon (Tabelle 3.14 und Abbildung 3.16 B). Als Positivkontrolle für die Luciferase-Reportertests wurde der *Hnf1b* Promotor in gleicher Weise in den Luciferase-Reportervektor pGL3-attP kloniert. Hudson *et al.* und Clemens *et al.* konnten zeigen, dass *Hnf1b* in *Xenopus laevis* ein direktes Zielgen der *Sox17*-Homologe Xsox17- α und Xsox17- β ist [152, 153]. Dabei ist die physikalische Interaktion von Xsox17- β mit β -Catenin, einer Komponente des kanonischen WNT-Signaltransduktionswegs (Abbildung 3.17), für die Aktivierung von SOX17 Zielgenen notwendig [140]. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Analyse von humanen Colonkarzinomzellen erhalten [154].

Kotransfektion von 100 ng des Expressionsplasmids mit N- und C-terminal Mycmarkiertem SOX17 und 50 ng des *Hnf1b* Luciferasereporters zeigte, dass die Luciferaseaktivität verglichen mit der Negativkontrolle (kein SOX17) durch die Interaktion des Transkriptionsfaktors mit dem *Hnf1b* Promotor zunimmt. Dabei hat die Positionierung des Myc-Peptids keinen Einfluss auf die Höhe der Luciferaseaktivität (Daten nicht gezeigt). Daher wurde für die weiteren Experimente nur der Expressionsvektor mit C-terminal-markiertem Myc verwendet. Abbildung 3.18 zeigt die Ergebnisse des Luciferase-Reportertests für die ausgewählten Gene. Es wurden je 50 ng Promotor-Firefly-Luciferase-Reporterkonstrukte zusammen mit 100 ng SOX17-cMyc Expressionsvektor in HEK293 kotransfiziert. 6 h nach Transfektion wurde LiCl in einer Endkonzentration von 25 mM hinzugefügt. LiCl ist ein spezifischer Inhibitor der Glykogen Synthase Kinase 3 [156]. β -Catenin wird nicht mehr phosphoryliert und im Proteasom abge-



Abbildung 3.18: Steuerung der Expression endodermaler Kandidatengene durch SOX17 im Luciferase-Expressionstest. Promotoraktivität von 16 endodermalen Kandidatengenen in Abhängigkeit von SOX17 wurde mittels Luciferase-Expressionstests nachgewiesen. 50 ng Promotor-Firefly-Luciferasereporterkonstrukte wurden zusammen mit 100 ng SOX17-cMyc Expressionsvektor kotransfiziert. 6 h nach Transfektion wurde LiCl (25 mM Endkonzentration) hinzugefügt. Firefly- und Renillaluciferase-Aktivität wurden nach weiteren 18 h bestimmt und der Quotient aus Firefly- und Renilla-Luciferaseaktivität berechnet. Mit Hilfe der Negativkontrollen (kein SOX17, kein LiCl) wurden die Daten normalisiert. Als Positiv-Kontrolle wurde der *Hnf1b* Promotor untersucht, der eine etwa 1,5fach höhere Luciferaseaktivität (rote Linie) vorweist, wenn der SOX17-cMyc Expressionsvektor kotransfiziert wurde.

3 Ergebnisse

baut, sondern kann im Zellkern sowohl mit TCF/LEF als auch mit Sox17 und anderen Transkriptionsfaktoren der Sox-Familie interagieren und die Transkription zahlreicher Zielgene beeinflussen. Der *Hnf1b* Promotor zeigt eine mehr als 1,5 stärkere Luciferaseaktivität in HEK-293 Zellen, wenn der Sox17 Expressionsvektor kotransfiziert wird. Die Aktivierung des WNT-Signaltransduktionsweges durch LiCl alleine ist in der Lage, den *Hnf1b* Promotor zu stimulieren. SOX17 und LiCl haben auf die Promotoraktivität einen additiven Effekt. Von den ausgewählten Kandidaten zeigten die Promotoren der Gene 0610010012Rik, Ocln, Cdh6 und Rfx6 eine erhöhte Luciferaseaktivität, wenn SOX17 zusätzlich exprimiert wurde. Der Einfluß von LiCl und damit schließlich von β -Catenin und TCF/LEF auf die Promotoraktivität fällt unterschiedlich aus. Die Aktivität der Promotoren von Ocln und Cdh6 wird nicht zusätzlich durch das LiCl induzierte WNT-Signal beeinflusst. Auf die Promotoren der Gene 0610010012Rik, Rfx6 und 2210011C24Rikhat die Zugabe von 25 mM LiCl einen additiven Effekt. Die Pro-



Abbildung 3.19: Dosisabhängigkeit von SOX17 vermittelter Transkription endodermaler Gene. 50 ng Promotor-Firefly-Luciferasereporterkonstrukte wurden zusammen mit 0–250 ng SOX17-cMyc Expressionsvektor kotransfiziert. Als Transfektionskontrolle wurden 5 ng pTK-Renilla Plasmid transfiziert. Die transfizierte DNA Menge wurde mit Hilfe von zusätzlicher pUC19 Plasmid-DNA konstant gehalten. Transfektionen wurden in Triplikaten durchgeführt. 6 h nach Transfektion wurde LiCl in einer Endkonzentration von 25 mM hinzugefügt. Firefly- und Renillaluciferase-Aktivität wurden nach weiteren 18 h bestimmt und der Quotient aus Firefly- und Renilla-Luciferaseaktivität ermittelt. Die relativen Luciferaseaktivitäten wurden um die Leerwerte (kein SOX17, kein LiCl) korrigiert.

motoren der Gene 0610010O12Rik, Ocln, Cdh6 und Rfx6 zeigen zudem einen Dosisabhängigen Anstieg der Luciferaseaktivität in einem Bereich von 0–250 ng des Sox17cMyc Expressionsvektors. Auch hierbei zeigte sich, dass die LiCl vermittelte Stabilisierung von β -Catenin keinen Einfluss auf die Promotoraktivität der Gene Ocln und Cdh6 hat. In allen anderen Fällen führt 25 mM LiCl zu einer höheren Promotoraktivität mit (schwarz-gestrichelte Linie in Abbildung 3.19) und ohne (grau-gestrichelte Linie in Abbildung 3.19) Kotransfektion des Sox17-cMyc Expressionsvektors.

3.4.3.2 Identifizierung von Sox17-Bindestellen in den Promotoren der Kandidatengene

Potentielle SOX17 Bindestellen in den Promotoren der Gene 061000O12Rik, Rfx6, Cdh6, Ocln und Hnf1b (Positivkontrolle) wurden durch phylogenetisches Footprinting identifiziert [157]. Der von Lenhard et al. entwickelte Algorithmus des Programms ConSite setzt voraus, dass potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) in Promotorregionen zwischen ähnlichen Spezies phylogenetisch konserviert sind [158,159]. Untersuchungen von Sandelin et al. konnten zeigen, dass durch diese Spezies-übergreifende Analyse falsch-positive Vorhersagen von TFBS um bis zu 85% reduziert werden können, ohne die Sensitivität — im Vergleich zur Analyse einer einzelnen Sequenz — zu mindern [160].

Die Promotorsequenzen, die den klonierten DNA Fragmenten des Luciferase-Expressionstests entsprachen, wurden mit den homologen humanen Sequenzen verglichen. Für die Analysen der Gene Hnf1b, 061000012Rik, Rfx6, Cdh6 und Ocln wurde eine Konservierung von 70-80% als Grenze gesetzt. Der Grenzwert für einen erfolgreichen Treffer der Frequenzmatrix der Sox17 TFBS betrug 70%. Die Konservierung zwischen den Promotorsequenzen der Maus und des Menschen sind als Liniendiagramm in Abbildung 3.20 A dargestellt. Die Promotorsequenz der Maus ist entsprechend ihrer Koordinaten im UCSC Genome Browsers vom Juli 2007 annotiert. Die Frequenzmatrix für die Sox17 TFBS stammt aus der JASPAR Datenbank (http://jaspar.genereg.net/). Das entsprechende Sox17 Sequenzlogo ist in Abbildung 3.20 B dargestellt. In allen untersuchten Promotoren lassen sich durch phylogenetisches Footprinting potentielle Sox17 Bindestellen in konservierten Bereichen identifizieren (Abbildung 3.20). Im Hnflb Promotor, für den in Xenopus laevis eine direkte Aktivierung durch XSox17 nachgewiesen werden konnte [152,153], lassen sich innerhalb des Kernpromotors 500 bp stromaufwäts der Hnf1b TSS potentielle SOX17 Bindestellen sowohl in Positiv- als auch in Negativstrangorientierung identifizieren. Dabei entspricht das zentrale Sequenzmotiv 5'-ATTGT-3' einer Bindestelle dem bisher beschriebenen Motiv [161], das am häufigsten beobachtet wird. Dieses Motiv lässt sich auch im *Cdh6* Promotor wiederfinden.



Abbildung 3.20: Promotoranalyse ausgewählter Kandidatengene durch phylogenetisches Footprinting.



Abbildung 3.20 (Fortsetzung): Promotoranalyse durch phylogenetisches *Footprinting*. (A) Analysen wurden mit Hilfe des Programms *Consite* (http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/CONSITE/) durchgeführt. Grenzwerte für die Konservierung und für die Ähnlichkeit der Transkriptionsfaktormatrix wurden auf 70–80% bzw. 70% gesetzt. Das Analysefenster betrug 50 bp. Angegeben sind die Genomkoordinaten der Promotoren bezogen auf das Mausgenom (*UCSC Genome Browsers*; Juli 2007; NCBI/mm9) und der 5' Bereich der mRNA (RefSeq). Regionen mit TFBS wurden als multiple Sequenzvergleiche von 30 Vertebratenspezies vom *UCSC Genome Browser* bezogen und auf die angegebenen Spezies reduziert. Lücken im Alignment wurden entfernt. Die Orientierung der Sox17 Sequenzmotive ist durch (+) und (-) angedeutet. (B) Sox17 Sequenzlogo aus JASPAR und *de novo* Konsensusmotiv, berechnet aus den in (A) identifizierten SOX17 Bindestellen. Frequenzmatrix und Logo wurden mit BiPad (http://bipad.cmh.edu/) berechnet [162].

3 Ergebnisse

In den Promotoren der Gene 061000O12Rik, Rfx6 und Occludin kommt das Sequenzmotiv abgewandelt vor. Die identifizierten SOX17 Bindestellen der untersuchten fünf Promotoren wurden zur Berechnung eines Konsensusmotivs herangezogen. Abbildung 3.20 vergleicht das berechnete *de novo* Sequenzmotiv mit der in der JASPAR Datenbank hinterlegten TFBS von Sox17. Insgesamt ähneln sich beide Motive, jedoch scheint an der siebten Sequenzposition in den hier untersuchten Promotoren eine höhere Variabilität vorzuherrschen. Auch der Informationsgehalt jeder einzelnen Sequenzposition ist niedriger.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sich in den Promotoren der Gene *061000012Rik*, *Rfx6*, *Cdh6* und *Ocln*, die im Luciferase-Expressionstest durch das SOX17 Protein aktiviert wurden, Sox17 Bindemotive finden lassen. Dabei ähneln die berechneten Sequenzen dem in der Literatur beschriebenen Sox17 Bindemotiv. Inwieweit diese potentiellen SOX17 Bindestellen in den Promotoren der Kandidatengene eine Relevanz für die Transkription *in vivo* haben könnten, wird in Abschnitt 4.3.2 diskutiert.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine *Sox17*::DsRedExpress (*Sox17*::DsRed) ES Zelllinie für die Analyse endodermaler Entwicklungsvorgänge erfolgreich etabliert und analysiert. In den folgenden Abschnitten werden die Eigenschaften der ES Zelllinie — insbesondere ihr Nutzen für die Aufklärung endodermaler Identität im Rahmen des *in vitro* Modells diskutiert. In Abschnitt 4.1 werden die Eigenschaften des verwendeten Reportergens DsRedExpress, die Differenzierung der *Sox17*::DsRed ES Zelllinie *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell diskutiert. Der Abschnitt 4.2 vergleicht die Identität der differenzierten *Sox17*::DsRed ES Zellen, die sich aus dem Ergebnis der globalen Affymetrix-Analyse ergibt, mit dem derzeitigen Wissensstand über die Endodermentwicklung. Der Abschnitt 4.3 diskutiert die aus den Affymetrix-Analysen hervorgegangenen Gene, deren Rolle für den endodermalen Phänotyp bisher nicht beschrieben wurde, bevor schließlich der Abschnitt 4.4 einen kurzen Ausblick gibt.

4.1 Sox17::DsRed ES Zelllinie und Differenzierung

4.1.1 Verwendung von DsRed als Reportergen in vitro und in vivo

Für die Markierung endodermal differenzierter Zellen wurde der Leserahmen des Transkriptionsfaktors *Sox17* durch die kodierende Sequenz von DsRed mit einem zusätzlichen nukleären Lokalisationssignal (NLS) ersetzt. Die Entscheidung, die *Sox17* Expression mit Hilfe von DsRedExpress zu markieren, hatte drei Gründe:

(*i*) Während der Entstehung dieser Arbeit wurden im Rahmen des Europäischen Verbundprojektes *Functional Genomics in engineered ES cells* (FunGenES) weitere ES Zelllinien etabliert [163, 164], die als Modellsysteme für mesodermale und neuro-ektodermale Differenzierung von ES Zellen analysiert wurden. So wurde eGFP u.a. für die Markierung des mesodermalen Markers Brachyury (*T*) benutzt [165], und eCFP wurde für die Markierung des neuroektodermalen Markers *Pax6* verwendet [unveröffentlicht]. Durch die unterschiedliche Markierung sollte es möglich sein, Zelllinien mit mehreren fluoreszierenden Markern gleichzeitig zu markieren oder unterschiedlich markierte Zelllinien im Zellkultursystem voneinander zu unterscheiden. (ii) DsRedExpress ist eine Variante des rot-fluoreszierenden Proteins DsRed aus Discosoma sp. [166] und zeichnet sich durch eine geringere Restemission grüner Fluoreszenz aus [167]. DsRedExpress unterscheidet sich von DsRed durch den Austausch von insgesamt neun Aminosäuren, die die Löslichkeit des Proteins erhöhen und zu einer schnelleren Reifung des Proteins führen. Durch die höhere Löslichkeit von DsRedExpress wird die Tendenz zur Bildung von Proteinaggregaten verringert und damit die nachgewiesene Cytotoxizität von DsRed reduziert. Die hohe Cytotoxität von DsRed war insbesondere für die Etablierung von rot-fluoreszierenden ES Zellen und Mauslinien ein Problem. Ihre Etablierung gelang erst mit der Entwicklung verschiedener DsRed Varianten [168–170]. In der hier etablierten Sox17::DsRed ES Zelllinie traten während der endodermalen Differenzierung keine nachweisbaren Probleme durch Cytotoxizität auf. Aus der ES Zelllinie hervorgegangene, heterozygote Sox17^{DsRed/+} Mäuse waren lebensfähig und die Gesamtzahl heterozygoter Nachkommen entsprach der Erwartung nach Mendel. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es weder durch die Deletion eines Sox17 Allels durch DsRedExpress noch durch die Expression von DsRedExpress im endodermalen Gewebe zu einer erhöhten embryonalen Letalität kam.

(*iii*) Durch die N-terminale NLS Sequenz des Large T Antigens von SV40 kommt es zu einer Konzentration des fluoreszierenden Reporters im Zellkern. Dies führt zu einer Zunahme der Sensitivität und erlaubt die Detektion auch geringer Mengen des fluoreszierenden Proteins. Ein weiterer Vorteil der subzellulären Lokalisation des Reporters ist die höhere Auflösung einzelner Zellen *in vivo*. Schließlich scheint das nukleäre Fluoreszenzsignal unempfindlicher gegen Fixierungsartefakte zu sein [171].

4.1.2 Die Integration des DsRedExpress Reporters in den Sox17 Locus

Die Integration des DsRed ORFs in den *Sox17* Locus führt zur partiellen Deletion des Gens. Anstelle der vollständigen nativen *Sox17* mRNA wird ein Transkript gebildet, das aus den ersten drei Exons von *Sox17*, der untranslatierten Region von Exon4 sowie — beginnend vom endogenen *Sox17* Startcodon — aus der Reportergenkassette mit dem DsRedExpress ORF, einer IRES und einem Puromycinresistenzgen besteht. Aufgrund des SV40 Polyadenylierungssignals endet das Transkript hinter der Reportergenkassette. Das durch die genetische Manipulation nicht beeinträchtigte Exon 5 wird nicht verwirklicht. Eine Expression des alternativ gespleißten *Sox17* Transkripts, welchem die N-Terminale HMG-Box fehlt, wird durch die Integration der DsRed Kassette nicht verhindert, wurde aber in dieser Arbeit auch nicht nachgewiesen. Lediglich die Expression beider Transkripte in EB-differenzierten ES Zellen konnte nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Kanai *et al.* zeigten, dass die beiden Spleißvarianten in der Lunge und im Hoden adulter Mäuse exprimiert werden, wobei sich in der Lunge nur eine schwache Expression

der kurzen *Sox17* Variante (t-Sox17) nachweisen lässt [99]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expressionstärke von t-Sox17 während der präpubertären Entwicklung ab der Geburt bis zur Adoleszenz im Hodengewebe zunimmt. Während der pränatalen Entwicklung des Hodens zwischen Tag7 und Tag28 findet in den männlichen Keimzellen ein Wechsel der Expressionsstärke beider Spleißvarianten statt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass t-SOX17 aufgrund des Fehlens der HMG-Box nicht die Fähigkeit zur DNA Bindung besitzt. Im Gegensatz zu SOX17 ist das t-Sox17 Protein nicht in der Lage, die Expression eines Luciferase-Reportergens zu aktivieren. Die Funktion von t-Sox17 *in vivo* bleibt bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

4.1.3 Differenzierung der Sox17::DsRed ES Zelllinie in vitro

Die spontane Differenzierung embryonaler Stammzellen nach Entzug von LIF im Monolayer führt in vitro zur Bildung von Zelltypen aller Keimblattderivate. Heo et al. zeigten durch die globale Analyse des Transkriptoms, dass spontan differenzierende ES Zellen vor allem Gene exprimieren, die in der embryonalen Entwicklung und insbesondere bei Morphogenese und Musterbildung eine Rolle spielen. Dabei änderte sich das globale Genexpressionsmuster in den ersten zwei Wochen der Differenzierung zunächst dramatisch, bevor es sich schließlich stabilisierte. Ektodermale Marker wurden im Verlauf der Differenzierung herunterreguliert, während mesodermale und endodermale Gene in der ersten und zweiten Woche heraufreguliert wurden [172]. Eine genaue Betrachtung der Daten von Heo et al. zeigte, dass die endodermalen Marker FoxL1, Nodal, Gata5, Hhex und Afp differentiell exprimiert wurden, während eine Sox17 Expression nicht nachgewiesen werden konnte. Ob das Fehlen der Expression von Sox17, dem Schlüsselgen endodermaler Differenzierung, durch ein zu niedriges Expressionsniveau erklärt werden kann, wurde nicht diskutiert, lässt aber vermuten, dass die spontane Differenzierung embryonaler Stammzellen durch LIF Entzug nicht geeignet ist, um Sox17-positive Zellpopulationen in ausreichendem Maße zu generieren. Dies zeigten auch die Ergebnisse dieser Arbeit. LIF Entzug *in vitro* ist hinreichend, um die ungerichtete Differenzierung in Sox17::DsRed ES Zellen zu induzieren, aber nicht ausreichend zur Aktivierung der Expression des DsRed Transgens unter der Kontrolle des Sox17 Promotors. Das heißt, unter diesen Bedingungen können endodermale Sox17::DsRed⁺ Zellen nicht mittels Fluoreszenzmikroskopie oder FACS nachgewiesen und isoliert werden.

Vergleich der *Embryoid Body* Differenzierung mit Suspensionsprotokoll und "Hängender-Tropfen"-Methode

Die Differenzierung der Sox17::DsRed ES Zellen in EBs im hängenden Tropfen in LIFfreiem Iscove's modifiziertem Medium bei einer hohen FCS Konzentration führte zur Expression des DsRedxpress Transgens in bis zu 10% der differenzierten Zellpopulation nach acht Tagen (Abbildung 3.6). Die Induktion von EB Differenzierung direkt in Suspension führte zur Bildung von EBs, die (i) im Vergleich zur "Hängender-Tropfen"-Methode generell kleiner (Durchmesser und Zellzahl) und (ii) inhomogen in Größe und Form waren. Diese Unterschiede der EBs lassen sich direkt aus den verschiedenen Startbedingungen beider Protokolle ableiten: im hängenden Tropfen aggregieren am Meniskus des Tropfens durch die Schwerkraft stets gleich viele ES Zellen zu einer Kugel; in Suspensionskultur sind Größe und Form vom Dissoziationsgrad der ES Zell Cluster bestimmt. Neben dem Suspensions- und dem "Hängenden-Tropfen"-Protokoll haben sich noch weitere Methoden der EB Differenzierung etabliert. Kurosawa et al. geben einen Überblick über EB Methoden und deren spezifische Vor- und Nachteile [144]. Entscheidend für die Verwendung der technisch aufwendigeren "Hängender-Tropfen"-Methode in dieser Arbeit war jedoch, dass Suspensions EBs eine zu geringe Expression des DsRed-Express Transgens zeigten. Bei niedriger Anfangszellzahl kann eine Differenzierung der ES Zellen im EB in alle drei Keimblätter nicht gewährleistet werden [173]. Dass eine effiziente Endodermdifferenzierung in EBs von der Zahl der Zellen zu Beginn der Differenzierung abhängt, wurde ebenso von Koike et al. beschrieben [174].

