

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von:

Diplom-Biologin Susanne Bleckmann

aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung:

Untersuchungen zur Funktion von cAMP Response Element Binding Protein (CREB) und Activating Transcription Factor 1 (ATF1) während der Embryonalentwicklung der Maus

Gutachter:

Prof. Dr. Günther Schütz

Prof. Dr. Werner Müller

für meine Eltern

Die vorliegende Dissertation wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ) in der Zeit von Januar 1995 - Januar 1999 unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Günther Schütz durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	2
1.1 Die Familie der Leuzinzipperproteine	2
1.2 Die Unterfamilie der CREB/ATF-Proteine	3
1.2.1 Proteinstruktur der CREB/ATF-Familie	4
1.3 Alternative Signaltransduktionskaskaden zu PKA	7
1.3.1 Kalziumabhängige Kinasen	7
1.3.2 Wachstumsfaktorabhängige Kinasen	8
1.4 Dephosphorylierung von CREB	8
1.5 Integration verschiedener Signaltransduktionswege durch CBP	9
1.6 Die Rolle von CREB/ATF-Proteinen in verschiedenen physiologischen Prozessen	10
1.6.1 Expression von CREB und ATF1 und CREM	11
1.6.2 Dominant-negative Mutationen von CREB und ATF1	12
1.6.3 Ausschaltung einzelner Gene der CREB/ATF-Familie durch homologe Rekombination	14
1.7 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation	16
2. Ergebnisse	17
2.1 Expressionsmuster von CREB, CREM und ATF1	17
2.1.1 Expression von CREB, CREM und ATF1 während der Hodenentwicklung	17
2.1.2 Expression von CREB, CREM und ATF1 während der Ovarienentwicklung	20
2.1.3 Expression von CREB, CREM und ATF1 während der frühen Embryonalentwicklung	22
2.2 Erzeugung von Mäusen ohne funktionelles CREB und ATF1	26
2.2.1 Phänotyp von Embryonen des Genotyps ATF1 ^{-/-} CREB ^{-/-} am Tag E 3,5 p.c.	28
2.3 Embryonen ohne funktionelles CREB und heterozygot für ATF1	31
2.3.1 Phänotyp von Embryonen des Genotyps ATF1 ^{+/-} CREB ^{-/-} am Tag E 9,5 p.c.	31

2.3.2	Phänotyp von Embryonen des Genotyps ATF1+/- CREB-/- am Tag E 7,5 p.c.	37
2.3.3	Phänotyp von Embryonen des Genotyps ATF1+/- CREB-/- am Tag E 6,5 p.c.	50
3. Diskussion		55
3.1	Bedeutung von CREB, ATF1 und CREM in der Keimzellentwicklung	55
3.2	ATF1/CREB-Heterodimere und CREM spielen keine wesentliche Rolle in der frühen Embryonalentwicklung	57
3.3	Kompensatorische Effekte von CREB und ATF1	58
3.4	Gestörte Proliferation in Mutanten des Genotyps ATF1+/- CREB-/-	59
3.5	CREB und ATF1 als Regulatoren des Zellzyklus	61
3.6	Embryonen des Genotyps ATF1+/- CREB-/- weisen einen Defekt während der Gastrulation auf	62
3.7	Ausblick	65
4. Material		66
4.1	Enzyme, Chemikalien und anderes Material	66
4.2	Puffer und Lösungen	67
4.2.1	Lösungen und Medien für die Kulturen von Bakterien	67
4.2.2	Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung und Aufbewahrung	68
4.2.3	Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese	68
4.2.4	Puffer und Lösungen für die <i>in situ</i> Hybridisierung	68
4.3	Biologisches Material	69
4.3.1	verwendeter Bakterienstamm	69
4.3.2	Vektoren	69
4.3.3	sonstige Nukleinsäuren	69
4.3.4	Enzymlösungen	69
5. Methoden		70
5.1	Allgemeine Methoden	70
5.1.1	Methoden zur Aufreinigung von DNA-Molekülen	70
5.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	70
5.1.3	Gelelektrophorese	71
5.1.4	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	71
5.2	Klonieren von DNA	72

5.2.1	Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen/Quiaex Gelextraktion der Firma Diagen	72
5.2.2	Dephosphorylierung linearisierter Vektoren und Phosphorylierung des Inserts	72
5.2.3	Ligation	73
5.2.4	Kompetente Zellen für die Elektroporation	73
5.2.5	Transformation von <i>E.coli</i> mittels Elektroporation	74
5.3	Präparation von Plasmid-DNA	75
5.3.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	75
5.3.2	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	75
5.4	Genotypisierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	76
5.4.1	Genotypisierung von Paraffinschnitten mittels PCR	78
5.5	Anfertigen von Gewebeschnitten	78
5.5.1	Gefrierschnitte	78
5.5.2	Paraffinschnitte	79
5.6	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	79
5.7	Antikörperaufreinigung von ATF1-Antiserum	79
5.8	Immunohistochemische Färbungen	80
5.8.1	an Paraffinschnitten	80
5.8.2	an Gefrierschnitten	81
5.9	Blastozysten-Entnahme	82
5.10	„whole-mount“-LacZ-Färbung	82
5.11	<i>in vitro</i> -Kultur von Blastozysten („outgrowth“-Experiment)	83
5.12	4',6'-Diamino-2-phenylindol (DAPI)-Färbung von Blastozysten	83
5.13	TUNEL-Färbung	84
5.14	Bromodeoxyuridin (BrdU)-Färbung	85
5.15	<i>in situ</i> Hybridisierung	86
5.15.1	Isolierung der Embryonen	86
5.15.2	Einbetten der Embryonen	86
5.15.3	TESPA-Behandlung der Objektträger	86
5.15.4	Anfertigen der Paraffinschnitte	87
5.15.5	Radioaktive Markierung der Sonde (Riboprobe)	87
5.15.6	Prehybridisierung	88
5.15.7	Hybridisierung	89
5.15.8	Posthybridisierung	90
5.15.9	Autoradiographie und Auftragen der Filmemulsion	91
5.15.10	Entwickeln der Objektträger	91

6. Literaturverzeichnis	92
7. Abkürzungen und Symbole	107
8. Danksagung	109
9. Erklärung	110

Zusammenfassung

Die Transkriptionsfaktoren cAMP Response Element Binding Protein (CREB), cAMP Response Modulatory Protein (CREM) und Activating Transcription Factor 1 (ATF1) werden innerhalb der Leucizipperproteine in der CREB/ATF-Unterfamilie zusammengefaßt. Verschiedene Hormone, Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter vermitteln über sekundäre Botenstoffe wie beispielsweise cAMP und Ca^{2+} eine Aktivierung der CREB/ATF-Proteine. Diese Aktivierung erfolgt mittels Phosphorylierung durch unterschiedliche Kinasen wie Proteinkinase A, Calmodulin-dependent Kinase II und IV oder auch ras-abhängigen Kinasen. Anschließend binden die CREB/ATF-Transkriptionsfaktoren als Dimere an das cAMP Response Element (CRE) in den regulatorischen Regionen zahlreicher Gene. Durch Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie über das CREB Binding Protein (CBP) und die daraus resultierende transkriptionelle Aktivierung der Zielgene, greifen CREB/ATF-Proteine in viele physiologischen Prozesse ein.

Mäuse, die kein funktionelles CREB-Protein bilden können, werden nicht mit erwarteter Mendelscher Häufigkeit geboren, weisen ein deutlich vermindertes Geburtsgewicht auf und sterben kurz nach der Geburt an einer Atelektase der Lunge. Zusätzlich zeigen sie einen Defekt in der T-Zellentwicklung und eine Reduktion bestimmter Hirnstrukturen. Kann dagegen in Mäusen kein funktionelles ATF1-Protein, gebildet werden, so erscheinen die Tiere gesund, sowohl Männchen als auch Weibchen sind fertil und zeigen auch keine histologischen Veränderungen.