Primitives Endoderm als Ursprung extraembryonaler Zelltypen

EBs gelten als *in vitro* Modell für die Präimplantationsentwicklung und frühe Gastrulation [107]. Weitzner verglich die ersten 5–6 Tage der EB Differenzierung mit der Prägastrulationsentwicklung des Mausembryos [107]. Nach Aggregation der ES Zellen bildeten sich nach einem Tag kleine Sphären mit einem Durchmesser von etwa 50 μ m und einer irregulären Oberfläche. Nach 2–3 Tagen besaßen diese EBs eine kompaktere Struktur und eine glatte Oberfläche. Diese frühen EBs ließen sich mit dem Stadium der Morula vergleichen, die sich ebenfalls zu einer kompakteren Struktur weiterentwickelt. Allerdings ist die Zellzahl eines EBs mit 300–700 Zellen signifikant höher. An Tag 3–4 — die EBs haben eine Größe von 100 μ m — beginnen einzelne Zellen auf der EB Oberfläche Marker des primitiven Endoderms zu exprimieren. Ab Tag 5 der EB Differenzierung ist die gesamte Oberfläche der EBs durch primitives Endoderm bedeckt [175, 176] — dies konnte in dieser Arbeit ebenfalls eindrucksvoll durch die Expression des DsRed Transgens gezeigt werden. Die Transkriptionsfaktoren *Gata4*, *Gata6* und *Sox17* sind Schlüsselfaktoren bei der Bildung des PrEs im Präimplantationsembryo [68]. Cai *et al.* analysierten die Dynamik der Expression von *Gata4* und *Gata6* und zeigten, dass im PrE beide Transkriptionsfaktoren exprimiert werden [177]. Zunächst wird *Gata6*, dann werden *Gata4* und *Sox17* exprimiert [178, 179].

Die Sox17 Expression während der EB Differenzierung konnte in dieser Arbeit mit Hilfe des DsRed Transgens rekapituliert werden. Die DsRed Expression ließ sich vor allem auf der oberen Zellschicht, die EB und Medium abgrenzt, beobachten (Abbildung 3.6 A). Gata Transkriptionsfaktoren konnten noch an Tag8 der EB Entwicklung durch die Affymetrix-Analysen nachgewiesen werden (Abschnitt 4.2). Sowohl Gata4 und Gata6 aber auch Pdgrf2 waren im Vergleich zur undifferenzierten ES Zellpopulation in den Sox17::DsRed⁺ Zellen heraufreguliert. Gata4 und Gata6 waren stärker in Sox17::DsRed⁺ als in Sox17::DsRed⁻ Zellen exprimiert (Abbildung 3.12). Die Expression der Differenzierungsmarker in den Sox17::DsRed ES Zellen ist verbunden mit der Herunterregulierung der Stammzellmarker Oct4, Nanog und Sox2 (Abbildung 3.11). Sie ist damit kongruent zu den in der Literatur beschriebenen Prozessen während der Differenzierung. Oct4 beeinflusst die Differenzierung von primitivem Ekto- und Endoderm negativ [180, 181]. Herunterregulierung von Nanog während der ES Zell Aggregation in EBs induziert per se die Differenzierung von primitivem Endoderm [182]. Erst kürzlich zeigten Niakan et al., dass Sox17 zusätzlich zur Aktivierung extraembryonaler Genexpression die Selbsterneuerung von ES Zellen inhibiert [101].

Viscerales und parietales Endoderm

VE und PE bilden sich zeitlich vor dem DE und leiten sich vom PrE ab. $Gata6^{-/-}$ Mäuse sterben zwischen den Embryonalstadien E 5,5–E 7,5 aufgrund einer defekten VE Differenzierung [64]. $Gata4^{-/-}$ Mäuse sterben aufgrund gestörter Morphogenese des Herzens zwischen E 8,0 und E 9,0 [183, 184]. $Gata4^{-/-}$ ES Zellen können jedoch zu Kardiomyocyten differenziert werden, zeigen aber einen partiellen Defekt bei der Bildung von VE und DE des Vorderdarms [185]. Die Überexpression von *Gata4* oder *Gata6* in ES Zellen ist ausreichend, um eine Differenzierung zu ExE zu induzieren [70].

Das primitive Endoderm differenzierte in Abhängigkeit von *Gata4* und *Gata6* in PE und VE und bildete zystische Strukturen an Tag 8–10 in einigen EBs, die homolog zu Strukturen des visceralen Dottersacks im Postimplantationsembryo sind. Die *Sox17*::DsRed⁺ Zellen der EBs auf der Oberfläche bildeten zudem ein zusammenhängendes Epithel und spiegelten somit morphologische und funktionale Eigenschaften ExEs wider (Abbildung 3.6 A). Neben *Gata4* wurden die Marker *Hnf1b* (*Tcf2*), *Hnf3a* (*Foxa1*), *Hnf3b* (*Foxa2*), *Hnf4a* und der ExE-spezifische Transkriptionsfaktor *Sox7* in *Sox17*::DsRed⁺ EB Zellen exprimiert (Abbildung 3.12). Die Expression dieser Gene ist damit kongruent zu bisher

veröffentlichten Studien [186,187]. Zusätzlich zu den Transkriptionsfaktoren wurden die Serumproteine *Afp* und *Ttr* (nicht gezeigt) und das für die Etablierung der epithelialen Identität endodermaler Zellen wichtige Gen *Dab2* exprimiert. Darüber hinaus zeigte die GO-Analyse (diskutiert in Abschnitt 4.2.3), dass neben ExE-spezifischen Transkriptionsfaktoren und Serumproteinen viele Strukturproteine, die am Aufbau von *tight junctions* im Epithel von ExE und DE abgeleiteten Geweben beteiligt sind, in den Sox17::DsRed⁺ Zellen heraufreguliert sind.

Definitives Endoderm innerhalb der Embryoid bodies

Außer auf der EB Oberfläche exprimierten auch Zellen im Inneren der EBs das Reportergen und ließen sich damit eindeutig als endodermale Zellen identifizieren. Bisherige Untersuchungen bewiesen, dass EBs darmähnliche duktuale Strukturen bilden können [188]. Diese Strukturen lassen sich durch ihre röhrenförmigen Hohlräume beschreiben, die sich durch eine epitheliale Schicht zur restlichen Zellmasse des EBs abgrenzen. Für die Bildung dieser duktualen Strukturen ist die Expression von Genen nötig (Tabelle 4.8), die in den endodermalen *Sox17*::DsRed⁺ Zellen deutlich angereichert waren und im Abschnitt 4.2.3 im Rahmen der Gen-Ontologie diskutiert werden. Der embryonale Darm entwickelt sich während der Embryogenese aus dem DE und besitzt damit einen anderen Ursprung als das PrE, VE oder PE. Das DE entsteht im Embryo zwischen den Stadien E 6,0–7,5 während der Gastrulation im anterioren Bereich des Knotens. Es leitet sich gemeinsam mit dem Mesoderm von einer Vorläuferzellpopulation, dem Mesendoderm, ab. Die Bildung dieser Vorläuferzellen aus Zellen des Epiblasten ist abhängig von der epithelialen-mesenchymalen Transition und der Wanderung der Zellen durch den Primitivstreifen. Auf molekularer Ebene spielen dabei NODAL/Activin A Signale des TGF- β -Signalwegs eine zentrale Rolle. In murinen und humanen ES Zellen konnte gezeigt werden, dass durch Aktivierung des TGF-β-Signalwegs durch Activin A gezielt mesendodermale Zellen im EB induziert werden können [110]. Hohe Dosen Activin A begünstigen die weitere Differenzierung von Mesendoderm zugunsten der Bildung von DE [108, 111]. Yasunaga et al. konnten die Induktion von definitivem Endoderm in EBs durch Activin A auf molekularer Ebene genauer abgrenzen [109]. Dabei unterscheiden sich VE und DE und naszierendes Mesoderm durch die Expression des Chemokinrezeptors Cxcr4 voneinander. Cxcr4 ließ sich auch in den Sox17::DsRed⁺ Zellen durch die Affymetrix-Analysen nachweisen (Abbildung 3.12), wobei Cxcr4 allein nicht ausreichend ist, um das DE zu charakterisieren. Erst die Kombination des pan-endodermalen Markers Sox17 zusammen mit Cxcr4 identifiziert das DE. Die Arbeitsgruppe von Prof. A.M. Wobus zeigte zudem, dass die Induktion von DE in der hier charakterisierten Sox17::DsRed ES Zelllinie zu einer höheren Zahl DsRed⁺ Zellen innerhalb der EBs führte und dass

gleichzeitig die Bildung duktualer Strukturen im Inneren des EBs erhöht ist [Schröder *et al.*, eingereicht]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die *Sox17*::DsRed⁺ Zellen innerhalb der EBs eine gemischte Population aus PrE, PE und VE sowie DE darstellten und sich durch die Expression von typischen Markern charakterisieren ließen. Eine Unterscheidung der Endodermderivate lässt sich anhand des pan-endodermalen Markers *Sox17* nicht treffen.

4.1.4 Phänotypen transgener Sox17::DsRed Mäuse

Die hier beschriebene homozygote Sox17^{DsRed/DsRed} Mauslinie ist in der Lage, die verkürzte Spleißvariante des Transkriptionsfaktors Sox17 (t-Sox) zu exprimieren. Mauslinien, die eine vollständige Deletion beider Sox17 ORFs aufweisen — entweder durch die Deletion von Exon 2-5 [84] oder durch den Ersatz der kodierenden Sequenz des Exon 4 und 5 mit der Sequenz von GFP [103] - zeigen keine phänotypischen Unterschiede. Die Defekte homozygoter Sox17^{DsRed/DsRed} Mäuse zwischen E 8,5 und E 12,5 der embryonalen Entwicklung sind vergleichbar mit den Phänotypen der Mauslinien, die einen vollständig deletierten Sox17 Locus vorweisen. Die knock-out Embryonen zeichnen sich (i) durch die fehlende Rotation der Körperachse zwischen Tag 8,5 und 9,5 p.c., (ii) durch eine fehlerhafte Ausbildung posteriorer Strukturen und (iii) durch die Retardierung des Wachstums aus. (Abbildung 3.8). In den homozygoten Sox17 knock-out Mauslinien wird der genetische Defekt des Sox17 Allels bis zu Tag 10,5 p.c. der Embryonalentwicklung entsprechend des zu erwartenden Verhältnisses nach Mendel vererbt. Ab Tag 10,5 p.c. verringert sich das Mendelverhältnis zwischen homozygoten Sox17^{DsRed/DsRed} und heterozygoten Sox17^{DsRed/+} Mäusen. In Stadien älter als E 12,5 ist die Mutation embryonal letal (Tabelle 3.5). Eine mögliche Funktion von t-Sox17 während der Embryonalentwicklung kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, spielte aber für die Ausbildung des beschriebenen Phänotyps der Sox17 Deletion keine Rolle. Die in vivo Expression des Transgens in E7,0–8,0 alten Sox17^{DsRed/+} Embryonen war auf Strukturen des endodermalen Keimblatts beschränkt (Abbildung 3.7) und stützt damit die Ergebnisse der in vitro Versuche: die Transgenexpression der etablierten Sox17::DsRed ES Zelllinie ist vom Sox17 Promotor abhängig und ist in der frühen Embryogenese auf das ExE und DE beschränkt. Sox17 Promotor-unabhängige Expression von DsRed konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2 Affymetrix-Analyse des *Sox17*::DsRed⁺ Transkriptoms

4.2.1 FACS Isolierung Sox17::DsRed-exprimierender Zellpopulationen

Die Isolierung homogener Zellpopulationen stellt ein zentrales Problem bei der systematischen Analyse des Transkriptoms zur Aufklärung von Differenzierungs- und Entwicklungsvorgängen dar. Zur Lösung dieses Problems wurden verschiedene Strategien entwickelt. Es wurde versucht, durch die Optimierung von Zellkulturbedingungen ES Zellen möglichst homogen in nur einen Zelltypen zu differenzieren, so dass eine Anreicherung der zu untersuchenden Zellpopulation nach Differenzierung für die weitere Charakterisierung nicht mehr nötig war. Dies ist allerdings oft nicht möglich, da die Differenzierung von ES Zellen von einer Vielzahl von Faktoren abhängt, die in vitro nicht immer erfüllt werden können. Vor allem für die Differenzierung wichtige spezifische Zell-Zell-Kontakte, räumliche Interaktion mit anderen Geweben und Konzentrationsgradienten von Wachstumsfaktoren lassen sich in der Zellkulturschale nur schwer nachbilden. Der hier beschriebene Unterschied in der DsRed Expression bei Differenzierung in Suspensionskultur und EBs unterstreicht dieses Problem. Die EBs bilden eine geeignete Mikroumgebung für die endodermale Differenzierung Sox17-positiver Zellen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. A.M. Wobus konnte gezeigt werden, dass die Bildung mesendodermaler Zellen und damit auch von Zellen des DEs durch Activin A im EB um den Faktor 8 gesteigert werden kann [Schröder et al., eingereicht]. Dennoch, um das Transkriptom endodermaler Zellen erfolgreich aufzuklären, muss eine möglichst homogene endodermale Zellpopulation erreicht werden. Eine Möglichkeit homogene Zellpopulationen aufzureinigen, ist die Verwendung einer Antibiotikaresistenz, die nur in der erwünschten Zellpopulation exprimiert wird. So konnten beispielsweise mesodermale Zellen, die Puromycin::eGFP unter der Kontrolle des Brachyury Promotors exprimierten, isoliert und analysiert werden [165]. Dies gelang nicht im Fall der Sox17::DsRed ES Zelllinie, die ebenfalls das Puromycinresistenzgen stromabwärts hinter einer IRES kodiert, da eine effiziente endodermale Differenzierung unter Puromycinselektionsdruck nicht erfolgreich war (Daten nicht gezeigt). Die erfolgreiche Isolierung endodermaler Sox17-positiver Zellen gelang jedoch durch die direkte Verwendung des DsRed Reporters in Kombination mit einer FACS Anreicherung auf über 90% und ermöglichte somit die Analyse des *Sox17*-spezifischen Transkriptoms (Abschnitt 3.3.1).

4.2.2 Hybridisierung der Affymetrix-Arrays

RNAs von *Sox17*::DsRed-positiven und -negativen Zellen acht Tage alter EBs wurden erfolgreich auf Affymetrix-Arrays hybridisiert. Zur Kontrolle wurde RNA von undiffe-

renzierten ES Zellen verwendet. Hierarchische Clusteranalyse identifizierte das *Sox17*spezifische Transkriptom. Die Betrachtung und Diskussion einzelner Markergene zeigte, dass die *Sox17*::DsRed⁺-Population Zellen aller endodermaler Derivate umfasste (Abschnitt 4.1.3). Darüber hinaus zeigte eine Hauptkomponentenanalyse (Daten nicht gezeigt), dass sich das globale Transkriptom der undifferenzierten *Sox17*::DsRed ES Zellen stärker vom differenzierten Zustand unterscheidet als die differenzierten *Sox17*::DsRed⁺und *Sox17*::DsRed⁻-Populationen untereinander. Weitere Informationen über das *Sox17*spezifische Transkriptom konnte durch die Analyse der Gen-Ontologie herauf- und herunterregulierter Gene erhalten werden. Diese Ergebnisse werden im folgenden Kapitel diskutiert.

4.2.3 Gen-Ontologie

Die Analyse der Gen-Ontologie von Transkripten in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen lieferte Hinweise auf die Identität dieser acht Tage alten EB Zellen. Die GO-Terme "apical junction complex", "apicolateral plasma membrane", "intercellular junction" und "cell junction" deuten direkt auf Funktionen hin, die endodermale Gewebe während der Embryonalentwicklung übernehmen. Nicht nur viscerale Endodermderivate wie z.B. der viscerale Anteil des Dottersacks, sondern auch der primitive embryonale Darm bilden eine dichte epitheliale Barriere zwischen Embryo und extraembryonalem Kompartiment bzw. dem intestinalen Lumen. Beide Derivate besitzen im Embryonalstadium morphologische und funktionale Gemeinsamkeiten und sind als hochspezialisierte polarisierte Epithelien organisiert. Die apikal-laterale Plasmamembran besitzt eine Vielzahl von *tight junctions*, so dass es nicht verwundert, auch den entsprechenden *KEGG Pathway* in der Liste zu finden (Tabelle 3.9). Ein Großteil dieser Gene sind Membranproteine, die direkt am Aufbau der Zell-Zell-Kontakte beteiligt sind. Dazu gehören beispielsweise Occludin (*Ocln*) und vor allem Vertreter der Claudinfamilie, deren Expression gewebespezifisch ist (Abbildungen im Anhang A.2 und Tabelle 4.1).

Probeset			Expressionsänderung		
	Symbol	Name	ES vs. Sox17	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺
1416697_at	Dpp4	dipeptidylpeptidase 4	1.24	14.36	11.57
1439427_at	Cldn9	claudin 9	-1.83	5.22	9.54
1417845_at	Cldn6	claudin 6	1.89	11.44	6.05
1448873_at	Ocln	occludin	2.48	13.36	5.39
1448393_at	Cldn7	claudin 7	2.20	11.22	5.10
1426914_at	Marveld2	MARVEL (membrane-associating) domain contai- ning 2	5.16	24.16	4.68

Tabelle 4.1

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

4 Diskussion

			Expressionsänderung		
Probeset	Symbol	Name	ES vs. Sox17	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺
1434851_s_at	Crb3	crumbs homolog 3 (Drosophila)	-1.48	2.99	4.42
1424409_at	Cldn23	claudin 23	1.07	4.39	4.08
1421156_a_at	Dsc2	desmocollin 2	1.76	6.81	3.87
1439476_at	Dsg2	desmoglein 2	-1.67	2.12	3.55
1424842_a_at	Arhgap24	Rho GTPase activating protein 24	1.55	5.12	3.29
1426010_a_at	Epb4.113	erythrocyte protein band 4.1-like 3	3.43	9.99	2.91
1418984_at	Inadl	InaD-like (Drosophila)	2.76	7.87	2.85
1448955_s_at	Cadps	Ca ²⁺ -dependent activator protein for secretion	1.67	4.62	2.77
1424595_at	F11r	F11 receptor	1.49	3.92	2.64
1435511_at	Syn2	synapsin II	1.45	3.78	2.60
1427610_at	Dsp	desmoplakin	1.68	4.22	2.51
1441927_at	Syt7	Synaptotagmin VII	1.01	2.53	2.50
1451499_at	Cadps2	Ca ²⁺ -dependent activator protein for secretion 2	1.13	2.65	2.35
1423271_at	Gjb2	gap junction membrane channel protein beta 2	1.06	2.42	2.29
1460569_x_at	Cldn3	claudin 3	-1.04	2.20	2.28
1422629_s_at	Shroom3	shroom family member 3	1.37	3.05	2.22
1454890_at	Amot	angiomotin	151.86	320.26	2.11
1420518_a_at	Igsf9	immunoglobulin superfamily, member 9	1.39	2.91	2.09
1435155_at	Cgn	cingulin	1.11	2.31	2.08
1435624_at	9030409G11Rik	RIKEN cDNA 9030409G11 gene	1.11	2.27	2.04
1434089_at	Synpo	synaptopodin	2.88	5.87	2.04

Tabelle 4.1: Transkripte mit den Annotierungen "cell junction" (GO:0030054), "intercellular junction" (GO:0005911), "apical junction complex" (GO:0043296), die in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen hochreguliert sind (\geq 2fach, Student's *t*-Test *p*-Wert \leq 0,05). Die Expressionsänderung ist durch paarweisen Vergleich von undifferentierten *Sox17*::DsRed ES und *Sox17*::DsRed⁻ Zellen, von undifferentierten ES und endodermal differenzierten *Sox17*::DsRed⁺ Zellen, sowie von *Sox17*::DsRed⁻ und *Sox17*::DsRed⁺ Zellen berechnet worden.

		Name	Exj	Expressionsänderung		
Probeset	Symbol		ES vs. Sox17 ⁻	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺	
1439427_at	Cldn9	claudin 9	-1.83	5.22	9.54	
1417845_at	Cldn6	claudin 6	1.89	11.44	6.05	
1448873_at	Ocln	occludin	2.48	13.36	5.39	
1423952_a_at	Krt7	keratin 7	-1.18	4.48	5.30	
1448393_at	Cldn7	claudin 7	2.20	11.22	5.10	
1434851_s_at	Crb3	crumbs homolog 3 (Drosophila)	-1.48	2.99	4.42	
1424409_at	Cldn23	claudin 23	1.07	4.39	4.08	
1426911_at	Dsc2	desmocollin 2	4.69	17.72	3.78	
1439476_at	Dsg2	desmoglein 2	-1.67	2.12	3.55	
1420484_a_at	Vtn	vitronectin	1.19	4.14	3.48	
1426010_a_at	Epb4.1l3	erythrocyte protein band 4.1-like 3	3.43	9.99	2.91	
1418984_at	Inadl	InaD-like (Drosophila)	2.76	7.87	2.85	

Tabelle 4.2

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

			Expressionsänderung		
Probeset	Symbol	Name	ES vs. Sox17	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺
1449465_at	Reln	reelin	18.23	50.72	2.78
1448169_at	Krt18	keratin 18	23.60	65.27	2.77
1424595_at	F11r	F11 receptor	1.49	3.92	2.64
1423691_x_at	Krt8	keratin 8	34.07	80.98	2.38
1422079_at	Prkch	protein kinase C, eta	1.91	4.44	2.32
1423271_at	Gjb2	gap junction membrane channel protein beta 2	1.06	2.42	2.29
1460569_x_at	Cldn3	claudin 3	-1.04	2.20	2.28
1424051_at	Col4a2	procollagen, type IV, alpha 2	9.26	19.72	2.13
1426348_at	Col4a1	procollagen, type IV, alpha 1	5.01	10.65	2.13
1435155_at	Cgn	cingulin	1.11	2.31	2.08
1424113_at	Lamb1-1	laminin B1 subunit 1	2.32	4.81	2.07

(Fortsetzung)

Tabelle 4.2: Transkripte mit den Annotierungen KEGG_PATHWAY "tight junction" (mmu04530) und "cell communication" (mmu01430), die in *Sox17::DsRed*⁺ Zellen hochreguliert sind (\geq 2fach, Student's *t*-Test *p*-Wert \leq 0,05). Die Expressionsänderung ist durch paarweisen Vergleich von undifferentierten *Sox17::DsRed* ES und *Sox17::DsRed*⁻ Zellen, von undifferentierten ES und endodermal differenzierten *Sox17::DsRed*⁺ Zellen, sowie von *Sox17::DsRed*⁻ und *Sox17::DsRed*⁺ Zellen berechnet worden.