Um gegenseitige kompensatorische Effekte des jeweils anderen Proteins auszuschließen, wurden Doppelverpaarungen von Mäusen des Genotyps ATF1^{+/-} CREB^{+/-} vorgenommen. Die daraus resultierenden Tiere ohne funktionelles ATF1- und CREB-Protein sterben noch vor der Implantation in den Uterus. Im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen gleichen Alters weisen die Doppelmutanten eine verminderte Zellzahl auf und sind in ihrer Entwicklung zurückgeblieben. Embryonen des Genotyps ATF1^{+/-} CREB^{-/-} können in den Uterus implantieren, sterben aber kurze Zeit später vermutlich an mangelnder Nährstoffversorgung. Die Gastrulation dieser mutierten Embryonen ist aufgrund einer verringerten Proliferation des primitiven Ektoderms gestört. Es werden vorwiegend anteriore, embryonale Strukturen gebildet. Die primitiven Ektodermzellen differenzieren verfrüht, anstatt in eine weitere Zellteilungsrunde einzutreten. Aufgrund einer geringen Anzahl an Epiblastzellen können somit keine posterioren Strukturen mehr geformt werden können. Die für die Nährstoffzufuhr wichtigen extraembryonalen Bestandteile des Embryos wie Amnion, Allantois und Chorion fehlen.

CREB und ATF1 sind somit in wichtige proliferative Prozesse der Embryonalentwicklung involviert. Sowohl CREB als auch ATF1 können das Fehlen der Funktion des anderen während der frühen Embryonalentwicklung kompensieren. Allerdings ist Kompensation durch ATF1 dosisabhängig. Eine funktionelle Bedeutung von CREM während der frühen Embryonalentwicklung konnte nicht festgestellt werden.

1. Einleitung

Zellproliferation und Zelldifferenzierung sind Elementarprozesse, um aus totipotenten Stammzellen verschiedene, spezialisierte Zelltypen mit spezifischen Funktionen zu bilden. Diese Zelldiversität entsteht während der Entwicklung der Säuger durch differenzierte Expression zellspezifischer Gene (Johnson und McKnight).

Extrazelluläre Signale können über verschiedene Signaltransduktionskaskaden die Expression zahlreicher Gene regulieren und kontrollieren. Am Ende dieser Kaskaden stehen meist Transkriptionsfaktoren, die durch chemische Modifikationen aktiviert werden und die Signale über Protein/DNA-Interaktionen weiterleiten können. Diese transkriptionsregulierenden Faktoren kontrollieren selektiv die spezifische Expression ihrer Zielgene, indem sie an verschiedene regulatorische Elemente dieser Gene binden.

Die Isolierung und Analyse DNA-bindender Proteine, die für Zelltyp-spezifische Genexpression verantwortlich sind, haben wichtige Einsichten in molekulare Mechanismen der Regulation von Proliferation und Differenzierung geliefert.

1.1 Die Familie der Leucinzipperproteine

Als Leucinzipperproteine bezeichnet man DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, die als gemeinsames Strukturelement einen Leucinzipper enthalten. Diese Region bildet eine amphipathische Helix aus, bei der an jeder siebten Aminosäureposition beziehungsweise an jedem zweiten loop der Helix die Aminosäure Leucin sitzt. Die Leucinreste können mit Leucinen anderer oder gleicher Leucinzipperproteine interagieren und bilden somit eine stereospezifische Dimerisierungsdomäne (Landschulz et al., Agre et al.). Diese Transkriptionsfaktoren binden durch eine alpha-helikale Region von basischen Aminosäuren, die unmittelbar vor der Leucinzipperdomäne lokalisiert ist, als Homo- oder Heterodimere an eine spezifische palindromische DNA-Sequenz. Die basische DNA-Bindungsdomäne ist die höchstkonservierte Sequenz innerhalb der Leucinzipperproteine. Die Leucinzipperdimerisierungsdomäne enthält dagegen weniger konservierte Elemente außer der offensichtlichen periodischen Verteilung der Leucinreste. Diese spezielle Klasse von Transkriptionsfaktoren wird auch als bZIP-Proteine bezeichnet.

Die ersten Proteine, bei denen ein Leucinzippermotif gefunden wurde, waren das CAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) (Landschulz et al.), der Hefetranskriptionsfaktor GCN4 (Vogt et al.), sowie die Onkogene Jun (Maki et al.) und Fos (Rauscher et al.). Seitdem wurden eine große Anzahl weiterer bZIP-Proteine aus verschiedenen eukaryotischen Organismen wie Hefe, Drosophila, Neurospora, Säugern, Vögeln und

höheren Pflanzen identifiziert und kloniert, unter anderen auch weitere Mitglieder der Fos-, Jun- und C/EBP- Proteinfamilien (Hurst et al.).

Die bZIP-Dimere binden an spezifische DNA-Erkennungssequenzen innerhalb der Promotoren- oder Enhancerregionen zu transkribierender Gene. Wie andere Transkriptionsfaktoren regulieren sie die Effizienz, mit der die RNA Polymerase II an die DNA bindet und die Transkription initiiert. Diese Proteine sind entweder konstitutive oder durch posttranslationale Modifikationen (in diesem Fall Phosphorylierung) regulierte Transkriptionsaktivatoren.

Viele Leucinzipperproteine werden zelltypspezifisch oder abhängig vom Entwicklungsstatus des Organismus exprimiert und sind in verschiedene Prozesse wie beispielsweise der Differenzierung bestimmter Gewebetypen involviert (Hsu et al.).

1.2 Die Unterfamilie der CREB/ATF-Proteine

Eine Anzahl verschiedener extrazellulärer Signale, einschließlich Hormone und Neurotransmitter, stimulieren die Transkription ihrer Zielgene über intrazelluläre Botenstoffe (second messenger), die die Phosphorylierung spezieller Transkriptionsfaktoren regulieren. Der intrazelluläre Anstieg eines dieser „second messenger“, des cyclischen Adenosin-Monophosphats (cAMP), bewirkt eine Freisetzung der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA). cAMP bindet dabei zunächst an die regulatorischen Untereinheiten des tetrameren Enzyms. Nach Translokation der katalytischen Untereinheiten in den Zellkern (Harootunian et al.), werden dort Substratproteine phosphoryliert. Das cAMP Response Element Binding Protein (CREB) wurde als einer der ersten Faktoren identifiziert, der die transkriptionelle Antwort auf einen erhöhten cAMP-Spiegel vermittelt (Gonzalez et al.). CREB ist Mitglied der Leucinzipper-Proteinfamilie und wird mit dem cAMP Response Element Modulatory Protein (CREM) und dem Activating Transcription Factor 1 (ATF1, auch TREB36 oder ATF-43) aufgrund der Sequenzhomologie zur CREB/ATF-Unterfamilie zusammengefaßt (Meyer et al, Ruppert et al., Laoide et al.). Die DNA-Bindungsdomänen von CREB, ATF1 und die DNA-Bindungsdomäne 1 von CREM sind zu 95% homolog. Alle drei Proteine besitzen bei der durch cAMP vermittelten Signaltransduktion ähnliche funktionelle Eigenschaften. Sie binden als Hetero- oder Homodimere an eine spezifische DNA-Erkennungssequenz: das cAMP Responsive Element (CRE). Diese Konsensussequenz wird durch ein unveränderliches CGTCA-Motif charakterisiert und stellt eine Hälfte der oft palindromischen CREB-Bindungsstelle dar (TGACGTCA), (Lee et al., Nichols et al., Lin et al, Yamamoto et al.). Zusätzlich zu der Konsensussequenz spielen aber auch benachbarte Basenpaarungen bei der Bindung von CREB eine Rolle (Deutsch et al.). Die CRE-Sequenz übernimmt mit der Bindung des Transkriptionsfaktors die Funktion eines Kontrollelements (Montminy et al, Lee et al.). Abhängig davon, welche zusätzlichen Basen außer der

Konsensussequenz die CRE-Stelle enthält, binden ATF1 und CREB mit verschiedener Affinität an die DNA-Bindungsstelle. Die Bindungsaffinität ist aber nicht nur von der CRE-Sequenz abhängig, sondern auch von der Anzahl der Bindungsstellen (Delegeane et al., Jameson et al.) und der Zusammensetzung der Dimere, die an die DNA binden. CREB kann sowohl mit ATF1 als auch mit CREM heterodimerisieren (Foulkes et al., Hurst et al.). Von keinem der CREB/ATF-Proteine ist bekannt, daß es Dimere mit Proteinen anderer Leucizipperfamilien ausbildet.

1.2.1 Proteinstruktur der CREB/ATF-Familie

CREB, CREM und ATF1 lassen sich in verschiedene, funktional distinkte Domänen unterteilen.