Interessant ist die Überrepräsentation der GO-Kategorien mit den GO-Termen "angiogenesis", "vasculature developement" sowie "blood vessel morphogenesis" und "blood vessel development", die entsprechend ihrem niedrigem Fisher's Exact Test p-Wert besonders ins Gewicht fällt. Auch Sox17 ist diesen GO-Termen zugeordnet. Die Annotierungen für die wissenschaftlich akzeptierte zentrale Rolle des Sox17 Transkriptionsfaktors für endodermale Differenzierung während der Embryogenese fehlen. Bei näherer Betrachtung zeigt sich jedoch, dass die Annotierung des Sox17 Gens auf nicht kuratierten elektronischen Sequenzvergleichen oder automatisierten Datenbankrecherchen beruht und unvollständig oder sogar fehlerhaft sein kann. Die GO-Annotierung von Sox17 ist vom eng verwandten Sox18 Gen abgeleitet. Sox18, ebenfalls zur Gruppe F der Sry-Box-ähnlichen Transktiptionsfaktoren gehörend, spielt bei der Bildung von Blutgefäßen und der Angiogenese eine Rolle [98]. Matsui et al. erbrachten einen direkten Beweis einer redundanten Sox17 Funktion bei der Neovaskularisierung in Sox17^{+/-}-Sox18^{-/-} doppelmutanten Mäusen [189]. Darüber hinaus konnte kürzlich eine transgene Cre-Mauslinie etabliert werden, die eine vom Sox17 Promotor getriebene und für arterielle Blutgefäße spezifische Cre-Expression aufweist [190]. Sox18 wiederum ist sowohl in der Sox17::DsRed⁻ als auch in den Sox17::DsRed⁺ Zellpopulation gleich stark exprimiert, kann aber in undifferenzierten Sox17 ES Zellen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die in Sox17::DsRed⁺ Zellen heraufregulieren Transkripte, die mit den GO-Termen "angiogenesis", "vasculature development" sowie "blood vessel morphogenesis" und "blood vessel development" annotiert sind.

				Expressionsänderung		
Probeset	Symbol	Name	ES vs. Sox17 ⁻	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺	
1448649_at	Епрер	glutamyl aminopeptidase	1.40	17.76	12.71	
1449031_at	Cited1	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1	4.90	28.19	5.76	
1450717_at	Ang1	angiogenin, ribonuclease A family, member 1	-1.01	4.28	4.31	
1429177_x_at	Sox17	SRY-box containing gene 17	1.26	5.16	4.09	
1450704_at	Ihh	Indian hedgehog	1.53	6.06	3.96	
1416729_at	Plg	plasminogen	-1.06	3.15	3.33	
1424842_a_at	Arhgap24	Rho GTPase activating protein 24	1.55	5.12	3.29	
1421943_at	Tgfa	transforming growth factor alpha	1.30	4.22	3.25	
1418572_x_at	Tnfrsf12a	tumor necrosis factor receptor superfamily, mem- ber 12a	1.17	3.79	3.23	
1419309_at	Pdpn	podoplanin	-1.06	2.72	2.88	
1451756_at	Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1	4.31	12.15	2.82	
1429514_at	Ppap2b	phosphatidic acid phosphatase type 2B	-1.14	2.16	2.46	
1448710_at	Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	8.93	20.53	2.30	
1424552_at	Casp8	caspase 8	3.18	7.29	2.29	
1424051_at	Col4a2	procollagen, type IV, alpha 2	9.26	19.72	2.13	
1426397_at	Tgfbr2	transforming growth factor, beta receptor II	3.28	6.98	2.13	
1454890_at	Amot	angiomotin	151.86	320.26	2.11	

Tabelle 4.3: Transkripte mit den Annotierungen "angiogenesis" (GO:0001525), "vasculature development" (GO:0001944), "blood vessel morphogenesis" (GO:0048514) and "blood vessel development" (GO:0001568), die in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen hochreguliert sind (\geq 2fach, Student's *t*-Test *p*-Wert \leq 0,05). Die Expressionsänderung ist durch paarweisen Vergleich von undifferentierten *Sox17*::DsRed ES und *Sox17*::DsRed⁻ Zellen, von undifferentierten ES und endodermal differenzierten *Sox17*::DsRed⁺ Zellen, sowie von *Sox17*::DsRed⁻ und *Sox17*::DsRed⁺ Zellen berechnet worden.

Die Gene *Lhx1* (LIM homeobox protein), *Tcf2* (Transcription factor 2) und *Pax9* (Paired box gene 9) fallen in die GO Kategorie "endoderm development" (Tabelle 4.5). *Lhx1* wird in der Maus im anterioren visceralen Endoderm (AVE) und in Geweben des Primitivstreifens exprimiert. *Lhx1* besitzt im AVE eine induktive Funktion bei der Bildung embryonaler Kopfstrukturen anterior des Primitivstreifens [77]. Ein Zusammenhang zwischen *Pax9* Funktion und der Entwicklung von Thymus, Schild- und Nebenschilddrüse sowie Pharynx, die sich aus dem Endoderm der Branchialbögen ableiten, konnte ebenfalls gezeigt werden [191]. Zusätzlich spielt *Pax9* eine Rolle bei einer Vielzahl anderer Entwicklungsvorgänge wie zum Beispiel bei der Bildung des Sklerotoms der Wirbelsäule und der Gliedmaßen sowie bei der Zahnmorphogenese [191–194]. Schließlich ist auch *Tcf2* (*Hnf1b*), ein direktes Zielgen von Sox17, mit einer Expressionsänderung von 4,89fach gegenüber undifferenzierten ES Zellen und einer Änderung von 3,88-fach gegenüber *Sox17*::DsRed⁻ Zellen der GO-Kategorie "endoderm development" zugeordnet.

Die Expression von *Gata4*, ein Transkriptionsfaktor von zentraler Bedeutung für die Endodermentwicklung, ist im Vergleich zu undifferenzierten *Sox17*::DsRed ES Zellen in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen um den Faktor 27,73 erhöht. Die Expressionsänderung in *Sox17*::DsRed⁻ Zellen um den Faktor 10.72 in Relation zum nicht-differenzierten ES Zell Status lässt sich durch eine weitere Funktion von *Gata4* bei der Differenzierung von kardialem Mesoderm und der Herzmorphogenese erklären [184,195]. *In vitro* führt eine Inhibierung der *Gata4* Funktion durch das anti-sense Transkript in sich differenzierenden ES Zellen zu einer verminderten Expression kardialer Markergene und zur Blockierung der Differenzierung schlagender Kardiomyocyten [196]. Die Überexpression von *Gata4* kann währenddessen zu einer verstärkten Bildung von kardialem Mesoderms führen [197]. Vergleicht man die Expression von *Gata4* in *Sox17*::DsRed⁻ und *Sox17*::DsRed⁺ Zellen, ändert sie sich noch um einen Faktor von 2,59. Die zentrale Bedeutung von *Gata4* spiegelt sich in seiner GO-Annotierung wider. So ist *Gata4* in den Listen der Transkripte überrepräsentierter GO-Annotierungen häufig vertreten (Tabellen 4.4, 4.6 und 4.8).

Probeset			Exj	Expressionsänderung		
	Symbol	Name	ES vs. Sox17	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺	
1454890_at	Amot	angiomotin	151.86	320.26	2.11	
1418863_at	Gata4	GATA binding protein 4	10.72	27.73	2.59	
1421951_at	Lhx1	LIM homeobox protein 1	2.87	14.49	5.06	
1429514_at	Ppap2b	phosphatidic acid phosphatase type 2B	-1.14	2.16	2.46	

Tabelle 4.4: Transkripte mit den Annotierungen "gastrulation" (GO:0048276) und "gastrulation with mouthforming second" (GO:0001702), die in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen hochreguliert sind (\geq 2fach, Student's *t*-Test *p*-Wert \leq 0,05). Die Expressionsänderung ist durch paarweisen Vergleich von undifferentierten *Sox17*::DsRed ES und *Sox17*::DsRed⁻ Zellen, von undifferentierten ES und endodermal differenzierten *Sox17*::DsRed⁺ Zellen, sowie von *Sox17*::DsRed⁻ und *Sox17*::DsRed⁺ Zellen berechnet worden.

		bol Name	Ex	Expressionsänderung		
Probeset	Symbol		ES vs. Sox17 ⁻	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺	
1421951_at	Lhx1	LIM homeobox protein 1	2.87	14.49	5.06	
1421224_a_at	Tcf2	transcription factor 2	1.26	4.89	3.88	
1442229_at	Pax9	Paired box gene 9	1.05	3.38	3.20	

Tabelle 4.5: Transkripte mit der Annotierung "endoderm development" (GO:0007492), die in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen hochreguliert sind (\geq 2fach, Student's *t*-Test *p*-Wert \leq 0,05). Die Expressionsänderung ist durch paarweisen Vergleich von undifferentierten *Sox17*::DsRed ES und *Sox17*::DsRed⁻ Zellen, von undifferentierten ES und endodermal differenzierten *Sox17*::DsRed⁺ Zellen, sowie von *Sox17*::DsRed⁺ und *Sox17*::DsRed⁺ Zellen berechnet worden.

Weitere für die Endodermentwicklung beschriebene Gene sind nicht mit der GO-Kategorie "endoderm development" annotiert, sondern lassen sich vermehrt in anderen endodermal-assoziierten Kategorien finden. Die Tabellen 4.6 und 4.7 geben Transkripte wieder, die an der Morphogenese des embryonalen Darms und der Lunge beteiligt sind. Die Forkhead Transkriptionsfaktoren *Foxa1* und *Foxa2* sind zusammen mit weiteren Genen — *FoxP4*, *Fgfr4* und *Pdpn* — in der GO-Kategorie Lungenentwicklung zu finden (Tabelle 4.7). In den GO-Kategorien, die mit der Morphogenese des Darms assoziiert sind, sind die Transkripte von *Gata4*, *Tcf7l2* und *Foxp4* vertreten.

			Expressionsänderung		
Probeset	Symbol	Name	ES vs. Sox17 ⁻	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺
1429427_s_at	Tcf712	transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG- box	1.78	5.07	2.85
1418863_at	Gata4	GATA binding protein 4	10.72	27.73	2.59
1429719_at	Foxp4	forkhead box P4	1.35	2.83	2.10

Tabelle 4.6: Transkripte mit den Annotierungen "gut development" (GO:0048565), "embryonic gut development" (GO:0048566), "embryonic gut morphogenesis" (GO:0048568), "ectodermal gut development" (GO:0007439), "ectodermal gut morphogenesis" (GO:0048567) und "embryonic foregut morphogenesis" (GO: 0048617), die in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen hochreguliert sind (\geq 2fach, Student's *t*-Test *p*-Wert \leq 0,05). Die Expressionsänderung ist durch paarweisen Vergleich von undifferentierten *Sox17*::DsRed⁺ Zellen, von undifferentierten ES und endodermal differenzierten *Sox17*::DsRed⁺ Zellen, sowie von *Sox17*::DsRed⁻ und *Sox17*::DsRed⁺ Zellen berechnet worden.

			Exj	Expressionsänderung		
Probeset	Symbol	Name	ES vs. Sox17 ⁻	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺	
1418496_at	Foxa1	forkhead box A1	7.21	69.22	9.60	
1422833_at	Foxa2	forkhead box A2	9.82	56.40	5.74	
1419309_at	Pdpn	podoplanin	-1.06	2.72	2.88	
1440108_at	Foxp2	forkhead box P2	3.05	8.72	2.85	
1427776_a_at	Fgfr4	fibroblast growth factor receptor 4	-1.04	2.22	2.30	

Tabelle 4.7: Transkripte mit den Annotierungen "lung development" (GO:0030324) und "respiratory tube development" (GO:0030323), die in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen hochreguliert sind (\geq 2fach, Student's *t*-Test *p*-Wert \leq 0,05). Die Expressionsänderung ist durch paarweisen Vergleich von undifferentierten *Sox17*::DsRed ES und *Sox17*::DsRed⁻ Zellen, von undifferentierten ES und endodermal differenzierten *Sox17*::DsRed⁺ Zellen, sowie von *Sox17*::DsRed⁻ und *Sox17*::DsRed⁺ Zellen berechnet worden.
Bemerkenswert viele Transkripte, die mit der Differenzierung von embryonalen Stammzellen in endodermale Zelltypen in der Literatur beschrieben sind, fallen in die GO-Kategorie "tube development". Auch hier sind die Transkriptionsfaktoren *Foxa1*, *Foxa2*, *FoxP4* und *Gata4* sowie *Nkx3.1* vertreten. Weiterhin fallen in diese Kategorie verschiedene Komponenten von Signaltransduktionswegen wie der Wachstumsfaktor *Bmp2* und die Rezeptoren für FGF4, TGF- β , CXC4-Chemokine und Indian Hedgehog. Der Einfluß von Heghehog [198, 199], TGF- β [200–202] und FGF4 [88, 203, 204] Signalen bei der Entwicklung des endodermalen Keimblatts und seiner Derivate konnte gezeigt werden.

Zusammengefasst zeigt die GO-Analyse der Transkripte, die im Vergleich zur undifferenzierten ES Zellpopulation und zur Sox17::DsRed⁻ Zellpopulation in Sox17::DsRed⁺ Zellen um den Faktor \geq 2 (mit *p*-Wert \leq 0,5) heraufreguliert sind, dass GO-Terme, die in einem direkten Zusammenhang mit der Endodermentwicklung stehen, überrepräsentiert sind. Es konnten GO-Annotierungen identifiziert werden, die mit der frühen Endodermdifferenzierung während der Gastrulation assoziiert sind. Es konnten aber auch GO-Annotierungen identifiziert werden, die morphogenetische Prozesse während der Entwicklung endodermaler Organsysteme (z. B. Darm, Lunge) beschreiben. Es finden sich in den GO-Kategorien viele Transkripte wieder, deren Bedeutung für die Endodermentwicklung gut charakterisiert ist. Dazu gehört Sox17, aber auch Gata4, Tcf2 sowie Foxa1, Foxa2 und Cxcr4. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Sox17::DsRed+ Zellen nicht nur Transkripte exprimieren, die auf eine endodermale Identität der Zellen schließen lassen, sondern dass Sox17 auch Gene induziert, die für die Angiogenese und Vaskulogenese von Bedeutung sind. Schließlich zeigt die Anreicherung der Transkripte mit dem GO-Term "tube development" die molekulare Verwandschaft der Prozesse, die an der Bildung tubulärer Strukturen in unterschiedlichen Organsystemen während der Embryogenese beteiligt sind und stellt einen Zusammenhang mit der Expression des Transkriptionsfaktors Sox17 her. Dabei ist es interessant, dass vermehrt Gene mit dem GO-Term "cell death" in der Sox17::DsRed[–] Zellpopulation überrepräsentiert sind, denn der programmierte Zelltod spielt in einigen Modellen, die die Bildung tubulärer Strukturen erklären, eine Rolle [205, 206]. Dieser Gegensatz könnte möglicherweise darauf hinweisen, dass auch andere Modelle zur Erklärung der Bildung tubulärer Strukturen in endodermalen Geweben und in Endothelien in Betracht gezogen werden müssen.

			Ex	Expressionsänderung			
Probeset	Symbol	Name	ES vs. Sox17 ⁻	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺		
	Foxa1	forkhead box A1	7.21	69.22	9.60		
1422833_at	Foxa2	forkhead box A2	9.82	56.4	5.74		

Tabelle 4.8

4 Diskussion

(Fortsetzung)

				Expressionsänderung			
Probeset	Symbol	Name	ES vs. Sox17 ⁻	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺		
1450704_at	Ihh	Indian hedgehog	1.53	6.06	3.96		
1452527_a_at	P2rx4	purinergic receptor P2X ligand-gated ion channel 4	2.52	7.87	3.12		
1432466_a_at	Apoe	apolipoprotein E	-1.06	2.73	2.88		
1419309_at	Pdpn	podoplanin	-1.06	2.72	2.88		
1440108_at	Foxp2	forkhead box P2	3.05	8.72	2.85		
1451756_at	Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1	4.31	12.15	2.82		
1418863_at	Gata4	GATA binding protein 4	10.72	27.73	2.59		
1449998_at	Nkx3-1	NK-3 transcription factor locus 1 (Drosophila)	2.03	4.84	2.38		
1427776_a_at	Fgfr4	fibroblast growth factor receptor 4	-1.04	2.22	2.30		
1448710_at	Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	8.93	20.53	2.30		
1424552_at	Casp8	caspase 8	3.18	7.29	2.29		
1422629_s_at	Shroom3	shroom family member 3	1.37	3.05	2.22		
1426397_at	Tgfbr2	transforming growth factor beta receptor II	3.28	6.98	2.13		
1423635_at	Bmp2	bone morphogenetic protein 2	39.8	80.45	2.02		

Tabelle 4.8: Transkripte mit den Annotierungen 'branching morphogenesis of a tube' (GO:0048754) und 'tube development' (GO:0035295), die in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen hochreguliert sind (\geq 2fach, Student's *t*-Test *p*-Wert \leq 0,05). Die Expressionsänderung ist durch paarweisen Vergleich von undifferentierten *Sox17*::DsRed ES und *Sox17*::DsRed⁻ Zellen, von undifferentierten ES und differenzierten *Sox17*::DsRed⁺ Zellen, sowie von *Sox17*::DsRed⁻ und *Sox17*::DsRed⁺ Zellen berechnet worden.

4.3 Neuidentifizierte Gene im endodermalen Keimblatt

Die Analyse des Transkriptoms *Sox17*::DsRed⁺ Zellen bestätigte eindrucksvoll deren endodermale Identität. Die GO-Analyse (Abschnitt 3.3.2.4) machte aber auch deutlich, dass *Sox17* nicht nur bei der Bildung des ExEs und DEs eine wichtige Rolle spielt [84, 100], sondern wie von Matsui *et al.* gezeigt, auch an Prozessen während der Endotheldifferenzierung beteiligt [189] und nach Kim *et al.* für die Proliferation von fötalen hämatopoetischen Zellen notwendig ist [103]. Die Liste im Anhang A.3 enthält 229 Gene, die 2,5-fach stärker in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen exprimiert waren als in undifferenzierten *Sox17*::DsRed ES Zellen und *Sox17*::DsRed⁻ Zellen (ANOVA $\leq 0,005$). Die Liste umfasst anerkannte Endodermmarker und Gene, die durch *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) identifiziert werden konnten. Die SAGE-Bibliotheken wurden aus Tag 8,0–8,5 p.c. altem *ex vivo* isoliertem DE hergestellt [150]. Sherwood *et al.* konnten durch die Markierung von *Sox17* mit einem Reportergen VE und DE *ex vivo* aus Tag 8.0–8.25 p.c. alten Mausembryonen isolieren und durch Expressionsanalysen weitere Gene identifizieren [151], die ebenfalls in der *Sox17*::DsRed⁺ Zellpopulation heraufreguliert waren. Yasunaga *et al.* konnten wiederum durch die Analyse *in vitro* differenzierter ES Zellen endodermale Markergene auf der Zelloberfläche identifizieren [109]. Die Überschneidung der Datensätze macht deutlich, dass auch die Analyse der *Sox17*::DsRed⁺ Zellen auch geeignet war, um Gene des endodermalen Keimblatts neu zu identifizieren (Tabelle 4.9).

- A Etablierte Markergene des Endoderms [69,76,207–213]: Afp, Foxa1, Hnf4a, Hnf1b, Foxa2, Foxa3, Lhx1, Emb
- **B** Markergene identifiziert nach ES Zell Differenzierung, Yasunaga *et al.* [109]: *Cxcr4*, *Tmprss2*
- **C** Markergene nach Analyse von SAGE Bibliotheken, Hou *et al.* [150]: *Pyy*, *Cldn9*, *Ttr*, *Cpn1*, *Spink3*, *Cyp26a1*, *Arg1*, *Lgals2*, *Apoc2*
- D Markergene identifiziert in *ex vivo* isolierten Sox17⁺ Zellen, Sherwood *et al.* [151]: Clic6, Dsg2, Krt7, Rbm35a, Spink3, Tmprss2, Dpp4, Prss8, Cited1, Irf6, Crb3
- E Zusätzliche Kandidaten aus dieser Arbeit:

Prss3, *Plet1*, 061000012*Rik*, *Chsy3*, 2210011C24*Rik*, *Gm*10664, *Sel113*, *Cdh6*, *Slc22a23*, *Pkdcc*, *Gpr120*, *Ttc6*, 210300C02*Rik*

Tabelle 4.9: Vergleich identifizierter Markergene mit Literaturdaten. Die Liste der Kandidatengene zeigt Überschneidungen mit den Daten von Yasunaga, Hou und Sherwood *et al.* [109, 150, 151]. Aufgelistet sind die in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen heraufregulierten Gene (Expressionsänderung \geq 2,5), die ebenfalls in den Publikationen identifiziert werden konnten (B–D) und zusätzlich Gene, die nur im *Sox17*::DsRed Affymetrix-Datensatz enthalten sind (E).

4.3.1 Die Expression verschiedener Kandidatengene *in vivo* und die Aktivierung der Promotoren durch SOX17 im Luciferase-Expressionstest

In dieser Arbeit konnte die *in vivo* Expression von dreizehn Kandidatengene durch *in situ* Hybridisierung im Endoderm nachgewiesen werden. Dabei war die Expression meist nicht nur auf das Endoderm beschränkt, sondern auch in anderen Geweben zu sehen (Abbildung 3.15 und Tabelle 3.13). Für die zwei Gene *Cdh6* und *0610010012Rik* konnte im Luciferase-Expressionstest eine Aktivierung des Promotors durch SOX17 gezeigt werden. Darüber hinaus wurden die Promotoren des Transkriptionsfaktors *Rfx6* und des Membranproteins *Ocln* durch SOX17 beeinflusst (Abbildung 3.18). In den folgenden Abschnitten werden die identifizierten Gene in Bezug auf ihre Endoderm-assoziierte und Sox17-induzierte Expression diskutiert.

Plet1 ist im pharyngealen Taschenendoderm exprimiert

Zhao *et al.* identifizierten *Plet1* als Placenta-spezifisches Transkript mit unbekannter Funktion in Mensch, Maus und Schwein [214]. Im Mausembryo zwischen E 5,5–6,5 konnte eine Expression in der distalen Region des extraembryonalen Ektoderms und in der ventralen Schicht des Primitivknotens nachgewiesen werden. In späteren Entwicklungsstadien (bis E 9,5) konnte keine gewebespezifische Expression von *Plet1* nachgewiesen werden [215]. Die vorgestellten Daten zeigen, dass *Plet1* in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen heraufreguliert wird. Der Luciferase-Expressionsassay zeigte keine Aktivierung des *Plet1* Promotors *in vitro*. *Plet1* ist in E 9,5 Embryonen in den pharyngealen Taschen exprimiert (Abbildung 3.15 B). Aus dem pharyngealen Taschenendoderm der dritten Tasche bilden sich im weiteren Verlauf der Entwicklung der Thymus und die Nebenschilddrüsen, die zu den endodermal-abgeleiteten Organen gezählt werden. Das *Plet1* Expressionsmuster wird durch zwei Publikationen bestätigt [216,217].