Die funktionelle Bedeutung der verschiedenen Domänen wurde durch „*in vivo* assays“ untersucht. Es wurden chimäre Proteine, in denen die DNA-Bindungsdomäne von CREB durch die des Hefe-Aktivators GAL4 ersetzt wurde, in transienten Transfektionen getestet, um die Effekte endogenen CREBs zu umgehen (Hurst et al., Lee et al., Berkowitz et al.).

Embryonale F9 Karzinom-Zellen, die nicht durch cAMP aktivierbar sind, wurden zudem mit verschiedenen CREB-Deletionsmutanten transient transfiziert (Gonzalez et al., Masson et al.).

Durch diese Experimente konnten einige funktionelle Elemente von CREB identifiziert werden, die eine direkte Rolle in transkriptioneller Aktivierung und Repression spielen.

Der für die Transaktivierung verantwortliche Bereich enthält verschiedene regulatorische Elemente. Die Phosphorylierungsstelle für PKA ist Teil einer komplexen Region, die zumindest zwei weitere funktionelle Elemente enthält. Diese ca. 50 Aminosäure große Region wird Kinase Inducible Domain (KID) (Gonzalez et al.) oder auch P-Box (Lee et al.) genannt, da sie reich an Serinresten ist und außer für PKA auch Phosphoakzeptorstellen für verschiedene andere Proteinkinasen aufweist.

Der aminoternale Bereich der KID-Domäne beinhaltet verschiedene Phosphorylierungsstellen, die durch Proteinkinase C (PKC), Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) und Casein Kinase I und II *in vivo* phosphoryliert werden können.

Vollständige Transaktivierung durch CREB erfordert außer der KID-Domäne noch zwei weitere glutaminreiche Aktivierungsdomänen, die aminoterminal (Q1) beziehungsweise carboxyterminal (Q2) von der KID-Domäne zu finden sind. Q2 ist eine konstitutive Aktivierungsdomäne, die kritisch für die von PKA abhängige Induktion ist. Eine Entfernung dieser Domäne in transienten Transfektionen führte zu einer verringerten Aktivität von durch PKA phosphoryliertem CREB (Quinn et al., Brindle et al.).

Es wird angenommen, daß die Phosphorylierung innerhalb der KID-Domäne von CREB eine Konformationsänderung verursacht, so daß die glutaminreichen Domänen mit dem basalen Transkriptionsapparat interagieren können (Meyer et al., Lee et al.). Tatsächlich

kommt es zu Wechselwirkungen zwischen der Q2-Domäne und der TFIID-Fraktion. Die TFIID-Fraktion beinhaltet zusätzlich zu dem TATA-Binding Protein (TBP) weitere an TBP assoziierte Faktoren (TAFs), die als Koaktivatoren fungieren (Hoey et al.). Sowohl biochemisch als auch genetisch wurde gezeigt, daß Q2 mit einer Komponente der TFIID-Fraktion, dem Koaktivator dTBP-Associated Factor 110 (dTAF110), interagiert (Gill et al., Ferreri et al.).

Trotz der großen Homologie zwischen CREB und ATF1 zeigen sich deutliche strukturelle und funktionale Unterschiede. Die Q1-Domäne und der als α -Peptid bezeichnete Bereich fehlen im ATF1-Protein. Stattdessen enthält das Protein eine ca. 27 Aminosäuren lange aminoterminalen Region (NTR), die sich vom Aminoterminus von CREB stark unterscheidet (Hurst et al.). In der KID-Domäne scheint die Phosphorylierung innerhalb des aminoterminalen Bereiches in CREB von der vorangegangenen Phosphorylierung durch PKA abhängig zu sein (Lee et al.), wohingegen dies in ATF1 nicht der Fall zu sein scheint (Masson et al.). Im Gegensatz zu CREB muß ATF1 als Dimer vorliegen, um phosphoryliert zu werden. Fusioniert man die DNA-Bindungsdomäne des Hefe-Aktivators GAL4 an CREB, so hängt das Transaktivierungspotential nicht vom Vorhandensein des Leucinzippers ab. Ein GAL4-ATF1-Fusionsprotein benötigt dagegen den Leucinzipper, um eine cAMP-Antwort zu vermitteln. ATF1 braucht also einen Partner, um zu transaktivieren (Hurst et al., Flint et al., Rehfuss et al.). Auch ist das Serin-129, die GSK-3 Phosphoakzeptor-Stelle, nicht in ATF1 konserviert, und somit kann davon ausgegangen werden, daß ATF1 nicht durch GSK-3 aktivierbar ist (Meyer et al., Fiol et al.). Umgekehrt fehlt CREB das in ATF1 vorkommende Serin-36, das eine wichtige Rolle bei der Modulation der DNA-Bindung spielt (Masson et al.). So unterscheiden sich ATF1 und CREB trotz ihrer großen Homologie innerhalb der KID-Domäne in ihrer Regulation durch verschiedene Phosphorylierungen.