Chsy3 Expression unterscheidet sich grundlegend von der Expression anderer Gene der Chsy-Familie

Das Expressionsmuster von *Chsy3* in der embryonalen Enddarmtasche (Abbildung 3.15 E) unterscheidet sich von dem Muster der eng verwandten Gene *Chsy1* und *Chsy2*. Die Enzyme *Chsy1* und *Chsy2* sind für die Bildung von Knorpelgewebe essentiell. Eine genaue Analyse der Expression der drei Synthetasen mittels qPCR konnte zeigen, dass *Chsy3* im Gegensatz zu *Chsy1* und *Chsy2* jedoch nicht im Knorpel exprimiert wird [218]. Die Expression des *Chsy3* Homologs der Ratte konnte vor allem im Darm und im Gehirn erwachsener Tiere nachgewiesen werden [219].

Gm10664 ähnelt in der Expression dem Gen Cdx2

Das Expressionsmuster von Gm10664 in der Region der Schwanzknospe (Abbildung 3.15G) ähnelt stark dem des Cdx2 Gens [220]. Der zur Homeobox Familie gehörende Transkriptionsfaktor Cdx2 ist essentiell für die axiale Elongation des Embryos während der Entwicklung [221]. Darüber hinaus ist Cdx2 an der Regulation der Transkription unterschiedlicher Gene im Intestinum und Colon beteiligt und damit sowohl für die frühe Differenzierung als auch für die Aufrechterhaltung der epithelialen Auskleidung des Darms wichtig [222]. Sequenzähnlichkeiten zwischen Gm10664 und Cdx2 konnten jedoch aber festgestellt werden.

Die Expression des humanen Sel113 Homologs bestätigt die endodermale Assoziation

Sel1l3 Expression konnte in der gesamtem Region des embryonalen Darms festgestellt werden (Abbildung 3.15 H). Beim Menschen ist *Sel1l3* besonders stark im Pankreas exprimiert [223]. *Sel1l3* Dysregulation ist mit verschiedenen malignen Tumoren, vor allem des Pankreas, aber auch der Lunge und der Speiseröhre, assoziiert [224–226]. Molekulare Untersuchungen konnten zeigen, dass *Sel1l3* im Komplex mit anderen Proteinen im endoplasmatischen Retikulum epithelialer Zellen an der Faltungskontrolle und dem Transport sezernierter Proteine beteiligt ist [227,228].

Das SIc22a23 Homolog der Ratte ist im Darm exprimiert

Das *Slc22a23* Gen kodiert ein Transportprotein in der Plasmamembran. Hier konnte eine Expression in der Vorderdarm-/Mitteldarmregion festgestellt werden (Abbildung 3.15 J). Jacobsson *et al.* konnten in der Ratte ein ähnliches Expressionsmuster des Transporters durch qPCR feststellen [229]. Die Slc22 Transporter bilden eine große Familie organischer Kation- (OCTs), Zwitterion/Kation- (OCTNs) und anorganischer Aniontransporter (OATs), die insgesamt 12 vorhergesagte α -helikale Transmembrandomänen (TMDs) und eine große extrazelluläre Schleife zwischen TMD1 und TMD2 besitzen. Die Transporter funktionieren (*i*) als Uniporter und ermöglichen eine erleichterte Diffusion in beide Richtungen entsprechend eines Konzentrationsgefälles, (*ii*) als Anionaustauscher (OAT1, OAT3, URAT1) oder (*iii*) als Na⁺/L-Carnithin Symporter (OCTN2). In ihrer Funktion sind sie beteiligt an der Absorption und/oder Exkretion von Medikamenten, Xenobiotika und endogenen Stoffwechselprodukten in Darm, Leber oder Niere und an der Homöostase in Gehirn und Herz [230].

Gpr120 Expression im Endoderm und im Gehirn

Hirasawa *et al.* konnten in der adulten Maus und beim Menschen mittels qPCR Expression von *Gpr120* vor allem in der Lunge, aber auch in Illeum, Colon und Rectum nachweisen, nicht jedoch im Gehirngewebe. Expression von *Gpr120* im Enddarm und vor allem im Gehirn, bereits in der Embryogenese, konnte hier gezeigt werden (Abbildung 3.15 L). Als eine mögliche Funktion von *Gpr120* wird von der Gruppe um Hirasawa die rezeptorvermittelte Glp-1¹ Sekretion nach Bindung freier, ungesättigter, langkettiger Fettsäuren an den Rezeptor beschrieben [231]. Expressionsdaten aus *Allen's Brain Atlas* [232] für *Grp120* deuten auf ein restriktives Expressionsmuster von *Gpr120* im Gehirn adulter Mäuse hin. Die Funktion im embryonalen Gehirn ist unbekannt.

¹*Glucagon-like Peptide-1* (Glp-1) gehört zu einer Familie von Hormonen, die die Glucose-abhängige Sekretion von Insulin pankreatischer β-Zellen verstärken können.

Pkdcc reguliert möglicherweise Signaltransduktionwege während der Endoderm Entwicklung

Für das Transkript *Pkdcc* konnte eindeutig eine Expression im DE des embryonalen Mitteldarms nachgewiesen werden (Abbildung 3.15K). In E14,4 Embryonen konnte eine Expression im intestinalen Epithel und im Thymus beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Imuta et al. konnten kürzlich zeigen, dass dieses Transkript für eine cytoplasmatische Proteinkinase kodiert [233]. Pkdcc^{-/-}Mäuse besitzen neben einem stark verkürzten Dünn- und Dickdarm auch erhebliche Defekte in der Knochenbildung. Ein Vergleich des *Pkdcc*^{-/-} Phänotyps zeigt Ähnlichkeiten mit Mausmutanten von δ EF1/ZEB1 [234], Wnt5a [235] und Ror2 [236, 237] sowie von Gli2^{-/-} und Gli2^{+/-}Gli3^{+/-} Mutanten [238]. Wnt5a und Ror2 sind an Signalwegen zur Etablierung von Zellpolarität beteiligt [239–241], während *Gli2* und *Gli3* im Hedgehog Signalweg involviert sind [242, 243]. Da (i) viscerales, parietales und definitives Endoderm des embryonalen Darms morphologisch und funktionell hochspezialisierte Epithelien mit einer stark ausgeprägten baso-apicalen Polarität ausbilden [244] und (ii) Sonic und Indian Hedgehog Signale bei der Entwicklung des embryonalen Darms und der abgeleiteten Organsysteme eine Rolle spielen [199, 245, 246], kann man darüber spekulieren, ob Pkdcc an der Regulation in einem dieser Signalwege beteiligt ist. Einen Hinweis liefern die hier vorgestellten Affymetrixanalysen. Sowohl Shh, Ihh und Gli3 werden mit Sox17::DsRed koexprimiert (Daten nicht gezeigt). Eine Aktivierung der Expression des *Pkdcc* Transkripts konnte in den Luciferase-Expressionstests nicht gezeigt werden.

Der Cadherin-6 Reporter wird in HEK-293 Zellen stark durch SOX17 aktiviert

Cadherine bilden eine große Familie von transmembranalen Glycoproteinen. *Cdh6* gehört neben den Cadherinen 7–14 zum Typ II der klassischen Cadherine. Sie vermitteln homophile Zell-Zell-Adhäsion in Epithelien über desmosomale und adhäsive Zellkontakte und regulieren viele morphogenetische Prozesse [247, 248]. *Cdh6* ist *in vivo* vor allem in neuroektodermalen Geweben — Mesencephalon, Telencephalon, einigen Rhombomeren und in migrierenden Neuralleisten Zellen sowie im Trigeminal- und im fascialen/akustischen Ganglion — exprimiert (Abbildung 3.15 I). Die Expression im Neuroektoderm entspricht damit den Daten aus der Literatur [249]. Weiterhin spielt *Cdh6* bei der Entwicklung von Nephronen in den embryonalen Nierenanlagen eine Rolle. Das Transkript ist im Bereich der Urogenitalleiste exprimiert. *Cdh6^{-/-}* Mäusen fehlen aufgrund eines Defekts in der Mesenchym-zu-Epithel Konversion die Nephrone in dem sich bildenden Nierengewebe [250]. In der knock-out Studie wird nicht darauf eingegangen, ob *Cdh6* für die epitheliale Morphogenese des DEs benötigt wird. In den *in situ* Hybri-

disierungen ist jedenfalls eine schwache Expression des Gens im embryonalen Vorder-, Mittel- und Enddarm nachzuweisen. Inoue et al. konnten ebenfalls eine Cdh6 Expression innerhalb der endodermalen Zellpopulation im 0-Somiten Stadium nachweisen, die bis zum Stadium E 9,5 aufrechterhalten wird [249]. Es bleibt die Frage, warum Sox17 in den Luciferase-Expressionstests dieser Arbeit einen starken Einfluß auf die Cdh6 Expression in vitro besitzt. Inoue et al. konnten mit Hilfe BAC-transgener Mäuse zeigen, dass für die gewebespezifische Expression eines LacZ-Reportergens unterschiedliche Sequenzbereiche verantwortlich sind, die bis zu 161 kb stromaufwärts des Cdh6 Gens liegen [251]. Die Endoderm-spezifischen regulatorischen Elemente liegen dabei am weitesten 5' vom Transkriptionsstart entfernt und sind für die endodermale Expression von Cdh6 essentiell. BAC-Transgene, die nur 3'-Sequenzen des Promotors beinhalten, sind nicht in der Lage, die Expression des LacZ-Reportergens im Endoderm anzutreiben. Im Rahmen dieser Dissertation konnte jedoch mittels Luciferase-Expressionstest gezeigt werden, dass Sox17 einen dosisabhängigen Einfluß auf den zentralen Cdh6 Promotor in vitro besitzt. Diese Diskrepanz zwischen in vivo und in vitro Situation könnte möglicherweise durch den Einfluss von Repressoren innerhalb des Cdh6 Promotor erklärt werden, der nicht durch die in vitro Versuche widergespiegelt wird. Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf einen komplexen Regulationsmechanismus des Cdh6 Promotors in vivo hin, in dem Sox17 nicht hinreichend für die Aktivierung der *Cdh6* Expression im Endoderm ist. Über eine Rolle von *Cdh6* im primitiven, visceralen oder parietalen Endoderm ist bisher wenig bekannt. Inwieweit Cdh6 also eine Bedeutung für die Bildung oder Funktion des Endoderms haben könnte, bleibt daher spekulativ. Die Expression von Cdh6 im ex vivo isoliertem ExE könnte mittels qPCR rasch aufgeklärt werden.

Die nicht-charakterisierten Gene 0610010O12Rik, 2210011C24Rik, 2010300C02Rik und Ttc6

Die Transkripte der Gene 0610010O12Rik, 2210011C24Rik, 2010300C02Rik lassen sich, wenn auch nicht ausschließlich, im Epithel des embryonalen Darms nachweisen (Abbildung 3.15 D,F,M und Tabelle 3.13). Im Luciferase-Expressionstest zeigten die Promotoren von 0610010O12Rik und 2210011C24Rik eine Aktivierung der Luciferase-Expression durch SOX17 und LiCl (Abbildung 3.18). Die Aktivierung von 2210011C24 liegt dabei auf dem Niveau der *Hnf1b* Positivkontrolle. Die Funktion aller drei Transkripte ist unbekannt. Allen Genen gemeinsam ist, dass ihre ESTs oft aus frühen Embryonalstadien und adulten endodermalen Geweben kloniert wurden. Auf Ebene der Nukleotid- und Aminosäuresequenz konnten Homologe in Mensch, Ratte und Schimpanse identifiziert werden. Die Funktion von *Ttc6* ist ebenfalls unbekannt. Das TTC6 Protein enthält Tetra-tricopeptidwiederholungen [252]. Die Domäne kann aus mehreren Wiederholungen von

zwei zusammengelagerten α -Helices bestehen und ist ein evolutiv sehr altes Motiv, das in Proteinen von Archaeen, Bakterien und Eukaryonten weit verbreitet ist. Die Domäne vermittelt Protein-Protein Interaktionen und ist am Aufbau von größeren Multiproteinkomplexen beteiligt [253]. Insgesamt könnten diese vier nicht-charakterisierten Kandidaten interessante Ansätze für weitere Untersuchungen bieten, da *Gene-Trap* ES Zellen zur Verfügung stehen und es Anstrengungen durch die knock-out Maus-Konsortien gibt, diese Gene gezielt auszuschalten.

Occludin

OCLN und seine Spleißvarianten [254-256] bilden neben den Proteinen der Claudin-Familie und den junctional adhesion molecules (JAMs) die drei strukturellen Hauptkomponenten von *tight junctions* in der Membran epithelialer und endothelialer Zellverbände. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ocln, aber auch viele andere für die epitheliale Identität wichtigen Gene (Tabelle 4.1), in Sox17::DsRed⁺ Zellen deutlich stärker exprimiert sind als in Sox17::DsRed⁻ Zellen und in undifferenzierten Sox17::DsRed ES Zellen. Während viele Mitglieder der Claudin-Familie gewebespezifisch exprimiert werden [257], ist Ocln in allen Epithelien und Endothelien zu finden und nicht nur auf das endodermale Keimblatt beschränkt. Dennoch konnte hier gezeigt werden, dass SOX17 im Luciferase-Expressionstest den Ocln Promotor in vitro aktivieren kann. Die Aktivierung des WNT-Pathways durch LiCl hatte keinen zusätzlichen Effekt auf die Transkription des Luciferase-Reporters. Occludin-defiziente embryonale Stammzellen können sich zu polarisierten epithelialen Zellen entwickeln und funktionelle tight junctions ausbilden [258]. Untersuchungen an $Ocln^{-/-}$ Mäusen zeigen keine drastischen Veränderungen in der Funktion und der Morphologie der tight junctions [259, 260]. Eine genaue Funktion von Occludin konnte bislang nicht hinreichend geklärt werden.

Der Transkriptionsfaktor *Rfx6* wird von Sox17 reguliert.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgestellten Transkriptomanalysen konnte mit *Rfx6* ein besonders interessanter Kandidat gefunden werden, der in Abhängigkeit von Sox17 steht. Im Februar 2010 veröffentlichten Soyer *et al.* und Smith *et al.* erste Daten zur Funktion von *Rfx6* [261, 262]. Bereits 2008 wurden *Rfx6* und *Rfx7* im Menschen und in der Maus mit Hilfe von Sequenzvergleichen als neue Mitglieder einer Familie von eng miteinander verwandten Transkriptionsfaktoren entdeckt [263]. Rfx-Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch die Bindung an eine stark konservierte cis-regulatorische DNA Sequenz von typischerweise 14 bp aus, einer sogenannten X-Box. Die DNA Bindung wird dabei bei allen Rfx-Faktoren über eine *Winged*-Helix Faltungsstruktur in den Proteinen vermittelt. Darüber hinaus enthalten die Rfx-Faktoren weitere konservierte Proteindomänen. In dieser Arbeit konnte die Expression von Rfx6 in vivo aufgrund des Fehlens einer funktionierenden RNA-Sonde nicht nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich in den aktuell veröffentlichten Arbeiten, dass Rfx6 beginnend an Tag 7,5 p.c. im gesamten definitiven Endoderm, nicht aber im extraembryonalen Endoderm exprimiert wird [262]. In Stadium E 9,0 lässt sich *Rfx6* im gesamten embryonalen Darm nachweisen. An Tag 10,5 p.c. ist die *Rfx6* Expression kaudal auf Duodenum und Kolon und rostral auf die proximale Region des sich bildenden Magens und mehr anterior auf das Epithelium im Bereich des Mittel-und Vorderdarms beschränkt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *Rfx6* im Lungenepithel und in einzelnen Zellen in der dorsalen Pankreasknospe exprimiert wird. Dabei sind Rfx6-exprimierende Zellen im weiteren Verlauf der Pankreasentwicklung negativ für den pankreatischen Transkriptionsfaktor Pdx1, aber positiv für Neurogenin (Ngn3) und Nkx2-2. Schließlich lässt sich Rfx6 im adulten Pankreas auf die Region der Langerhans Inseln beschränken, wo Rfx6 in den Zellen der endokrinen Linien nachzuweisen ist. In $Ngn^{-/-}$ Mäusen lassen sich keine Rfx6-exprimierenden Zellen im Pankreas nachweisen [261, 262]. Rfx6-defiziente Mäuse werden zwar in dem zu erwarteten Mendelverhältnis geboren, leiden aber an Diabetes und zeigen einen stark gedehnten Darm aufgrund von kleineren Darmverschlüssen und sterben zwei Tage nach Geburt [262]. Die Bauchspeicheldrüsen dieser Tiere sind nicht in der Lage, Hormone wie Insulin, Glucagon, Somatostatin und Ghrelin zu produzieren. Die Expression anderer β -Zellgene ist stark reduziert, obwohl eine große Anzahl endokriner Zellen in den Organen zu finden ist [261]. Diese Ergebnisse zeigen, (i) dass der Transkriptionsfaktor Rfx6 im definitiven Endoderm des Darms während der Embryogenese exprimiert ist und (ii) dass Rfx6 im Pankreas, Ngn3-abhängig, für die Entwicklung endokriner Inselzellen benötigt wird. Im Kontext dieser Arbeit ist es interessant, dass Ngn3 im Gegensatz zu Rfx6 nicht im frühen Endoderm des Darms exprimiert wird [264–266], d.h. dass die Expression von *Rfx6* nicht ausschließlich von Ngn3 reguliert werden kann. Luciferase-Expressionstest und Sequenzanalysen dieser Arbeit lassen vermuten, dass Rfx6 von Sox17 im definitiven Endoderm reguliert wird. Während der Pankreasentwicklung könnte Ngn3 die Expression von Rfx6 aufrechterhalten oder reaktivieren, während sie im Vorder-, Mittel- und Hinterdarm mit fortschreitender Entwicklung des Embryos wieder abnimmt. Die Abnahme der Expression von Rfx6 und Sox17 im Endoderm des Darms scheint gleichzeitig zu erfolgen. Es bleibt allerdings die Frage zu klären, ob SOX17 im extraembryonalen Endoderm die Expression von *Rfx6* nicht beeinflusst. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass *Rfx6* nach Gastrulation im definitiven Endoderm exprimiert wird. In vitro konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Rfx6* in acht Tage alten *Sox17*::DsRed⁺ Zellen koexprimiert wird. Lucifease-Expressionsassay und Promotoranalysen legen nahe, dass der Transkriptionsfaktor Rfx6

tatsächlich direkt oder indirekt von SOX17 reguliert wird und damit nachgeordnet in der Endodermentwicklung eine Rolle spielt. Für die Entwicklung endokriner Inselzellen des Pankreas ist eine funktionelle Rolle von *Rfx6* durch die Publikationen von Soyer *et al.* und Smith *et al.* detailliert beleuchtet worden. Die Funktion im Darmendoderm bleibt jedoch unklar.

4.3.2 Identifizierung von SOX17 Bindestellen durch phylogenetisches *Footprinting*

In den untersuchten Promotorregionen der Gene 061000012Rik, Rfx6, Cdh6 und Ocln, die Bereiche der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) und 1,0-1,3 kb stromaufwärts des TSS umfassten, konnten durch phylogenetisches Footprinting mehrere TFBS des SOX17 Proteins identifiziert werden (Abbildung 3.20 A). Inwieweit die TFBS Relevanz für die Transkription der Gene in vivo haben, konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden. Der Luciferase-Expressionstest deutete darauf hin, dass SOX17 die Promotoren der Gene in vitro aktiviert, aber ob dieser Effekt direkt auf die Bindung von SOX17 an den Promotor zurückzuführen ist, kann nicht aus den Ergebnissen hergeleitet werden. SOX17 ist in der Lage, eine Vielzahl von Genen zu regulieren, darunter auch weitere Transkriptionsfaktoren wie HNF1B und FOXA2 [140]. Diese Faktoren könnten sekundär weitere Zielgene steuern. Weiterhin könnten Signale, die die Transkription von Sox17 induzieren, parallel auch die Transkription anderer Gene aktivieren, d.h. die Transkription dieser Gene wäre koreguliert und nicht von Sox17 abhängig. Auf diese sekundären Effekte deutet auch die Tatsache hin, dass in den Promotoren der 229 Kandidatengene, die in der Sox17::DsRed⁺ Zellpopulation um mehr als den Faktor 2,5 heraufreguliert waren, keine statistische Häufung von Sequenzmotiven zu finden war, die sich endodermalen Transkriptionsfaktoren oder gar Sox17 zuordnen ließen (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus weicht die de novo berechnete Sox17 Konsensussequenz von dem in der JASPAR Datenbank hinterlegten Sox17 Motiv ab (Abbildung 3.20 B). Dies deutet darauf hin, dass einige TFBS möglicherweise keine Relevanz besitzen. Niakan et al. bestätigten kürzlich das Sox17 Motiv durch Chromatin-Immunopräzipitationsexperimente und zeigten dabei, dass SOX17 Bestandteil eines komplexen Transkriptionsregulationsnetzwerks ist [101]. Diese Ergebnisse zeigen aber auch, dass Sox17 direkt Gene des extraembryonalen Endoderms aktivieren kann. Daher ist es nicht vollständig ausgeschlossen, dass SOX17 direkt eines der hier untersuchten Gene reguliert. Insbesondere Cdh6 besitzt ein im Kern identisches Sox17 Sequenzmotiv. Expression von Cdh6 im extraembryonalen Endoderm ist laut der Standford SOURCE Datenbank (http://source.stanford.edu) vorhanden und eine Expression konnte auch im DE des embryonalen Darms gezeigt werden [249]. Darüber hinaus konnten Inoue et al. einen Einfluß von SOX17 auf den Cdh6 Promotor zeigen (vgl. Abschnitt auf Seite 130). Durch die gezielte Mutagenese einzelner identifizierter SOX17 Bindestellen im Luciferase-Expressionstest könnte in Zukunft die biologische Relevanz getestet werden.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit Hilfe der *Sox17*::DsRed ES Zelllinie war es möglich, Endodermdifferenzierung *in vitro* zu verfolgen und *Sox17*-positive endodermale Zellen aus acht Tage alten EBs für die Analyse des Transkriptoms zu isolieren. Die Charakterisierung des Transkriptoms zeigte, dass die *Sox17*-positive Zellpopulation nicht homogen ist. Es konnten neben Markern des definitives Endoderms, auch Marker von primärem, visceralem und parietalem Endoderm nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte die GO-Analyse, dass auch Gene, die an der Endothelentwicklung während der Vaskulogenese beteiligt sind, in den *Sox17*::DsRed-positiven Zellen überrepräsentiert waren. Der Vergleich des *Sox17*::DsRed-Datensatzes mit bereits publizierten Daten zeigte, dass mit der einfachen *in vitro* Differenzierung der transgenen ES Zelllinie in *embryoid bodies* die gleichen endodermalassozierten Gene gefunden werden konnten. Eine Vielzahl der endodermalen Gene in den publizierten Daten sind in *Sox17*::DsRed-positiven Zellen heraufreguliert (Tabelle 4.9).