Die carboxyterminale Region der P-Box einschließlich der PKA-Stelle (Ser-133 in CREB, entsprechend Ser-63 in ATF1) ist hochkonserviert. Die KID-Domäne fungiert als Transaktivierungsdomäne, jedoch werden durch unterschiedliche Phosphorylierungsereignisse innerhalb dieser Region jedem Protein der CREB/ATF-Familie eigene Eigenschaften zugeordnet (Lee et al.).

Die Identifizierung der genomischen Struktur und der durch verschiedene Exons kodierten funktionellen Domänen zeigte, daß verschiedene Isoformen des CREB-Proteins existieren (Ruppert et al.). Die am häufigsten vorkommende cDNA-Isoform ist CREB δ . Alle weiteren Isoformen besitzen Deletionen oder Insertionen, wobei nur die Translation von drei Isoformen zu tatsächlich funktionellem CREB-Protein führen: CREB α , CREB β und CREB δ . CREB α besitzt zwischen Q1- und KID-Domäne ein 14 Aminosäuren langes Segment, das sogenannte α -Peptid, das durch ein eigenes Exon kodiert wird. CREB β und CREB δ sind bis auf fehlende 40 Aminosäuren am Aminoterminus identisch, wodurch ca. 40% der Q1-Domäne fehlen (Blendy et al.).

Von ATF1 sind bisher keine alternativen Spleißvarianten bekannt.

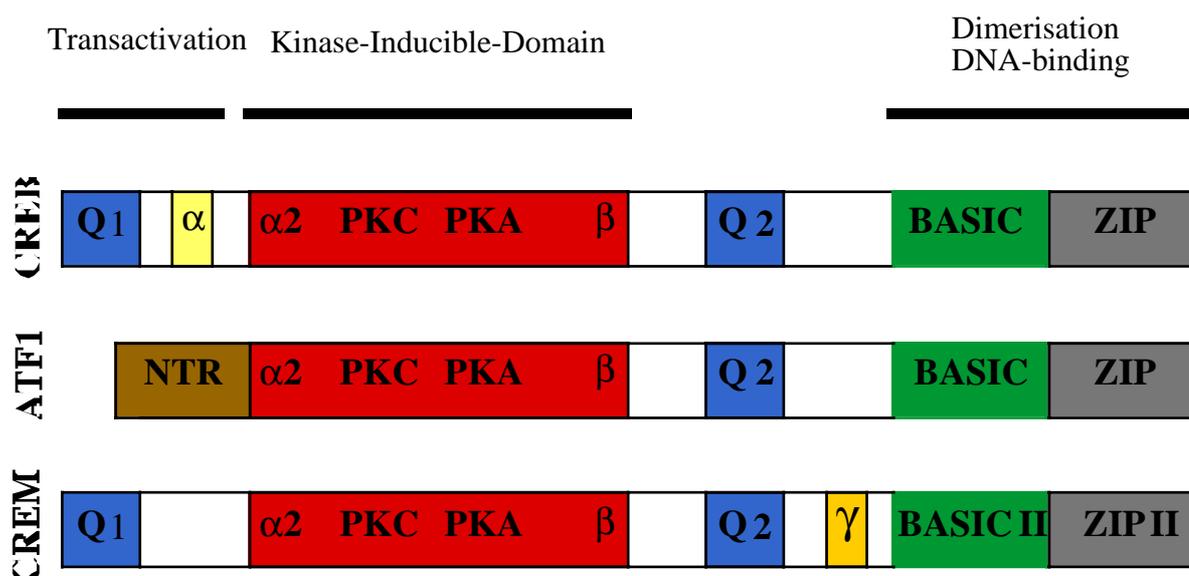


Abb. 1 Funktionelle Domänen von CREB, ATF1 und CREM.