Zusätzlich konnten Gene identifiziert werden, die in dieser Arbeit eine endodermale Assoziation zeigten. Darunter in ihrer Funktion zum Teil bekannte Gene, wie Cdh6 und Ocln, die als Strukturproteine in der Plasmamembran epithelialer Zellverbände zu finden sind. Mit den Genen Plet1, Pkdcc und Rfx6 wurden Gene identifiziert, deren Funktion im endodermalen Keimblatt und in Endoderm-abgeleiteten Organen, erst kürzlich nachgewiesen werden konnte. Die mögliche Regulation des Transkriptionsfaktor Rfx6 durch Sox17 ist dabei ein interessantes Ergebnis. Rfx6 ist als wichtiger Faktor für die Bildung funktioneller endokriner Inselzellen im Pankreas von Mensch und Maus näher charakterisiert worden [261, 262]. Die Funktion von Rfx6 im embryonalen Darm vor der Entwicklung des Pankreas ist nicht geklärt. Der Transkriptionsfaktor Rfx6 ist insbesondere deshalb interessant, da er die Differenzierung endokriner Zellen möglicherweise auch im Darm steuert und eine Erklärung für bestimmte Krankheitsbilder sein könnte, die das endokrine System des Darms betreffen. Schließlich konnten beispielsweise mit 0610010012Rik, 2210011C24Rik, 2010300C02Rik und Gm10664 einige Gene identifiziert werden, deren Funktion bisher nicht bekannt ist. Sie sind mögliche Kandidaten für weitere Untersuchungen.

Mit den *in situ* Hybridisierungen stellt diese Arbeit einen ersten Anfang zur Charakterisierung der unbekannten Gene dar. Eine detaillierte zeitliche und räumliche Analyse der Expression während der gesamten Mausentwicklung könnte der Anfang für weitere Untersuchungen sein. Insbesondere die Analyse von knock-out Mäusen ist sehr aussagekräftig, um eine mögliche Funktion der Gene während der Endodermentwicklung zu klären. Seit einiger Zeit gibt es Bestrebungen verschiedener Maus knock-out und *Gene-Trap* Konsortien, alle Gene der Maus auszuschalten und für weitere funktionelle Untersuchungen öffentlich zur Verfügung zu stellen. Die erste phänotypische Analyse der genetisch veränderten Mäuse würde Hinweise auf die Funktion der untersuchten Kandidatengene geben und schließlich den weiteren Weg zu einer molekular-genetischen und biochemischen Charakterisierung der Gene vorzeichnen.

Anhang

A.1 Hierarchische Clusteranalyse



Abbildung A.1: Hierarchische Clusteranalyse von 1692 bzw. 2180 Probesets, die in der Sox17-DsRed⁻ Zellpopulation (A) bzw. in der Sox17-DsRed⁺ Zellpopulation (B) eine Abnahme der Expression um den Faktor \leq -2 und einen Student's *t*-Test *p*-Value von \leq 0,05 aufweisen.

Anhang

A.2 KEGG Pathways

A.2.1 KEGG Pathway "Zellkommunikation"



Abbildung A.2: KEGG Pathway "Zellkommunikation". Gene und assoziierte Signalwege, die an der Zellkommunikation beteiligt sind. Gene, die in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen heraufreguliert sind und in der GO Analyse identifiziert wurden, sind rot dargestellt. Unter der Abkürzung ECM sind mehrere Proteine, die am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind, zusammengefasst.



A.2.2 KEGG Pathway "Tight junction"

Abbildung A.3: KEGG Pathway "Tight junction". Dargestellt sind die Gene, die an der Bildung und Regulation von *tight junctions* beteiligt sind. Gene, die in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen heraufreguliert sind und in der GO Analyse identifiziert wurden, sind rot dargestellt.

A.3 Endodermale Kandidatengene

Tabelle A.1: Vollständige Liste endodermaler Kandidatengene aus dem Affymetrix-Datensatz für weitere Untersuchungen. Die Liste enthält 229 Gene, die in *Sox17*::DsRed⁺ Zellen nach 8-tägiger EB Differenzierung im Vergleich zu undifferenzierten ES Zellen und *Sox17*::DsRed⁻ Zellen hochreguliert sind (Expressionsänderung \geq 2,5 und ANOVA *p*-Wert \leq 0,005).

Probeset Gen-Symbol Gen-Name ES vs. ES vs. Sox17 Sox17 Sox17 ⁺⁻	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺	ANOVA
	13 21	1 94E-03
148649 at Funen dutanyl aminopenidase 140 1776	12 71	2 23E-07
1136870 x at 4fr alpha fatopration 86.6 00.06	11.74	7 19E-05
1442914 x at Cicle application 800 97.00	10.09	2 25E 06
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	10.98	1 20E 06
1427007_at r80 infinite proving filler 2.10 22.72	10.93	7.07E-06
142/492_at P010 prenature ovariant nature 1D 1.02 11.09	10.91	7.07E-00
14579/3_x_at Dpp4 appendase 4 1.57 16.89	10.79	0./1E-06
1455201_X_at Apol1 apolipoprotein A-1 5.06 54.46	10.75	3.56E-06
1438555 x_at $Foxq1$ Forkhead box QI 2.44 25.85	10.61	9.24E-06
1419095_a_at Apon apolipoprotein M 2.73 28.43	10.42	1.42E-06
1455593_at Apob apolipoprotein B 14.01 140.06	10.00	6.32E-06
1418496_at Foxa1 forkhead box A1 7.21 69.22	9.60	3.62E-06
1439427_at Clan9 claudin 9 -1.83 5.22	9.54	2.91E-05
1420388_atPrss12protease, serine, 12 neurotrypsin (motopsin)4.5041.33	9.18	1.48E-04
1458347_s_atTmprss2transmembrane protease, serine 26.0153.99	8.98	1.87E-05
1448837_at Vil1 villin 1 1.32 11.61	8.82	4.37E-05
1418754_at Adcy8 adenylate cyclase 8 1.90 16.28	8.55	7.49E-06
1448964_at \$100g \$100 calcium binding protein G 1.77 14.83	8.40	1.28E-05
1457613_at Rfxdc1 Regulatory factor X domain containing 1 2.19 17.77	8.13	3.13E-04
1454866 s at Clic6 chloride intracellular channel 6 42.26 330.92	7.83	8.67E-07
1441214 at Exph5 exophilin 5 1.38 10.42	7.56	8.75E-07
1417079 s at Leals2 lectin, galactose-binding, soluble 2 1.34 9.74	7.26	2.62E-05
12/2953 at 2210011C24Rik RIKEN CDNA 2210011C24 gene -218 3.24	7.07	5 25E-04
1422682 s at Prss3 professe serine 3 professe serine 1 176 12 32	7.02	4.46E=03
1/26225 at Rhy/ rotate/setie/setie/setie/setie/setie/	6.92	5.02E-07
$\frac{1}{12022} \frac{1}{24} \qquad \qquad$	6.80	0.02E-07
$\frac{14}{12}\frac{1}{12}\frac{1}{12}$	6.77	2.54E-05
142400_at Pyy pepude 11 9.19 02.24	6.77	1.46E.0E
142Z005_at Knusk4 indonuclease, Knusk A falmiy 4 1.61 10.67	6.76	1.40E-05
141/45_at Cpr1 carboxypeptidase N, polypeptide 1 -2.40 2.78	6.67	7.79E-05
1423944_{at} <i>Hpxn</i> hemopexin 1.54 10.02	6.53	4.52E-05
145094/_at 2610528/11Kik KIKEN cDNA 2610528/11 gene 1.53 9.92	6.49	3.40E-04
1459737_s_at <i>Ttr</i> transthyretin 147.02 948.52	6.45	4.46E-07
1431900_a_at Foxa3 forkhead box A3 1.27 8.21	6.44	2.12E-05
1421425_a_atDscr111Down syndrome critical region gene 1-like 11.5910.20	6.41	9.82E-06
1439489_at Gpr120 G protein-coupled receptor 120 1.15 7.28	6.32	4.79E-05
1423805_at Dab2 disabled homolog 2 (Drosophila) 4.88 30.73	6.30	3.45E-06
1422625_at Ly6h lymphocyte antigen 6 complex, locus H 1.47 9.16	6.23	3.32E-05
1450639_at Slc28a2 solute carrier family 28 1.61 9.86	6.12	9.25E-05
1450078_at Nrk Nik related kinase 10.66 64.96	6.10	1.17E-05
1417845_at Clan6 claudin 6 1.89 11.44	6.05	1.88E-05
1460242 at Cd55 CD55 antigen 2.02 12.17	6.04	9.50E-06
1434914 at Rab6b RAB6B, member RAS oncogene family 2.01 11.91	5.91	4.94E-05
1441429 at Irs4 insulin receptor substrate 4 12.58 72.96	5.80	1.77E-04
1433734 at Slc13a4 solute carrier family 13, member 4 3.08 17.78	5.77	5.18E-06
1449031_at Cited1 Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy- 4.90 28.19 terminal domain 1	5.76	1.10E-06
1422833 at Eorg 6 forkbaad box A2 982 56.40	5 74	2 82E_05
11/12/50 at Slobal source course similar 6 member 4 2.44 12.41	5.59	1.64E.05
11/1020 at Mtth microsomal trialworlds transfor protein 2.44 15.01	5.39	1.0407E 04
$1 + 1 \neq 0 = 0$ microsoniai ingrycende traisier protein 2.43 15.15 140047 at 422346245EBi. DIVAN DNA 422346245 area 2.45	J.+±∠	1.07E-00
142741/_at 4003440A10AK KIKEIN CUNA 4003440K15 gene 3.42 18.49	5.41	1.0/E-05
14469/3_at UCIN OCCIUAIN 2.48 13.36	5.39	3.45E-05
1429413_at Cpm carboxypeptidase M 34.15 182.75	5.35	2.57E-06
1415938_atSpink3serine peptidase inhibitor, Kazal type 313.2670.64	5.33	7.52E-06
1423952_a_at Krt7 keratin 7 -1.18 4.48	5.30	1.37E-03
1425425_a_at WifI Wnt inhibitory factor 1 1.47 7.67	5.21	3.08E-05

(Fortsetzung)

			E	xpressionsä	nderung	
Probeset	Gen-Symbol	Gen-Name	ES vs. Sox17	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺	ANOVA
1457349_at	EG639426	predicted gene, EG639426	1.22	6.26	5.13	2.87E-04
1456839_at	Gramd1b	GRAM domain containing 1B	1.03	5.30	5.13	3.09E-04
1448393_at	Cldn7	claudin 7	2.20	11.22	5.10	9.72E-05
1423860_at	Ptgds	prostaglandin D2 synthase (brain)	1.16	5.91	5.08	2.81E-04
1425900_at	Hkdc1	hexokinase domain containing 1	1.34	6.76	5.04	4.60E-07
1427327_at	Pilra	paired immunoglobin-like type 2 receptor alpha	1.68	8.15	4.85	1.32E-03
1450455_s_at	Akr1c12	aldo-keto reductase family 1, member C12	1.18	5.70	4.82	1.30E-03
1460550_at	Mtmr11	myotubularin related protein 11	1.73	8.28	4.78	2.29E-06
1418320_at	Prss8	protease, serine, 8 (prostasin)	1.59	7.57	4.76	3.42E-05
1426914_at	Marveld2	MARVEL (membrane-associating) domain containing 2	5.16	24.16	4.68	1.96E-05
1438937_x_at	Ang1	angiogenin, ribonuclease A family, member 1	-1.16	3.89	4.52	1.02E-05
1433947_at	Rab37	RAB37, member of RAS oncogene family	2.36	10.52	4.47	2.04E-04
1418301_at	Irf6	interferon regulatory factor 6	-1.14	3.92	4.46	6.98E-04
1434851_s_at	Crb3	crumbs homolog 3 (Drosophila)	-1.48	2.99	4.42	2.20E-04
1434447_at	AI838057	expressed sequence AI838057	1.09	4.78	4.40	6.47E-04
1451335_at	Plac8	placenta-specific 8	2.51	11.00	4.39	1.08E-05
1449152_at	Cdkn2b	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	1.18	5.13	4.34	6.30E-05
1424123_at	BC011209	cDNA sequence BC011209	1.11	4.81	4.31	8.07E-05
1418596_at	Fgfr4	fibroblast growth factor receptor 4	-1.08	4.00	4.31	6.42E-05
1448980_at	Ghrl	ghrelin	-1.05	4.09	4.28	4.90E-04
1434754_at	Garnl4	GTPase activating RANGAP domain-like 4	1.40	5.99	4.27	1.44E-04
1442542_at	Eya4	eyes absent 4 homolog (Drosophila)	1.49	6.30	4.23	4.31E-06
1418713_at	Pcbd1	pterin 4 alpha carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1) 1	1.93	8.16	4.23	4.26E-06
1442865_at	Dgkk	diacylglycerol kinase kappa	3.92	16.54	4.21	1.25E-04
1452298_a_at	Myo5b	myosin Vb	1.58	6.55	4.15	2.28E-05
1450428_at	Lhx1	LIM homeobox protein 1	6.67	27.39	4.11	9.15E-04
1440220_at	AI503564	expressed sequence AI503564	1.29	5.27	4.10	1.72E-05
1438408_at	Ankrd56	ankyrin repeat domain 56	1.18	4.84	4.10	1.06E-04
1429177_x_at	Sox17	SRY-box containing gene 17	1.26	5.16	4.09	4.66E-03
1424409_at	Cldn23	claudin 23	1.07	4.39	4.08	1.86E-05
1417588_at	Galnt3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3	1.04	4.20	4.05	2.27E-05
1419549_at	Arg1	arginase 1, liver	1.42	5.75	4.05	9.81E-05
1420347_at	Plunc	palate, lung, and nasal epithelium carcinoma associated	-1.05	3.84	4.04	8.71E-04
1458591_at	Rasef	RAS and EF hand domain containing	2.44	9.70	3.98	2.67E-06
1448754_at	Rbp1	retinol binding protein 1, cellular	3.75	14.88	3.97	1.99E-07
1453102_at	Flrt3	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	10.66	42.21	3.96	4.21E-08
1450704_at	Ihh	Indian hedgehog	1.53	6.06	3.96	6.27E-05
1424463_at	2210010L05Rik	RIKEN cDNA 2210010L05 gene	1.31	5.18	3.95	2.48E-04
1454078_a_at	Gal3st1	galactose-3-O-sulfotransferase 1	1.32	5.21	3.94	2.76E-05
1426059_at	Gckr	glucokinase regulatory protein	1.57	6.18	3.93	1.04E-03
1436075_at	Sfrp5	secreted frizzled-related sequence protein 5	1.36	5.32	3.90	3.43E-03
1415856_at	Emb	embigin	3.19	12.39	3.89	2.30E-04
1421224_a_at	Tcf2	transcription factor 2	1.26	4.89	3.88	2.14E-04
1452227_at	2310045A20Rik	RIKEN cDNA 2310045A20 gene	5.50	21.34	3.88	2.45E-05
1421156_a_at	Dsc2	desmocollin 2	1.76	6.81	3.87	1.13E-04
1419523_at	Cyp3a13	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13	1.04	4.00	3.85	1.76E-03
1418069_at	Apoc2	apolipoprotein C-II	1.14	4.39	3.85	8.08E-06
1426442_at	Gpm6a	glycoprotein m6a	1.79	6.76	3.78	9.84E-05
1442257_at	Cdh6	Cadherin 6	7.32	27.69	3.78	2.41E-05
1454681_at	Rbm35a	RNA binding motif protein 35A	-1.22	3.05	3.73	3.77E-04
1435184_at	Npr3	natriuretic peptide receptor 3	1.73	6.43	3.72	6.31E-05
1460300_a_at	Ltk	leukocyte tyrosine kinase	-1.05	3.50	3.69	1.45E-04
1448783_at	Slc7a9	solute carrier family 7, member 9	1.03	3.80	3.68	3.29E-05
1415812_at	Gsn	gelsolin	6.90	25.32	3.67	2.77E-08
1460722_at	Soat2	sterol O-acyltransferase 2	1.46	5.34	3.66	8.58E-05
1416382_at	Ctsc	cathepsin C	1.53	5.57	3.65	4.15E-04
1416649_at	Ambp	alpha I microglobulin/bikunin	-1.10	3.31	3.64	2.16E-03
1429913_at	Kcnk16	potassium channel, subfamily K, member 16	1.07	3.88	3.64	1.17E-06
14292/4_at	2510010M24Rik	KIKEN CDNA Z310010M24 gene	1.65	6.00	3.64	4.19E-03
1437558_at	B130021B11Rik	KIKEN CDNA B130021B11 gene	22.52	81.19	3.61	6.68E-06
1450767_at	Nedd9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9	1.71	6.18	3.60	4.64E-05
1448780_at	Slc12a2	solute carrier family 12, member 2	1.08	3.88	3.58	4.48E-04
1419184_a_at	Fhl2	tour and a half LIM domains 2	1.58	5.64	3.58	1.07E-05

Anhang

(Fortsetzung)

			E	xpressionsär	Iderung	
Probeset	Gen-Symbol	Gen-Name	ES vs. Sox17	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺	ANOVA
1423005_a_at	Espn	espin	1.18	4.23	3.57	8.46E-06
1448949_at	Car4	carbonic anhydrase 4	171.73	611.51	3.56	1.14E-06
1439117_at	Clmn	calmin	-1.06	3.35	3.54	1.23E-04
1428809_at	1810010H24Rik	RIKEN cDNA 1810010H24 gene	1.06	3.73	3.53	6.38E-05
1418626_a_at	Clu	clusterin	3.90	13.67	3.50	1.76E-03
1453004_at	3110004L20Rik	RIKEN cDNA 3110004L20 gene	6.87	23.91	3.48	9.14E-07
1420484_a_at	Vtn	vitronectin	1.19	4.14	3.48	1.02E-04
1439232_at	1500016L03Rik	RIKEN cDNA 1500016L03 gene	2.26	7.75	3.43	2.46E-03
1421924_at	Slc2a3	solute carrier family 2, member 3	1.25	4.27	3.42	4.39E-03
1455399_at	Cnksr1	connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1	1.12	3.80	3.41	2.37E-04
1418672_at	Akr1c13	aldo-keto reductase family 1, member C13	1.23	4.16	3.39	5.15E-04
1447849_s_at	Maf	homolog	2 3.49	11.84	3.39	2.63E-06
1421137_a_at	Pkib	protein kinase inhibitor beta, cAMP dependent, testis specific	1.10	3.68	3.35	9.21E-05
1435009_at	Slc9a6	solute carrier family 9, isoform 6	3.14	10.48	3.33	6.34E-06
1416729_at	Plg	plasminogen	-1.06	3.15	3.33	7.33E-04
1448380_at	Lgals3bp	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	5.23	17.37	3.32	1.28E-06
1455436_at	Diras2	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 2	4.36	14.46	3.32	1.43E-04
1454783_at	1113ra1	interleukin 13 receptor, alpha 1	-1.23	2.68	3.31	2.02E-04
1439163_at	Zbtb16	zinc finger and BTB domain containing 16	8.52	28.12	3.30	2.35E-05
1424842_a_at	Arhgap24	Rho GTPase activating protein 24	1.55	5.12	3.29	4.22E-06
1458505_at	LOC552901	hypothetical LOC552901	4.50	14.77	3.28	1.26E-04
1415802_at	Slc16a1	solute carrier family 16, member 1	3.21	10.49	3.26	1.24E-04
1421943_at	Tgfa	transforming growth factor alpha	1.30	4.22	3.25	1.32E-04
1418572_x_at	Tnfrsf12a	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	1.17	3.79	3.23	9.75E-04
1436287_at	ENSMUSG0000074303	predicted gene, ENSMUSG0000074303	-1.18	2.73	3.22	1.02E-03
1429273_at	Bmper	BMP-binding endothelial regulator	12.90	41.59	3.22	2.31E-04
1455735_at	Ap1s3	adaptor-related protein complex AP-1, sigma 3	2.74	8.83	3.22	2.67E-04
1418374_at	Fxyd3	FXYD domain-containing ion transport regulator 3	-1.01	3.17	3.21	1.81E-03
1442229_at	Pax9	Paired box gene 9	1.05	3.38	3.20	1.40E-06
1448883_at	Lgmn	legumain	1.09	3.46	3.17	5.46E-05
1422914_at	Sp5	trans-acting transcription factor 5	1.56	4.95	3.16	4.20E-04
1444270_at	Rshl3	radial spokehead-like 3	-1.09	2.90	3.16	1.93E-03
141/1/8_at	Gipc2	GIPC PDZ domain containing family, member 2	1.09	3.42	3.15	1.10E-05
1438030_at	Kasgrp3	RAS, guanyl releasing protein 3	5.79	18.19	3.14	4.90E-06
1452861_at	2010300C02Kik	RIKEN CDNA 2010300C02 gene	1.73	5.35	3.10	4.99E-06
1416503_at	Lxn Teele1	latexin	5.22	16.15	3.10	4.14E-09
1419324_at	1 pn1 FF	ryptophan nyuroxylase 1	1.00	3.20 7.06	2.09	2.00E-04
1410907_at	FJ Cam26a1	coaguiation factor v	2.36	7.90	3.06	1.20E-04
1419430_at	Cyp2601 Muc6	cytochronie F450, family 26, subfamily a, polypeptide f	1 78	50.69	3.07	2 52E 05
1455942_at	2110001 4120:1	RIVENI (DNA 2110001A12 come	1.70	3.44	3.06	4.77E.05
144/110_at	Anora	apolinoprotoin A IV	1.52	4.02	3.05	4.77E-03
1417701_at 1443332_at	лрои ч	16 days peopate thymus cDNA_RIKEN full-length enriched library	1.20	3.63	3.03	2.67E-04
1455512 at	 Cm879	gene model 879 (NICRI)	1.21	3.48	3.00	4.92E-04
1439045 x at	Mtac2d1	membrane targeting (tandem) C2 domain containing 1	1.10	3.58	2.99	4.32E-00
1439019 at	Fras1	Fraser syndrome 1 homolog (human)	5.08	15 19	2.99	6.66E-06
1425199 a at	EnhA 115	erythrocyte protein hand 4 1-like 5	1.43	4 21	2.97	2 28E-05
1448566 at	Slc40a1	solute carrier family 40 member 1	4 79	13.96	2.91	2.38E-05
1421983 s at	Hnf4a	hepatic nuclear factor 4 alpha	1.75	3.66	2.92	2.30E 03
1426010 a at	Enh4 113	erythrocyte protein hand 4 1-like 3	3.43	9.99	2.91	5 15E-06
1423319 at	Hher	hematopoietically expressed homeobox	1.56	4 54	2.91	1 10E-03
1432466 a at	Anoe	apolipoprotein E	-1.06	2 73	2.88	2 09E-03
1419309 at	Pdnn	podoplanin	-1.06	2 72	2.88	2.692-00
1417602 at	Per?	period homolog 2 (Drosophila)	1.81	5.20	2.87	1 48E-05
1418436 at	Stx7	svntaxin 7	1.90	5.44	2.86	2.34E-06
1417421 at	S100a1	S100 calcium binding protein A1	1.75	5.01	2.86	2 22E-03
1426110_a_at	Edg2	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein- coupled receptor 2	- 1.51	4.32	2.85	6.21E-05
1440108 at	Forn2	forkhead box P2	3.05	8 72	2.85	2.32E-05
1427964 at	Cmtm8	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 8	3.35	9.54	2.85	1.58E-05
1415983 at	Len1	lymphocyte cytosolic protein 1	6.34	18.05	2.85	9.92E-05
1460256 at	Car3	carbonic anhydrase 3	1 11	3 15	2.01	6 18E-04
1433968 a at	Meof9	Multiple EGE-like-domains 9	4 97	14 09	2.04	2 29E-05
1442175 at	C030027H14Rik	RIKEN cDNA C030027H14 gene	3.62	10.26	2.83	1 70E-05
1427178 at	Tmc4	transmembrane channel-like gene family A	2 21	6.25	2.00	1 37E-04
- 14/ 1/ 0_at	1 I	a anomenorate chariner nice gene failing a	4-41	0.20	2.00	1.07 1-04

(Fortsetzung)

			Expressionsänderung			
Probeset	Gen-Symbol	Gen-Name	ES vs. Sox17	ES vs. Sox17 ⁺	Sox17 ⁻ vs. Sox17 ⁺	ANOVA
1451756_at	Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1	4.31	12.15	2.82	1.16E-05
1426697_a_at	Lrpap1	low density lipoprotein receptor-related protein associated proteir 1	n 1.06	2.97	2.80	1.62E-04
1418983_at	Inadl	InaD-like (Drosophila)	3.03	8.46	2.79	1.44E-05
1453008_at	2300002D11Rik	RIKEN cDNA 2300002D11 gene	2.85	7.94	2.78	1.16E-04
1449465_at	Reln	reelin	18.23	50.72	2.78	3.67E-06
1448955_s_at	Cadps	Ca<2+>dependent activator protein for secretion	1.67	4.62	2.77	1.55E-04
1434628_a_at	Rhpn2	rhophilin, Rho GTPase binding protein 2	1.04	2.88	2.77	1.97E-03
1448169_at	Krt18	keratin 18	23.60	65.27	2.77	1.38E-08
1418488_s_at	Ripk4	receptor-interacting serine-threonine kinase 4	3.35	9.26	2.76	5.38E-06
1452304_a_at	Arhgef5	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	1.76	4.83	2.74	6.18E-06
1437842_at	Plcxd1	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain contai ning 1	- 1.83	4.99	2.73	2.03E-04
1427386_at	Arhgef16	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 16	1.02	2.79	2.73	2.05E-03
1443665_at	AI852444	Expressed sequence AI852444	1.37	3.74	2.72	1.08E-03
1454906_at	Rarb	retinoic acid receptor, beta	7.80	21.15	2.71	4.32E-06
1427149_at	Plekha6	pleckstrin homology domain containing, family A member 6	1.93	5.21	2.70	2.29E-04
1433582_at	1190002N15Rik	RIKEN cDNA 1190002N15 gene	1.03	2.79	2.70	1.58E-05
1426968_a_at	Rdh10	retinol dehydrogenase 10 (all-trans)	2.48	6.66	2.69	4.82E-05
1449579_at	Sh3yl1	Sh3 domain YSC-like 1	1.98	5.28	2.67	9.13E-05
1449359_at	Pax1	paired box gene 1	2.33	6.20	2.66	4.46E-03
1427095_at	Cdcp1	CUB domain containing protein 1	1.04	2.77	2.66	1.36E-04
1435254_at	Plxnb1	plexin B1	2.35	6.26	2.66	1.91E-05
1425229_a_at	Tcf712	transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box	1.42	3.78	2.66	7.49E-04
1452141_a_at	Sepp1	selenoprotein P, plasma, 1	11.97	31.76	2.65	4.05E-08
1415806_at	Plat	plasminogen activator, tissue	7.31	19.36	2.65	3.11E-05
1434427_a_at	Rnf157	ring finger protein 157	2.29	6.07	2.65	7.23E-05
1424595_at	F11r	F11 receptor	1.49	3.92	2.64	7.11E-06
1455481_at	Ids	iduronate 2-sulfatase	1.36	3.60	2.64	5.52E-04
1455340_at	D030011O10Rik	RIKEN cDNA D030011O10 gene	2.34	6.15	2.63	6.13E-06
1443827_x_at	BC004044	cDNA sequence BC004044	1.31	3.40	2.60	4.85E-05
1435511_at	Syn2	synapsin II	1.45	3.78	2.60	2.83E-03
1424988_at	Mylip	myosin regulatory light chain interacting protein	1.21	3.14	2.60	2.45E-04
1425525_a_at	P2rx4	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 4	2.19	5.67	2.59	5.12E-06
1418863_at	Gata4	GATA binding protein 4	10.72	27.73	2.59	3.09E-06
1457651_x_at	Rem2	rad and gem related GTP binding protein 2	3.04	7.86	2.59	1.38E-04
1425669_at	Mobkl2b	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast)	1.18	3.04	2.57	1.16E-03
1427008_at	Rnf43	ring finger protein 43	1.91	4.91	2.57	5.18E-07
1454838_s_at	AW548124	expressed sequence AW548124	42.80	110.14	2.57	2.13E-08
1419276_at	Enpp1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	5.50	14.11	2.56	2.44E-03
1429523_a_at	Slc39a5	solute carrier family 39, member 5	1.01	2.58	2.56	2.19E-04
1420747_at	Ppnr	per-pentamer repeat gene	1.33	3.40	2.56	1.63E-04
1451258_at	Psca	prostate stem cell antigen	1.09	2.78	2.54	2.27E-04
1424726_at	Tmem150	transmembrane protein 150	1.46	3.70	2.54	2.30E-04
1457867_at	Sgpp2	sphingosine-1-phosphate phosphotase 2	1.07	2.70	2.52	2.76E-04
1427610_at	Dsp	desmoplakin	1.68	4.22	2.51	1.53E-03
1455737_at	C030002B11Rik	RIKEN cDNA C030002B11 gene	1.70	4.26	2.51	3.36E-03
1417920_at	Amn	amnionless	1.03	2.57	2.51	6.50E-04
1445898_at	Ggcx	gamma-glutamyl carboxylase	1.20	3.00	2.51	7.55E-04
1448737_at	Tspan7	tetraspanin 7	7.06	17.68	2.50	6.99E-06

A.4 PCR Oligonukleotide

Klonierung Reportergenkass	etten	
eGFP-fwd	5'-TAGCGCTAGCAATATGGCCACAACCATG-3'	
eGFP-NLS-rev	5'-GCATGAATTCTTA[TACCTTTCTCTTCTTTTTGGATC]3CTCG-	
	AGCTTGTACAGCTCGTCCAT-3'	
DsRedExpress-fwd	5'-TAGCGCTAGCCCACCGGTCGCCACCATG-3'	
DsRedExpress-fwd	5'-GCATCTCGAGCAGGAACAGGTGGTGGCG-3'	
eCFP-fwd	5'-TAGCGCTAGCCTACCGGTCGCCACCATG-3'	
eCFP-rev	5'-GCATCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATG-3'	
DsRedExpress Integration du	urch RedET Rekombination	
Sox17-DsRedExp-RedET-fwd	5'-AGCGGCGTGTCCCGTGGCCATAGCAGAGCTCGGGGTCGGT-	
	CTGGAGAGCCATGGCCTCCTCCGAGAAC-3'	
Sox17-DsRedExp-RedET-rev	5'-CCATAAAGGCGTTCATCGGCCGCCGGATGCGAGACTCCGC-	
	TTTGGCTCGGTAACGCTTACAATTTACG-3'	
Primer für RedET Subklonier	ung	
Sox17-DsRedExp-subcl-fwd	5'-AAGTCTGACTCTGGCATCATCACACCTGTGCATTGCTACATT-	
	CAGATGAACGATCGTGAAGACGAAAGGGCCTCGTG-3'	
Sox17-DsRedExp-subcl-rev	5'-CTCAAAAGATTGGTTCTATTCTTGTTATCCTATGTCTATCAAA-	
	GTATTCGATCGCTAGCGGAGTGTATACTGGC-3'	
Sonde Sox17::DsRed Southe	ernblot	T _{Annealing}
Sox17-Sonde-F	5'-TTGCAAAAACAGAAGCAACG-3'	60,0 °C
Sox17-Sonde-R	5'-GAGCTTCGCGTGGTAAAGTC-3'	60,0 °C
Typisierung von Sox17::DsR	ed und Wildtyp Allel	
P1	5'-CGCTCAGCTTTACGAGTTCC-3'	60,2 <i>°</i> C
P2	5'-CCTCGCCTTTCACCTTTACA-3'	60,2 <i>°</i> C
P3	5'-GGGTGCTTCACGTACACCTT-3'	$60,0^{\circ}\text{C}$
qPCR		
Prss3-q-F	5'-TGCCTCAGGCTGACTGTGAAG-3'	60,0°C
Prss3-q-R	5'-GATTGTCTGGCAGGGCACAG-3'	$60,0^{\circ}\text{C}$
Plet1-q-F	5'-TGACATCCCAAAGCCAGTCG-3'	60,0°C
Plet1-q-R	5'-GTCGTGTTTATGGTCTGGCTGGT-3'	60,0 °C
Mfsd6-q-F	5'-GGCTTGCCTGGTGATCCTTC-3'	60,0 °C
Mfsd6-q-R	5'-ACGCGTGGCATGACATCTTC-3'	60,0°C
0610010O12Rik-q-F	5'-CCACCTTATCCACAACAGCCAAT-3'	60,0°C
0610010O12Rik-q-R	5'-GGCCCAGGTCGTCTCTTT-3'	60,0°C
1810010H24Rik-q-F	5'-TTGCCATAAGCCGTGTCCAG-3'	60,0°C
1810010H24Rik-q-R	5'-GTGGGTGGCACCTCGAACTT-3'	60,0°C
Chsy3-q-F	5'-GGAAGGTGTGTTCGCCGTTT-3'	60,0°C
Chsy3-q-R	5'-TTTGTTCGGATGGAGCGTGA-3'	60,0°C
2210011C24Rik-q-F	5'-AGAAGGAGCGCAGACCCTGA-3'	60,0 °C
2210011C24Rik-q-R	5'-GGCTGGATTTCAAGTTGCCATT-3'	60,0°C
Gm10664-q-F	5'-CGCAGGAGATGCATTCCACTT-3'	60,0°C
Gm10664-q-R	5'-CTGAGCTGCCATCCTGTTGC-3'	60,0 °C
Sel1l3-q-F	5'-GATCGCCTGGATGGTGCTTT-3'	60,0 °C

Sel1l3-q-R	5'-TCAGGGCCGTTAGCCATCAT-3'	60,0 ° C
Ocln-q-F	5'-AGCTAAGGAGGCTCGCATGG-3'	60,0 °C
Ocln-q-R	5'-CCACCATCTCCAGGACACTCAG-3'	60,0 °C
Cadh6-q-F	5'-TGGCCATCCTTCTGTGCATC-3'	60,0 °C
Cadh6-q-R	5'-TGTCTTCCTCCGCCACCT-3'	60,0 °C
Slc22a23-q-F	5'-TCGTGGGAATGTTTGCATCC-3'	60,0 °C
Slc22a23-q-R	5'-CAGCTCAATAATGGGCGCTGT-3'	60,0 °C
Gpr120-q-F	5'-CTGTTCCTGGGCCAGCTTGT-3'	60,0 °C
Gpr120-q-R	5'-GCCCAACCGCATAGGAGAAA-3'	60,0 °C
Ttc6-q-F	5'-CCAACAACAGAGCGCAATGG-3'	60,0 °C
Ttc6-q-R	5'-CTCGATTCATGAGAGCATACTCGTTT-3'	60,0 °C
Rfx6-q-F	5'-CAGCAGCCGGAAGCAGAACA-3'	60,0 °C
Rfx6-q-R	5'-CTCTGTTGCTTGCTGCATTGG-3'	60,0 °C
2010300C02Rik-q-F	5'-CCCGGCAGAAGAGAGAGAGA-3'	60,0 °C
2010300C02Rik-q-R	5'-GGTCACAGCAGGCTTTGCAG-3'	60,0 °C
<i>in situ</i> Sonden		
Prss3-F	5'-GGAGGATACACCTGCCAAGA-3'	60,1 °C
Prss3-T7	5'-T7 ¹ -TGGTATGGTGACTGCAGAGG-3'	59,7 °C
Plet1-F	5'-AAAGCAGTGAAGGAGGACGA-3'	60,1 °C
Plet1-T7	5'-T7 ¹ -AATTTGTGCCCTGAAAGA-3'	54,1 °C
Mfsd6-F	5'-AATGAAAGGGCCACAAAGTG-3'	60,0 °C
Mfsd6-T7	5'-T7 ¹ -ATTCCCAGAATTCCCATTCC-3'	60,0 °C
0610010O12Rik-F	5'-GTTGCCAGGGAGATCAGGT-3'	60,1 °C
0610010O12Rik-T7	5'-T7 ¹ -CTGCGAGAGAACTGGGTCTT-3'	59.9 °C
1810010H24Rik-F	5'-CCATAAGCCGTGTCCAGAAT-3'	60,0 °C
1810010H24Rik-T7	5'-T7 ¹ -AAGGAGGCATGGCAATACAC-3'	60,0 °C
Chsy3-F	5'-GAGCAAAGAGGACCAACAGC-3'	60,0 °C
Chsy3-T7	5'-T7 ¹ -TCTCCCTTCATGGGAATGAG-3'	60,0 °C
2210011C24Rik-F	5'-GACGAACTCAAGCGCTTCTT-3'	59,8 °C
2210011C24Rik-T7	5'-T7 ¹ -TAGGTTTTGCAGGGTTTCCA-3'	60,5 °C
Gm10664-F	5'-CCGGACAGATACTGCGATTT-3'	60,1 °C
Gm10664-T7	5'-T7 ¹ -CCTTTGTGAAACCCACCACT-3'	59,9 °C
Sel1I3-F	5'-TATGTGGCTGAAGCACGAAG-3'	60,0 °C
Sel1l3-T7	5'-T7 ¹ -CCTCGCAGATGTGTGCTAAA-3'	60,0 °C
OcIn-F	5'-TCTTCCGGTTTCAAGAATGG-3'	60,0 °C
OcIn-T7	5'-T7 ¹ -GATGCTTCTCAGGGTGCAGT-3'	60,4 °C
Cadh6	5'-CATTTGTGGTCCAAGTCACG-3'	60,0 °C
Cadh6	5'-T7 ¹ -ACAGGAGGTTCGTCCACATC-3'	60,0 °C
Slc22a23-F	5'-GTCTCTCCCACGTGCTCTTC-3'	60,0 °C
Slc22a23-T7	5'-T7 ¹ -TGAGGTGGAGATTGGAGACC-3'	60,0 °C
Gpr120-F	5'-CCATCCCTCTAGTGCTCGTC-3'	59,8 °C
Gpr120-T7	5'-T7 ¹ -TGCGGAAGAGTCGGTAGTCT-3'	60,0 °C
Ttc6-F	5'-GGACGGGGGAATTCTTACAT-3'	60,0 °C
Ttc6-T7	5'-T7 ¹ -CCAAGGTCCTCTTCAGCAAG-3'	60,0 °C
Rfx6-F	5'-TCAGCTCCAACACATTGCTC-3'	60,0 °C
Rfx6-T7	5'-T7 ¹ -AATCTGGGTTTGCAAGTTGG-3'	60,0 °C

Anhang

Amplifizierung von Gen-Promotoren

Hnf1beta-attB1	5'-attB1 ² -TGTATGTGTGTGTGTGTAAGCAGTT-3'	59,6 °C
Hnf1beta-attB2	5'-attB2 ³ -TTTTACAAGAGAACTCCAAGTCCTG-3'	60,2 <i>°</i> C
Prss3-attB1	5'-attB1 ² -TTCTTTTGCAGTTTCTTCTGATTT-3'	59,8 °C
Prss3-attB2	5'-attB2 ³ -AGTGTGTTGACAGAAACTGGTGTAA-3'	60,0 °C
Plet1-attB1	5'-attB1 ² -TTAAGAGCTAAACTGCCCTTGTAGA-3'	60,0 °C
Plet1-attB2	5'-attB2 ³ -AGATGTCGGAGGTGTAGATGTTATC-3'	59,8 °C
Mfsd6-attB1	5'-attB1 ² -TCTCTCTCTCTCATTTCCTTAATGC-3'	59,6 °C
Mfsd6-attB2	5'-attB2 ³ -GTTGGGTGGCTAGCTCCTCT-3'	60,8 °C
0610010O12Rik-attB1	5'-attB1 ² -CATCCTCAGCTATATAGGGAGTTCA-3'	60,0 °C
0610010O12Rik-attB2	5'-attB2 ³ -ATAGCCCTCACCTCTCTGCTC-3'	60,0 °C
1810010H24Rik-attB1	5'-attB1 ² -AACCCCTTCTAAGCTGTTGTTTACT-3'	60,0 °C
1810010H24Rik-attB2	5'-attB2 ³ -CCAGTAGCATTATAAAGGACACGAT-3'	59,8 °C
Chsy3-attB1	5'-attB1 ² -ATTTGTTCGCATTTTGTAGTCATTT-3'	60,2 <i>°</i> C
Chsy3-attB2	5'-attB2 ³ -CGTAGTAGGAGCAAAGACTGGAG-3'	59,6 °C
2210011C24Rik-attB1	5'-attB1 ² -TAGACTAGTGAGGTCAGCGAAAGAC-3'	60,5 °C
2210011C24Rik-attB2	5'-attB2 ³ -CTACAGATGAATGATCACTGGAGGT-3'	60,8 °C
Gm10664-attB1	5'-attB1 ² -GCTACCACATCTGGCTTATACCTTA-3'	60,0 °C
Gm10664-attB2	5'-attB2 ³ -ATAAGCAAATATTGGTGAAATGGAC-3'	59,6 °C
Sel1l3-attB1	5'-attB1 ² -AACATGGGTTAACTATCTCAGGACA-3'	60,2 <i>°</i> C
Sel1l3-attB2	5'-attB2 ³ -CTCACCAGGTAGCAGAGAAAGAG-3'	59,7 °C
OcIn-attB1	5'-attB1 ² -CAAAAACTATATTTAGCCAGGCACT-3'	59,2 <i>°</i> C
OcIn-attB2	5'-attB2 ³ -GACCTGCATGTATTTGCATACG-3'	60,4 °C
Cadh6-attB1	5'-attB1 ² -AGTTAGATCACTCAGAAGCCAAGTG-3'	60,3 °C
Cadh6-attB2	5'-attB2 ³ -CATCAACGCTACGGAATTAAAATAA-3'	60,6 °C
Slc22a23-attB1	5'-attB1 ² -CGTGTCAGAATTTCAGCAGTAAGTA-3'	59,9 <i>°</i> C
Slc22a23-attB2	5'-attB2 ³ -AGAAACCGTTCGAGTCCTCAG-3'	60,8 °C
2610528J11Rik-attB1	5'-attB1 ² -AAGTGGGACTTCATCCTTAGAGACT-3'	60,1 °C
2610528J11Rik-attB2	5'-attB2 ³ -GAGGACTCACTCTAACACATTGAGG-3'	60,6 °C
AW548124-attB1	5'-attB1 ² -GCACTGCAGGAAGAGAGATAACTT-3'	60,4 °C
AW548124-attB2	5'-attB2 ³ -CGAAGAGCACGTTGAGGAC-3'	59,6 °C
Gpr120-attB1	5'-attB1 ² -TAGGATCTGCACATCATGTTAGAAG-3'	59,7 °C
Gpr120-attB2	5'-attB2 ³ -AGCAGTGAGACGACAAAGATGAG-3'	61,0 °C
Ttc6-attB1	5'-attB1 ² -AACTAAAAACAACAACAAGCGACT-3'	59,7 °C
Ttc6-attB2	5'-attB2 ³ -AAGGAAAAATTAATGATACCCTTGC-3'	60,0 °C
Rfx6-attB1	5'-attB1 ² -ACATAAGCGCAGCTTGACCT-3'	59,9 <i>°</i> C
Rfx6-attB2	5'-attB2 ³ -AAACGAAATGGTTCCGACAG-3'	60.6 °C
2010300C02Rik-attB1	5'-attB1 ² -TGAGGGAATTAATTTCATTTAACCA-3'	60,0 °C
2010300C02Rik-attB2	5'-attB2 ³ -CTGGGCTACCTGAGCTCTTCT-3'	60,2 <i>°</i> C

¹T7-Sequenz: 5'–CGTAATACGACTCACTATAGGG–3' ²attB1-Sequenz: 5'–GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT–3' ³attB2-Sequenz: 5'–GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT–3'

Literaturverzeichnis

- [1] Silver LM (1995). Mouse Genetics. Oxford University Press, Oxford.
- [2] Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MF and Fisher EM (2000). Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet*, 24:23–25.
- [3] Ferris SD, Sage RD, Prager EM, Ritte U and Wilson AC (1983). Mitochondrial DNA evolution in mice. *Genetics*, 105:681–721.
- [4] Bonhomme F (1986). Evolutionary relationships in the genus Mus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 127:19–34.
- [5] Berry RJ and Corti M (1990). Genetic variation and evolution in the house mouse. *The Linnean Society of London*, 41:300pp.
- [6] Boursot P, Auffray JC, Britton-Davidian J and Bonhomme F (1993). The Evolution of House Mice. Annual Review of Ecology and Systematics, 24:119–152.
- [7] Hammer MF and Silver LM (1993). Phylogenetic analysis of the alpha-globin pseudogene-4 (Hba-ps4) locus in the house mouse species complex reveals a stepwise evolution of t haplotypes. *Mol Biol Evol*, 10:971–1001.
- [8] Bonhomme F (1993). The Wild House Mouse and its relatives. Oxford University Press.
- [9] Waterston RH, Lindblad-Toh K et al (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature, 420:520–562.
- [10] Lander ES, Linton LM *et al* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409:860–921.
- [11] Venter JC, Adams MD et al (2001). The sequence of the human genome. Science, 291:1304– 1351.
- [12] Hedges SB (2002). The origin and evolution of model organisms. Nat Rev Genet, 3:838-849.
- [13] Springer MS, Murphy WJ, Eizirik E and O'Brien SJ (2003). Placental mammal diversification and the Cretaceous-Tertiary boundary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:1056–1061.
- [14] Evans MJ and Kaufman MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292:154–156.
- [15] Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA and Kucherlapati RS (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, 317:230–234.
- [16] Thomas KR and Capecchi MR (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51:503–512.
- [17] Capecchi MR (1989). Altering the genome by homologous recombination. Science, 244:1288– 1292.
- [18] Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, Hübner K and Schöler HR (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*, 122:881–894.