Die basische Region und der Leucinzipper bilden die carboxyterminale Domäne, die für die DNA-Bindung und Dimerisierung zuständig ist. Mehrere Einzelelemente bilden die Kinase-Inducible Domain (KID): PKA ist die Proteinkinase K Phosphoakzeptorstelle (Serin 133 in CREB), das β -Element bildet eine β -Faltblattstruktur. $\alpha 2$ enthält eine Phosphorylierungsstelle für Proteinkinase C (PKC). Q1 und Q2 symbolisieren die glutaminreichen Domänen, die für die Transaktivierung wichtig sind.

α ist das für die CREB α Isoform spezifische α -Peptid. Die zu CREB nicht homologe aminoternale Region in ATF1 ist mit NTR benannt. Die Struktur von CREM entspricht CREM τ , dessen DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne durch bZIPII gebildet wird. γ entspricht einer zu CREB nicht homologen Domäne.

Das CREM-Gen ist wohl das komplexeste der CREB/ATF-Familie. Das auffälligste Merkmal ist, daß verschiedene Exone zwei unterschiedliche bZip-Domänen kodieren, die alternativ durch differentielles Spleißen genutzt werden. Diese Domänen sind untereinander zu 75% homolog. Von CREM existiert eine Vielfalt an Spleißvarianten. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die Isoformen der ersten Gruppen enthalten alle die P-Box und werden vom Promotor P1 aus gebildet. CREM τ , das in diese Gruppe gehört, ist CREB in Bezug auf funktionelle Regionen am ähnlichsten. Andere Isoformen werden von einem alternativen Promotor P2 gebildet. P2 liegt innerhalb eines Introns nahe des 3'-Endes des CREM-Gens und ist stark durch cAMP induzierbar. Von dort aus werden Produkte gebildet, die als Inducible cAMP Early Repressor (ICER) bezeichnet werden (Molina et al., Stehle et al.). Das offene Leseraster der ICER-Formen umfaßt 120 Aminosäuren, und sie sind somit die kleinsten Mitglieder der CREM-Proteinfamilie. Sie bestehen nur aus DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne. Die intakte DNA-Bindungsdomäne dirigiert ICER spezifisch an eine Konsensus-CRE-Bindestelle. Die Dimerisierungsdomäne ermöglicht eine Interaktion

von ICER mit CREM τ sowie auch mit anderen CREM-Proteinen und CREB. In Transfektions-Assays fungiert ICER als potenter Repressor cAMP-induzierter Transkription (Molina et al.). Das CREM-Gen kodiert also viele Isoformen, die entweder als Transkriptionsaktivatoren oder als -repressoren wirken.

1.3 Alternative Signaltransduktionskaskaden zu PKA

Verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege, die durch Hormone (Walker et al., Klemm et al.), Wachstumsfaktoren (Ginty et al., Gosh et Greenberg, Tan et al, Finkbeiner et al.), Neurotransmitter und Ca²⁺ (Sheng et al, Pende et al.) aktiviert werden, führen zu einer Aktivierung von CREB, indem ein bestimmter Serinrest phosphoryliert wird. Neben PKA geschieht dies auch durch verschiedene andere Kinasen wie zum Beispiel der Calmodulin-dependent Kinase II und IV (Sun et al, Bito et al., Finkenbeiner et al.), der Glycogen-Synthase Kinase-3 (Fiol et al.), der Ras-dependent Protein Kinase RSK2 (Xing et al.), der p70 S6 Kinase (deGroot et al.) und der MAPKAP-Kinase-2 (Tan et al.).