- [19] Pesce M, Gross MK and Schöler HR (1998). In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *Bioessays*, 20:722–732.
- [20] Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K and Gruss P (1990). New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature*, 344:435–439.
- [21] Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H and Smith A (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95:379–391.
- [22] Tam PPL, Gad JM, Kinder SJ, Tsang TE and Behringer RR (2001). Morphogenetic tissue movement and the establishment of body plan during development from blastocyst to gastrula in the mouse. *Bioessays*, 23:508–517.
- [23] Wiley LM, Kidder GM and Watson AJ (1990). Cell polarity and development of the first epithelium. *Bioessays*, 12:67–73.
- [24] Kunath T, Strumpf D and Rossant J (2002). Trophoblast stem cells. In Stem cell biology. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Marshak DR, Gardner RL and Gottlieb D, (eds).
- [25] Bielinska M, Narita N and Wilson DB (1999). Distinct roles for visceral endoderm during embryonic mouse development. Int J Dev Biol, 43:183–205.
- [26] Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K and Behringer R (2002). Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3 edition.
- [27] Gardner RL (1983). Origin and differentiation of extraembryonic tissues in the mouse. Int Rev Exp Pathol, 24:63–133.
- [28] Snow M (1977). Gastrulation in the mouse: Growth and regionalization of the epiblast. J Embryol Exp Morphol, 42:293–303.
- [29] Hogan B, Costantini F and Beddington R (1994). Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S., 2 spi edition.
- [30] Patten BM (1971). Early Embryology of the Chick. Fifth, New York.
- [31] Hamburger V and Hamilton HL (1951). Series of Embryonic Chicken Growth. *J Morphology*, 88:49 92.
- [32] Kwon GS, Viotti M and Hadjantonakis AK (2008). The endoderm of the mouse embryo arises by dynamic widespread intercalation of embryonic and extraembryonic lineages. *Dev Cell*, 15:509– 520.
- [33] Lawson KA, Meneses JJ and Pedersen RA (1991). Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development*, 113:891–911.
- [34] Kinder SJ, Tsang TE, Wakamiya M, Sasaki H, Behringer RR, Nagy A and Tam PP (2001). The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm. *Development*, 128:3623–3634.
- [35] Martin GR (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78:7634–7638.
- [36] Brook FA and Gardner RL (1997). The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A, 94:5709–5712.
- [37] Smith A (2002). Trophoblast stem cells. In Stem cell biology. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, d. r. marshak, r. l. gardner und d. gottlieb, eds. edition.

- [38] Bradley A, Evans M, Kaufman MH and Robertson E (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309:255–256.
- [39] Rossant J and Nagy A (1995). Genome engineering: the new mouse genetics. Nat Med, 1:592– 594.
- [40] Smith AG and Hooper ML (1987). Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev Biol*, 121:1–9.
- [41] Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M and Rogers D (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336:688–690.
- [42] Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA and Gough NM (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336:684–687.
- [43] Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC, Kelso A and Metcalf D (1987). Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J*, 6:3995–4002.
- [44] Burdon T, Smith A and Savatier P (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol*, 12:432–438.
- [45] Niwa H, Burdon T, Chambers I and Smith A (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, 12:2048–2060.
- [46] Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T and Yokota T (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*, 18:4261–4269.
- [47] Nichols J, Davidson D, Taga T, Yoshida K, Chambers I and Smith A (1996). Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis. *Mech Dev*, 57:123–131.
- [48] Rossant J (2001). Stem cells from the Mammalian blastocyst. Stem Cells, 19:477–482.
- [49] Nichols J, Chambers I, Taga T and Smith A (2001). Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development*, 128:2333–2339.
- [50] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS and Jones JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282:1145–1147.
- [51] Brivanlou AH, Gage FH, Jaenisch R, Jessell T, Melton D and Rossant J (2003). Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science*, 300:913–916.
- [52] Boiani M and Schöler HR (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. Nat Rev Mol Cell Biol, 6:872–884.
- [53] Dani C, Chambers I, Johnstone S, Robertson M, Ebrahimi B, Saito M, Taga T, Li M, Burdon T, Nichols J and Smith A (1998). Paracrine induction of stem cell renewal by LIF-deficient cells: a new ES cell regulatory pathway. *Dev Biol*, 203:149–162.
- [54] MacKillop J (2004). A dictionary of Celtic mythology. Oxford University Press, Oxford, New York.
- [55] Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S and Smith A (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113:643–655.

- [56] Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M and Yamanaka S (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113:631–642.
- [57] Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y and Lemischka IR (2006). Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*, 442:533–538.
- [58] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R and Young RA (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122:947–956.
- [59] Boyer LA, Mathur D and Jaenisch R (2006). Molecular control of pluripotency. Curr Opin Genet Dev, 16:455–462.
- [60] Mathur D, Danford TW, Boyer LA, Young RA, Gifford DK and Jaenisch R (2008). Analysis of the mouse embryonic stem cell regulatory networks obtained by ChIP-chip and ChIP-PET. *Genome Biol*, 9:R126.
- [61] Rossant J, Chazaud C and Yamanaka Y (2003). Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358:1341–8; discussion 1349.
- [62] Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T and Rossant J (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev Cell*, 10:615–624.
- [63] Plusa B, Piliszek A, Frankenberg S, Artus J and Hadjantonakis AK (2008). Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development*, 135:3081–3091.
- [64] Morrisey EE, Tang Z, Sigrist K, Lu MM, Jiang F, Ip HS and Parmacek MS (1998). GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev*, 12:3579–3590.
- [65] Morrisey EE, Musco S, Chen MY, Lu MM, Leiden JM and Parmacek MS (2000). The gene encoding the mitogen-responsive phosphoprotein Dab2 is differentially regulated by GATA-6 and GATA-4 in the visceral endoderm. J Biol Chem, 275:19949–19954.
- [66] Chiba H, Gotoh T, Kojima T, Satohisa S, Kikuchi K, Osanai M and Sawada N (2003). Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 286:288–297.
- [67] Chiba H, Sakai N, Murata M, Osanai M, Ninomiya T, Kojima T and Sawada N (2006). The nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha acts as a morphogen to induce the formation of microvilli. *J Cell Biol*, 175:971–980.
- [68] Koutsourakis M, Langeveld A, Patient R, Beddington R and Grosveld F (1999). The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development*, 126:723–732.
- [69] Duncan SA, Nagy A and Chan W (1997). Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development*, 124:279–287.
- [70] Fujikura J, Yamato E, Yonemura S, Hosoda K, Masui S, Nakao K, ichi Miyazaki Ji J and Niwa H (2002). Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev*, 16:784– 789.
- [71] Yang DH, Smith ER, Roland IH, Sheng Z, He J, Martin WD, Hamilton TC, Lambeth JD and Xu XX (2002). Disabled-2 is essential for endodermal cell positioning and structure formation during mouse embryogenesis. *Dev Biol*, 251:27–44.

- [72] Li L, Arman E, Ekblom P, Edgar D, Murray P and Lonai P (2004). Distinct GATA6- and laminindependent mechanisms regulate endodermal and ectodermal embryonic stem cell fates. *Development*, 131:5277–5286.
- [73] Enders AC, Given RL and Schlafke S (1978). Differentiation and migration of endoderm in the rat and mouse at implantation. *Anat Rec*, 190:65–77.
- [74] Meehan RR, Barlow DP, Hill RE, Hogan BL and Hastie ND (1984). Pattern of serum protein gene expression in mouse visceral yolk sac and foetal liver. *EMBO J*, 3:1881–1885.
- [75] Hogan BL and Tilly R (1981). Cell interactions and endoderm differentiation in cultured mouse embryos. J Embryol Exp Morphol, 62:379–394.
- [76] Perea-Gómez A, Shawlot W, Sasaki H, Behringer RR and Ang S (1999). HNF3beta and Lim1 interact in the visceral endoderm to regulate primitive streak formation and anterior-posterior polarity in the mouse embryo. *Development*, 126:4499–4511.
- [77] Shawlot W, Wakamiya M, Kwan KM, Kania A, Jessell TM and Behringer RR (1999). Lim1 is required in both primitive streak-derived tissues and visceral endoderm for head formation in the mouse. *Development*, 126:4925–4932.
- [78] Nakano T, Murata T, Matsuo I and Aizawa S (2000). OTX2 directly interacts with LIM1 and HNF-3beta. *Biochem Biophys Res Commun*, 267:64–70.
- [79] Tam PPL, Khoo PL, Wong N, Tsang TE and Behringer RR (2004). Regionalization of cell fates and cell movement in the endoderm of the mouse gastrula and the impact of loss of Lhx1(Lim1) function. *Dev Biol*, 274:171–187.
- [80] Lewis SL and Tam PPL (2006). Definitive endoderm of the mouse embryo: formation, cell fates, and morphogenetic function. *Dev Dyn*, 235:2315–2329.
- [81] Tremblay KD, Hoodless PA, Bikoff EK and Robertson EJ (2000). Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process. *Development*, 127:3079–3090.
- [82] Hoodless PA, Pye M, Chazaud C, Labbé E, Attisano L, Rossant J and Wrana JL (2001). FoxH1 (Fast) functions to specify the anterior primitive streak in the mouse. *Genes Dev*, 15:1257–1271.
- [83] Hart AH, Hartley L, Sourris K, Stadler ES, Li R, Stanley EG, Tam PPL, Elefanty AG and Robb L (2002). Mixl1 is required for axial mesendoderm morphogenesis and patterning in the murine embryo. *Development*, 129:3597–3608.
- [84] Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gad JM, Tajima Y, Taya C, Kurohmaru M, Sanai Y, Yonekawa H, Yazaki K, Tam PPL and Hayashi Y (2002). Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development*, 129:2367–2379.
- [85] Fukuda K and Kikuchi Y (2005). Endoderm development in vertebrates: fate mapping, induction and regional specification. *Dev Growth Differ*, 47:343–355.
- [86] Watt AJ, Zhao R, Li J and Duncan SA (2007). Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA4. BMC Dev Biol, 7:37.
- [87] Lim SM, Pereira L, Wong MS, Hirst CE, Vranken BEV, Pick M, Trounson A, Elefanty AG and Stanley EG (2009). Enforced expression of MixI1 during mouse ES cell differentiation suppresses hematopoietic mesoderm and promotes endoderm formation. *Stem Cells*, 27:363–374.
- [88] Wells JM and Melton DA (2000). Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development*, 127:1563–1572.
- [89] Jung J, Zheng M, Goldfarb M and Zaret KS (1999). Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science*, 284:1998–2003.

- [90] Tremblay KD and Zaret KS (2005). Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Dev Biol*, 280:87–99.
- [91] Cleaver O and Krieg PA (2001). Notochord patterning of the endoderm. Dev Biol, 234:1–12.
- [92] Kim SK, Hebrok M and Melton DA (1997). Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. *Development*, 124:4243–4252.
- [93] Hebrok M, Kim SK, Jacques BS, McMahon AP and Melton DA (2000). Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development*, 127:4905–4913.
- [94] Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N and Lovell-Badge R (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348:450–452.
- [95] Bowles J, Schepers G and Koopman P (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*, 227:239–255.
- [96] Kiefer JC (2007). Back to basics: Sox genes. Dev Dyn, 236:2356-2366.
- [97] Niimi T, Hayashi Y, Futaki S and Sekiguchi K (2004). SOX7 and SOX17 regulate the parietal endoderm-specific enhancer activity of mouse laminin alpha1 gene. J Biol Chem, 279:38055– 38061.
- [98] Downes M and Koopman P (2001). SOX18 and the transcriptional regulation of blood vessel development. *Trends Cardiovasc Med*, 11:318–324.
- [99] Kanai Y, Kanai-Azuma M, Noce T, Saido TC, Shiroishi T, Hayashi Y and Yazaki K (1996). Identification of two Sox17 messenger RNA isoforms, with and without the high mobility group box region, and their differential expression in mouse spermatogenesis. J Cell Biol, 133:667–681.
- [100] Shimoda M, Kanai-Azuma M, Hara K, Miyazaki S, Kanai Y, Monden M and ichi Miyazaki J (2007). Sox17 plays a substantial role in late-stage differentiation of the extraembryonic endoderm in vitro. J Cell Sci, 120:3859–3869.
- [101] Niakan KK, Ji H, Maehr R, Vokes SA, Rodolfa KT, Sherwood RI, Yamaki M, Dimos JT, Chen AE, Melton DA, McMahon AP and Eggan K (2010). Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. *Genes Dev*, 24:312–326.
- [102] Spence JR, Lange AW, Lin SCJ, Kaestner KH, Lowy AM, Kim I, Whitsett JA and Wells JM (2009). Sox17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells. *Dev Cell*, 17:62–74.
- [103] Kim I, Saunders TL and Morrison SJ (2007). Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell*, 130:470–483.
- [104] Hyslop LA, Armstrong L, Stojkovic M and Lako M (2005). Human embryonic stem cells: biology and clinical implications. *Expert Rev Mol Med*, 7:1–21.
- [105] Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M and Smith A (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol*, 21:183–186.
- [106] Martin GR, Wiley LM and Damjanov I (1977). The development of cystic embryoid bodies in vitro from clonal teratocarcinoma stem cells. *Dev Biol*, 61:230–244.
- [107] Weitzer G (2006). Embryonic stem cell-derived embryoid bodies: an in vitro model of eutherian pregastrulation development and early gastrulation. *Handb Exp Pharmacol*, 21–51.
- [108] Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, Fehling HJ and Keller G (2004). Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development*, 131:1651–1662.

- [109] Yasunaga M, Tada S, Torikai-Nishikawa S, Nakano Y, Okada M, Jakt LM, Nishikawa S, Chiba T, Era T and Nishikawa SI (2005). Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells. *Nat Biotechnol*, 23:1542–1550.
- [110] Tada S, Era T, Furusawa C, Sakurai H, Nishikawa S, Kinoshita M, Nakao K, Chiba T and Nishikawa SI (2005). Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. *Development*, 132:4363–4374.
- [111] D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E and Baetge EE (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol*, 23:1534–1541.
- [112] Engelke DR, Krikos A, Bruck ME and Ginsburg D (1990). Purification of Thermus aquaticus DNA polymerase expressed in Escherichia coli. *Anal Biochem*, 191:396–400.
- [113] Tucker KL, Wang Y, Dausman J and Jaenisch R (1997). A transgenic mouse strain expressing four drug-selectable marker genes. *Nucleic Acids Res*, 25:3745–3746.
- [114] Nichols J, Evans EP and Smith AG (1990). Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development*, 110:1341–1348.
- [115] Shein HM and Enders JF (1962). Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 48:1164–1172.
- [116] Gluzman Y (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23:175–182.
- [117] Osoegawa K, Tateno M, Woon PY, Frengen E, Mammoser AG, Catanese JJ, Hayashizaki Y and de Jong PJ (2000). Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. *Genome Res*, 10:116–128.
- [118] Frengen E, Weichenhan D, Zhao B, Osoegawa K, van Geel M and de Jong PJ (1999). A modular, positive selection bacterial artificial chromosome vector with multiple cloning sites. *Genomics*, 58:250–253.
- [119] Tanaka TS, Jaradat SA, Lim MK, Kargul GJ, Wang X, Grahovac MJ, Pantano S, Sano Y, Piao Y, Nagaraja R, Doi H, Wood WH, Becker KG and Ko MS (2000). Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:9127–9132.
- [120] Kargul GJ, Dudekula DB, Qian Y, Lim MK, Jaradat SA, Tanaka TS, Carter MG and Ko MS (2001). Verification and initial annotation of the NIA mouse 15K cDNA clone set. *Nat Genet*, 28:17–18.
- [121] VanBuren V, Piao Y, Dudekula DB, Qian Y, Carter MG, Martin PR, Stagg CA, Bassey UC, Aiba K, Hamatani T, Kargul GJ, Luo AG, Kelso J, Hide W and Ko MSH (2002). Assembly, verification, and initial annotation of the NIA mouse 7.4K cDNA clone set. *Genome Res*, 12:1999–2003.
- [122] Birnboim HC and Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7:1513–1523.
- [123] Chomczynski P and Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162:156–159.
- [124] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350–1354.
- [125] Kretz K, Callen W and Hedden V (1994). Cycle sequencing. PCR Methods Appl, 3:S107-S112.
- [126] Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, 74:5463–5467.

- [127] Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29:e45.
- [128] Inoue H, Nojima H and Okayama H (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96:23–28.
- [129] Landy A (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. Annu Rev Biochem, 58:913–949.
- [130] Southern E (2006). Southern blotting. Nat Protoc, 1:518–525.
- [131] Gissel C, Voolstra C, Doss MX, Koehler CI, Winkler J, Hescheler J and Sachinidis A (2005). An optimized embryonic stem cell model for consistent gene expression and developmental studies: a fundamental study. *Thromb Haemost*, 94:719–727.
- [132] Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B and Speed TP (2003). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*, 31:e15.
- [133] Eisen MB, Spellman PT, Brown PO and Botstein D (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:14863–14868.
- [134] de Hoon MJL, Imoto S, Nolan J and Miyano S (2004). Open source clustering software. *Bioin-formatics*, 20:1453–1454.
- [135] Saldanha AJ (2004). Java Treeview–extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics*, 20:3246–3248.
- [136] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM and Sherlock G (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*, 25:25–9. PMID: 10802651.
- [137] Kanehisa M and Goto S (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 28:27–30.
- [138] Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC and Lempicki RA (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*, 4:P3.
- [139] Wilkinson DG (1999). In Situ Hybridization: A Practical Approach. Oxford University Press.
- [140] Sinner D, Rankin S, Lee M and Zorn AM (2004). Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes. *Development*, 131:3069–3080.
- [141] Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD and Smith AE (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39:499–509.
- [142] Lanford RE, Kanda P and Kennedy RC (1986). Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. *Cell*, 46:575–82. PMID: 3015419.
- [143] Fischer-Fantuzzi L and Vesco C (1988). Cell-dependent efficiency of reiterated nuclear signals in a mutant simian virus 40 oncoprotein targeted to the nucleus. *Mol Cell Biol*, 8:5495–5503.
- [144] Kurosawa H (2007). Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. J Biosci Bioeng, 103:389–398.
- [145] Höpfl G, Gassmann M and Desbaillets I (2004). Differentiating embryonic stem cells into embryoid bodies. *Methods Mol Biol*, 254:79–98.
- [146] Karbanová J and Mokrý J (2002). Histological and histochemical analysis of embryoid bodies. *Acta Histochem*, 104:361–365.

- [147] Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A and Auffray C (2005). Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res*, 33:e56.
- [148] Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M and Ragg T (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 7:3.
- [149] Benjamini Y HY (1995). Controlling the false dicovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. JRSS B, 57::289–300.
- [150] Hou J, Charters AM, Lee SC, Zhao Y, Wu MK, Jones SJM, Marra MA and Hoodless PA (2007). A systematic screen for genes expressed in definitive endoderm by Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). *BMC Dev Biol*, 7:92.
- [151] Sherwood RI, Jitianu C, Cleaver O, Shaywitz DA, Lamenzo JO, Chen AE, Golub TR and Melton DA (2007). Prospective isolation and global gene expression analysis of definitive and visceral endoderm. *Dev Biol*, 304:541–555.
- [152] Hudson C, Clements D, Friday RV, Stott D and Woodland HR (1997). Xsox17alpha and -beta mediate endoderm formation in Xenopus. *Cell*, 91:397–405.
- [153] Clements D, Cameleyre I and Woodland HR (2003). Redundant early and overlapping larval roles of Xsox17 subgroup genes in Xenopus endoderm development. *Mech Dev*, 120:337–348.
- [154] Sinner D, Kordich JJ, Spence JR, Opoka R, Rankin S, Lin SCJ, Jonatan D, Zorn AM and Wells JM (2007). Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 27:7802–7815.
- [155] He X (2003). A Wnt-Wnt situation. Dev Cell, 4:791–797.
- [156] Klein PS and Melton DA (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:8455–8459.
- [157] Boffelli D, McAuliffe J, Ovcharenko D, Lewis KD, Ovcharenko I, Pachter L and Rubin EM (2003). Phylogenetic shadowing of primate sequences to find functional regions of the human genome. *Science*, 299:1391–1394.
- [158] Wasserman WW, Palumbo M, Thompson W, Fickett JW and Lawrence CE (2000). Humanmouse genome comparisons to locate regulatory sites. *Nat Genet*, 26:225–228.
- [159] Lenhard B, Sandelin A, Mendoza L, Engström P, Jareborg N and Wasserman WW (2003). Identification of conserved regulatory elements by comparative genome analysis. *J Biol*, 2:13.
- [160] Sandelin A, Wasserman WW and Lenhard B (2004). ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucleic Acids Res*, 32:W249–W252.
- [161] Pollock R and Treisman R (1990). A sensitive method for the determination of protein-DNA binding specificities. *Nucleic Acids Res*, 18:6197–6204.
- [162] Bi C and Rogan PK (2006). BIPAD: a web server for modeling bipartite sequence elements. BMC Bioinformatics, 7:76.
- [163] Hescheler J, Sachinidis A, Chen S and Winkler J (2006). The FunGenES consortium: functional genomics in engineered embryonic stem cells. *Stem Cell Rev*, 2:1–4.
- [164] Schulz H, Kolde R, Adler P et al. (2009). The FunGenES database: a genomics resource for mouse embryonic stem cell differentiation. PLoS One, 4:e6804.

- [165] Doss MX, Wagh V, Schulz H, Kull M, Kolde R, Pfannkuche K, Nolden T, Himmelbauer H, Vilo J, Hescheler J and Sachinidis A (2010). Global transcriptomic analysis of murine embryonic stem cell-derived brachyury (T) cells. *Genes Cells*.
- [166] Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML and Lukyanov SA (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol*, 17:969–973.
- [167] Bevis BJ and Glick BS (2002). Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). Nat Biotechnol, 20:83–87.
- [168] Vintersten K, Monetti C, Gertsenstein M, Zhang P, Laszlo L, Biechele S and Nagy A (2004). Mouse in red: red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals. *Genesis*, 40:241–246.
- [169] Long JZ, Lackan CS and Hadjantonakis AK (2005). Genetic and spectrally distinct in vivo imaging: embryonic stem cells and mice with widespread expression of a monomeric red fluorescent protein. *BMC Biotechnol*, 5:20.
- [170] Strack RL, Strongin DE, Bhattacharyya D, Tao W, Berman A, Broxmeyer HE, Keenan RJ and Glick BS (2008). A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nat Methods*, 5:955–957.
- [171] Hadjantonakis AK, Dickinson ME, Fraser SE and Papaioannou VE (2003). Technicolour transgenics: imaging tools for functional genomics in the mouse. *Nat Rev Genet*, 4:613–625.
- [172] Heo J, Lee JS, Chu IS, Takahama Y and Thorgeirsson SS (2005). Spontaneous differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro: characterization by global gene expression profiles. *Biochem Biophys Res Commun*, 332:1061–1069.
- [173] Dang SM, Gerecht-Nir S, Chen J, Itskovitz-Eldor J and Zandstra PW (2004). Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells*, 22:275–282.
- [174] Koike M, Sakaki S, Amano Y and Kurosawa H (2007). Characterization of embryoid bodies of mouse embryonic stem cells formed under various culture conditions and estimation of differentiation status of such bodies. *J Biosci Bioeng*, 104:294–299.
- [175] Smyth N, Vatansever HS, Murray P, Meyer M, Frie C, Paulsson M and Edgar D (1999). Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. J Cell Biol, 144:151–160.
- [176] Li S, Edgar D, Fässler R, Wadsworth W and Yurchenco PD (2003). The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev Cell*, 4:613–624.
- [177] Cai KQ, Capo-Chichi CD, Rula ME, Yang DH and Xu XX (2008). Dynamic GATA6 expression in primitive endoderm formation and maturation in early mouse embryogenesis. *Dev Dyn*, 237:2820–2829.
- [178] Grover A, Oshima RG and Adamson ED (1983). Epithelial layer formation in differentiating aggregates of F9 embryonal carcinoma cells. J Cell Biol, 96:1690–1696.
- [179] Adamson ED, Strickland S, Tu M and Kahan B (1985). A teratocarcinoma-derived endoderm stem cell line (1H5) that can differentiate into extra-embryonic endoderm cell types. *Differentiation*, 29:68–76.
- [180] Niwa H, Miyazaki J and Smith AG (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 24:372–376.
- [181] Pesce M and Schöler HR (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. Stem Cells, 19:271–278.

- [182] Hamazaki T, Oka M, Yamanaka S and Terada N (2004). Aggregation of embryonic stem cells induces Nanog repression and primitive endoderm differentiation. *J Cell Sci*, 117:5681–5686.
- [183] Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais C and Leiden JM (1997). GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev*, 11:1048–1060.
- [184] Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA and Olson EN (1997). Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev*, 11:1061–1072.
- [185] Narita N, Bielinska M and Wilson DB (1997). Wild-type endoderm abrogates the ventral developmental defects associated with GATA-4 deficiency in the mouse. *Dev Biol*, 189:270–274.
- [186] Abe K, Niwa H, Iwase K, Takiguchi M, Mori M, Abé SI, Abe K and Yamamura KI (1996). Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. *Exp Cell Res*, 229:27–34.
- [187] Miki K (1999). Volume of liquid below the epithelium of an F9 cell as a signal for differentiation into visceral endoderm. *J Cell Sci*, 112 Pt 18:3071–3080.
- [188] Ishikawa T, Nakayama S, Nakagawa T, Horiguchi K, Misawa H, Kadowaki M, Nakao A, Inoue S, Komuro T and Takaki M (2004). Characterization of in vitro gutlike organ formed from mouse embryonic stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286:C1344–C1352.
- [189] Matsui T, Kanai-Azuma M, Hara K, Matoba S, Hiramatsu R, Kawakami H, Kurohmaru M, Koopman P and Kanai Y (2006). Redundant roles of Sox17 and Sox18 in postnatal angiogenesis in mice. J Cell Sci, 119:3513–3526.
- [190] Liao WP, Uetzmann L, Burtscher I and Lickert H (2009). Generation of a mouse line expressing Sox17-driven Cre recombinase with specific activity in arteries. *Genesis*, 47:476–483.
- [191] Peters H, Neubüser A, Kratochwil K and Balling R (1998). Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev*, 12:2735–2747.
- [192] Peters H, Neubüser A and Balling R (1998). Pax genes and organogenesis: Pax9 meets tooth development. Eur J Oral Sci, 106 Suppl 1:38–43.
- [193] LeClair EE, Bonfiglio L and Tuan RS (1999). Expression of the paired-box genes Pax-1 and Pax-9 in limb skeleton development. *Dev Dyn*, 214:101–115.
- [194] Peters H, Wilm B, Sakai N, Imai K, Maas R and Balling R (1999). Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. *Development*, 126:5399–5408.
- [195] Jiang Y, Tarzami S, Burch JB and Evans T (1998). Common role for each of the cGATA-4/5/6 genes in the regulation of cardiac morphogenesis. *Dev Genet*, 22:263–277.
- [196] Grépin C, Robitaille L, Antakly T and Nemer M (1995). Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol*, 15:4095–4102.
- [197] Grépin C, Nemer G and Nemer M (1997). Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development*, 124:2387–2395.
- [198] Ramalho-Santos M, Melton DA and McMahon AP (2000). Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development*, 127:2763–2772.
- [199] van den Brink GR (2007). Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol Rev*, 87:1343–1375.

- [200] Beppu H, Kawabata M, Hamamoto T, Chytil A, Minowa O, Noda T and Miyazono K (2000). BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev Biol*, 221:249–258.
- [201] Kitisin K, Saha T, Blake T, Golestaneh N, Deng M, Kim C, Tang Y, Shetty K, Mishra B and Mishra L (2007). Tgf-Beta signaling in development. *Sci STKE*, 2007:cm1.
- [202] Watabe T and Miyazono K (2009). Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res*, 19:103–115.
- [203] Feldman B, Poueymirou W, Papaioannou VE, DeChiara TM and Goldfarb M (1995). Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science*, 267:246–249.
- [204] Goldin SN and Papaioannou VE (2003). Paracrine action of FGF4 during periimplantation development maintains trophectoderm and primitive endoderm. *Genesis*, 36:40–47.
- [205] Hogan BLM and Kolodziej PA (2002). Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis. Nat Rev Genet, 3:513–523.
- [206] Baer MM, Chanut-Delalande H and Affolter M (2009). Cellular and molecular mechanisms underlying the formation of biological tubes. *Curr Top Dev Biol*, 89:137–162.
- [207] Monaghan AP, Kaestner KH, Grau E and Schütz G (1993). Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development*, 119:567–578.
- [208] Dufort D, Schwartz L, Harpal K and Rossant J (1998). The transcription factor HNF3beta is required in visceral endoderm for normal primitive streak morphogenesis. *Development*, 125:3015– 3025.
- [209] Kaestner KH, Hiemisch H and Schütz G (1998). Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol Cell Biol*, 18:4245–4251.
- [210] Duncan SA, Manova K, Chen WS, Hoodless P, Weinstein DC, Bachvarova RF and Darnell JE (1994). Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:7598–7602.
- [211] Coffinier C, Thépot D, Babinet C, Yaniv M and Barra J (1999). Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development*, 126:4785–4794.
- [212] Dziadek MA and Andrews GK (1983). Tissue specificity of alpha-fetoprotein messenger RNA expression during mouse embryogenesis. EMBO J, 2:549–554.
- [213] Sousa-Nunes R, Rana AA, Kettleborough R, Brickman JM, Clements M, Forrest A, Grimmond S, Avner P, Smith JC, Dunwoodie SL and Beddington RSP (2003). Characterizing embryonic gene expression patterns in the mouse using nonredundant sequence-based selection. *Genome Res*, 13:2609–2620.
- [214] Zhao SH, Simmons DG, Cross JC, Scheetz TE, Casavant TL, Soares MB and Tuggle CK (2004). PLET1 (C11orf34), a highly expressed and processed novel gene in pig and mouse placenta, is transcribed but poorly spliced in human. *Genomics*, 84:114–125.
- [215] Frankenberg S, Smith L, Greenfield A and Zernicka-Goetz M (2007). Novel gene expression patterns along the proximo-distal axis of the mouse embryo before gastrulation. BMC Dev Biol, 7:8.

- [216] Moore-Scott BA, Opoka R, Lin SCJ, Kordich JJ and Wells JM (2007). Identification of molecular markers that are expressed in discrete anterior-posterior domains of the endoderm from the gastrula stage to mid-gestation. *Dev Dyn*, 236:1997–2003.
- [217] Depreter MGL, Blair NF, Gaskell TL, Nowell CS, Davern K, Pagliocca A, Stenhouse FH, Farley AM, Fraser A, Vrana J, Robertson K, Morahan G, Tomlinson SR and Blackburn CC (2008). Identification of Plet-1 as a specific marker of early thymic epithelial progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:961–966.
- [218] Sakai K, Kimata K, Sato T, Gotoh M, Narimatsu H, Shinomiya K and Watanabe H (2007). Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 plays a critical role in chondroitin sulfate synthesis in cartilage. J Biol Chem, 282:4152–4161.
- [219] Yada T, Sato T, Kaseyama H, Gotoh M, Iwasaki H, Kikuchi N, Kwon YD, Togayachi A, Kudo T, Watanabe H, Narimatsu H and Kimata K (2003). Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem*, 278:39711–39725.
- [220] Beck F, Erler T, Russell A and James R (1995). Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev Dyn*, 204:219–227.
- [221] Chawengsaksophak K, de Graaff W, Rossant J, Deschamps J and Beck F (2004). Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. Proc Natl Acad Sci U S A, 101:7641–7645.
- [222] Suh E, Chen L, Taylor J and Traber PG (1994). A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol*, 14:7340–7351.
- [223] Diaferia G, Cattaneo M, Saltini G, Proverbio MC, Monferini E, Malferrari G, Albertini A and Biunno I (2004). RNA-mediated interference indicates that SEL1L plays a role in pancreatic beta-cell growth. DNA Cell Biol, 23:510–518.
- [224] Granelli P, Cattaneo M, Ferrero S, Bottiglieri L, Bosari S, Fichera G and Biunno I (2004). SEL1L and squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res*, 10:5857–5861.
- [225] Cattaneo M, Fontanella E, Canton C, Delia D and Biunno I (2005). SEL1L affects human pancreatic cancer cell cycle and invasiveness through modulation of PTEN and genes related to cell-matrix interactions. *Neoplasia*, 7:1030–1038.
- [226] Ferrero S, Falleni M, Cattaneo M, Malferrari G, Canton C, Biagiotti L, Maggioni M, Nosotti M, Coggi G, Bosari S and Biunno I (2006). SEL1L expression in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol*, 37:505–512.
- [227] Mueller B, Klemm EJ, Spooner E, Claessen JH and Ploegh HL (2008). SEL1L nucleates a protein complex required for dislocation of misfolded glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:12325–12330.
- [228] Cormier JH, Tamura T, Sunryd JC and Hebert DN (2009). EDEM1 recognition and delivery of misfolded proteins to the SEL1L-containing ERAD complex. *Mol Cell*, 34:627–633.
- [229] Jacobsson JA, Haitina T, Lindblom J and Fredriksson R (2007). Identification of six putative human transporters with structural similarity to the drug transporter SLC22 family. *Genomics*, 90:595–609.
- [230] Koepsell H and Endou H (2004). The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch*, 447:666–676.
- [231] Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S and Tsujimoto G (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*, 11:90–94.

- [232] Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. Nature, 445:168–176.
- [233] Imuta Y, Nishioka N, Kiyonari H and Sasaki H (2009). Short limbs, cleft palate, and delayed formation of flat proliferative chondrocytes in mice with targeted disruption of a putative protein kinase gene, Pkdcc (AW548124). *Dev Dyn*, 238:210–222.
- [234] Takagi T, Moribe H, Kondoh H and Higashi Y (1998). DeltaEF1, a zinc finger and homeodomain transcription factor, is required for skeleton patterning in multiple lineages. *Development*, 125:21–31.
- [235] Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP and Jones S (1999). A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development*, 126:1211–1223.
- [236] DeChiara TM, Kimble RB, Poueymirou WT, Rojas J, Masiakowski P, Valenzuela DM and Yancopoulos GD (2000). Ror2, encoding a receptor-like tyrosine kinase, is required for cartilage and growth plate development. *Nat Genet*, 24:271–274.
- [237] Schwabe GC, Trepczik B, Süring K, Brieske N, Tucker AS, Sharpe PT, Minami Y and Mundlos S (2004). Ror2 knockout mouse as a model for the developmental pathology of autosomal recessive Robinow syndrome. *Dev Dyn*, 229:400–410.
- [238] Mo R, Freer AM, Zinyk DL, Crackower MA, Michaud J, Heng HH, Chik KW, Shi XM, Tsui LC, Cheng SH, Joyner AL and Hui C (1997). Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development*, 124:113–123.
- [239] Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC, Mundlos S, Shibuya H, Takada S and Minami Y (2003). The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells*, 8:645– 654.
- [240] Qian D, Jones C, Rzadzinska A, Mark S, Zhang X, Steel KP, Dai X and Chen P (2007). Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev Biol*, 306:121–133.
- [241] Nomachi A, Nishita M, Inaba D, Enomoto M, Hamasaki M and Minami Y (2008). Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun Nterminal kinase via actin-binding protein filamin A. J Biol Chem, 283:27973–27981.
- [242] Lipinski RJ, Gipp JJ, Zhang J, Doles JD and Bushman W (2006). Unique and complimentary activities of the Gli transcription factors in Hedgehog signaling. *Exp Cell Res*, 312:1925–1938.
- [243] Riobo NA and Manning DR (2007). Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem J*, 403:369–379.
- [244] Ezzell RM, Chafel MM and Matsudaira PT (1989). Differential localization of villin and fimbrin during development of the mouse visceral endoderm and intestinal epithelium. *Development*, 106:407–419.
- [245] Parkin CA and Ingham PW (2008). The adventures of Sonic Hedgehog in development and repair. I. Hedgehog signaling in gastrointestinal development and disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 294:G363–G367.
- [246] Madison BB, McKenna LB, Dolson D, Epstein DJ and Kaestner KH (2009). FoxF1 and FoxL1 link hedgehog signaling and the control of epithelial proliferation in the developing stomach and intestine. J Biol Chem, 284:5936–5944.
- [247] Shimoyama Y, Takeda H, Yoshihara S, Kitajima M and Hirohashi S (1999). Biochemical characterization and functional analysis of two type II classic cadherins, cadherin-6 and -14, and comparison with E-cadherin. *J Biol Chem*, 274:11987–11994.
- [248] Shimoyama Y, Tsujimoto G, Kitajima M and Natori M (2000). Identification of three human type-II classic cadherins and frequent heterophilic interactions between different subclasses of type-II classic cadherins. *Biochem J*, 349:159–167.
- [249] Inoue T, Chisaka O, Matsunami H and Takeichi M (1997). Cadherin-6 expression transiently delineates specific rhombomeres, other neural tube subdivisions, and neural crest subpopulations in mouse embryos. *Dev Biol*, 183:183–194.
- [250] Mah SP, Saueressig H, Goulding M, Kintner C and Dressler GR (2000). Kidney development in cadherin-6 mutants: delayed mesenchyme-to-epithelial conversion and loss of nephrons. *Dev Biol*, 223:38–53.
- [251] Inoue T, Inoue YU, Asami J, Izumi H, Nakamura S and Krumlauf R (2008). Analysis of mouse Cdh6 gene regulation by transgenesis of modified bacterial artificial chromosomes. *Dev Biol*, 315:506–520.
- [252] Lamb JR, Tugendreich S and Hieter P (1995). Tetratrico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci*, 20:257–259.
- [253] Das AK, Cohen PW and Barford D (1998). The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J*, 17:1192–1199.
- [254] Muresan Z, Paul DL and Goodenough DA (2000). Occludin 1B, a variant of the tight junction protein occludin. *Mol Biol Cell*, 11:627–634.
- [255] Mankertz J, Waller JS, Hillenbrand B, Tavalali S, Florian P, Schöneberg T, Fromm M and Schulzke JD (2002). Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage. *Biochem Biophys Res Commun*, 298:657–666.
- [256] Gu JM, Lim SO, Park YM and Jung G (2008). A novel splice variant of occludin deleted in exon 9 and its role in cell apoptosis and invasion. *FEBS J*, 275:3145–3156.
- [257] Lal-Nag M and Morin PJ (2009). The claudins. Genome Biol, 10:235.
- [258] Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Inazawa J, Fujimoto K and Tsukita S (1997). Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *Eur J Cell Biol*, 73:222–231.
- [259] Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T and Tsukita S (1998). Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol*, 141:397–408.
- [260] Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, Saitou M, Tsukita S and Fromm M (2005). Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta*, 1669:34–42.
- [261] Soyer J, Flasse L, Raffelsberger W, Beucher A, Orvain C, Peers B, Ravassard P, Vermot J, Voz ML, Mellitzer G and Gradwohl G (2010). Rfx6 is an Ngn3-dependent winged helix transcription factor required for pancreatic islet cell development. *Development*, 137:203–212.
- [262] Smith SB, Qu HQ, Taleb N et al. (2010). Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans. Nature, 463:775–780.
- [263] Aftab S, Semenec L, Chu JSC and Chen N (2008). Identification and characterization of novel human tissue-specific RFX transcription factors. BMC Evol Biol, 8:226.

- [264] Jensen J, Heller RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EE, Lindsell C, Weinmaster G, Madsen OD and Serup P (2000). Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes*, 49:163–176.
- [265] Schwitzgebel VM, Scheel DW, Conners JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD and German MS (2000). Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development*, 127:3533–3542.
- [266] Gu G, Dubauskaite J and Melton DA (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*, 129:2447–2457.

Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle bei meinem Betreuer Dr. H. Himmelbauer für die Gewährung des großen Freiraumes während der Erstellung dieser Dissertation bedanken. Weiterhin freute mich sein Vertrauen mir weitere Projekte zu übertragen, durch die ich weitere Einblicke in interessante Themengebiete gewinnen konnte.

Großer Dank geht an Prof. H. Lehrach für einige kreative Impulse und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung.

Prof. R. Mutzel möchte ich für die Betreuung dieser Dissertation seitens der Freien Universität Berlin und für das Verfassen des Gutachtens danken.

Ich danke auch den wissenschaftlichen Partnern des FunGenES Konsortiums, hier insbesondere Prof. F. Stewart und Dr. Y. Zhang für die Möglichkeit, RedET-Rekombination aus erster Hand zu erlernen, Prof. A. Sachinidis und Dr. M. X. Doss für hilfreiche Zellkultur-Tipps sowie Prof. A.M. Wobus für Ihr Interesse und Ihre Diskussionsbereitschaft. Nicht zuletzt geht ein Dankeschön an die Arbeitsgruppe von Prof. N. Hübner für den Aufbau des AffymetrixGeneChip Services.

Den "Hermännern" namentlich Philip, Lars, Gaby, Ralf und den "Sultan Mädels" danke ich für Bereitschaft mir die Kniffe der *in situ* Hybridisierung zu zeigen.

Meinen Kollegen der Arbeitsgruppe "Comparative Genomics" möchte ich für die nette Atmosphäre im Labor und das stets offene Ohr danken. Insbesondere möchte ich Stefanie danken, die mich vom Alp des radioaktiven Arbeitens befreit hat. Ruben und Florian danke ich für das gelegentliche Füttern der ES Zellen am Wochenende und an manchen Urlaubstagen.

Robert, Hans-Jörg und Arnold: Vielen Dank für manche interessante Diskussion, Eure Hilfe und gute Ideen. Ulrike und Jürgen, großen Dank für Eure Mühe beim Korrekturlesen der Arbeit. Schließlich darf natürlich Conny nicht vergessen werden: Danke, daß Du auch bis zuletzt ausgeharrt hast, war eine nette Zeit mit Dir im Labor.

Weiterhin gilt mein Dank vielen Freunden, die mich auf dem Weg zur Weisheit begleitet haben. Insbesondere möchte ich mich bei Sascha bedanken, der in der Endphase dieser Arbeit den Kontakt nie hat schleifen lassen.

Meinen Eltern und Geschwistern gilt ein herzliches Dankeschön für Ihre anhaltende Unterstützung während meines Studiums und der Promotion. Liebe Nina, bei Dir möchte ich mich für die große Unterstützung und für Deine Geduld, die Du in der Endphase dieser Arbeit aufgebracht hast, besonders bedanken.

Danke an Alle, die ich hier nun vergessen habe und die es mir trotzdem nicht übel nehmen. So, das war's!