1.3.1 Kalziumabhängige Kinasen

Sowohl ATF1 als auch CREB können durch Ca²⁺ induzierte Transkription vermitteln (Liu et al.). Der durch Depolarisation der Membran verursachte intrazelluläre Kalziumanstieg induziert sogenannte Immediate-Early Genes (IEG). Diese benötigen für ihre Transkription keine Synthese neuer Proteine und kodieren häufig Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel c-Fos und c-Jun. Die Aktivierung von c-fos erfolgt über ein Ca²⁺-Response Element (CaRE) (Sheng et al.). Das CaRE ist identisch mit der CRE-Bindungsstelle, und sowohl das c-fos-CaRE als auch ein Konsensus-CRE vermitteln eine Aktivierung durch Ca²⁺, wenn sie in die regulatorische Region eines heterologen Gens gebracht werden (Sheng et al.).

CREB und ATF1 werden *in vitro* von den Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMK II) und IV (CaMK IV) wie durch PKA am Serin-133 und entsprechend Serin-63 phosphoryliert (Dash et al., Cruzalegui et al., Liu et al.). CaMK II phosphoryliert CREB noch an einer weiteren Stelle, dem Serin-142. In Transfektionsassays hat sich gezeigt, daß CaMK IV im Vergleich zu CaMK II ein größeres Aktivierungspotential besitzt. Die Phosphorylierung von Serin-142 inhibiert die Aktivierung von CREB durch Phosphorylierung an Serin-133. Wird Serin-142 in transienten Transfektionen durch ein Alanin ersetzt, so kann CaMK II CREB im gleichen Maße aktivieren wie CaMK IV (Sun et al.).

1.3.2 Wachstumsfaktorabhängige Kinasen

CREB scheint eine weitergefächerte Funktion in der Vermittlung von Wachstumsfaktorsignalen zu haben, als ursprünglich angenommen. Je nach Art der Stimulation ist die Aktivierung der Transkription von verschiedenen Mechanismen abhängig. So wird CREB in PC12-Phäochromocytoma-Zellen nach Stimulation mit Nerve Growth Factor (NGF) über eine Ras-abgängige Proteinkinase am Serin-133 phosphoryliert. Diese durch NGF induzierbare Kinase gehört zur Familie der pp90rsk Kinasen und heißt RSK2 (Ginty et al., Xing et al.). RSK2 spielt auch bei der Aktivierung von CREB nach T-Zell-Stimulation eine wichtige Rolle (Muthusamy et Leiden). Eine andere durch den Fibroblast Growth Factor (FGF) und Stress aktivierte Signalkaskade wurde in SK-N-MC-Neuroblastoma-Zellen gefunden. Serin-133 in CREB und respektive Serin-63 in ATF1 werden durch die MAP Kinase-Activated Protein (MAPKAP) Kinase-2 phosphoryliert. Die MAPKAP Kinase-2 wiederum wird durch die p38 Mitogen Activated Protein (MAP)-Kinase oder auch Reactivating Kinase (RK) aktiviert. Durch welche Proteinkinase die p38 MAP-Kinase reguliert wird, ist bislang unklar (Tan et al.).

Wachstumsfaktoren und Stress können auch über andere Wege eine Aktivierung von CREB bewirken. In 293-Zellen aktivieren Wachstumsfaktoren beziehungsweise Phorbol ester die Mitogen-Activated Protein (MAPK)-Kaskade. Stressfaktoren wie UV-Strahlung, oxidativer oder chemischer Stress induzieren in dieser Zelllinie die Stress-Activated Protein Kinase (SAPK/p38)-Kaskade. Beide Kaskaden aktivieren die Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase 1 (MSK1), die dann CREB und ATF1 phosphoryliert. Faktoren wie der Tumor Nekrosis Faktor (TNF), der Nerve Growth Factor (NGF) und der Fibroblast Growth Factor (FGF) können CREB und ATF1 in HeLa-, PC12- und SK-N-MC-Zellen sowohl über die MAPK/ERK wie auch über die SAPK2/p38 Kaskade aktivieren (Deak et al.).

Signale anderer Faktoren (Epidermal Growth Factor (EGF), Interleukin-1 α (IL-1 α) oder Serum) aktivieren CREB über eine Phosphorylierung am Serin-133 in neuronalen und auch nichtneuronalen Zellen (Jordanov et al.). CREB scheint somit in eine Vielzahl von Wachstums- und Differenzierungsvorgängen in verschiedenen Zelltypen involviert zu sein.

1.4 Dephosphorylierung von CREB

Die Phosphorylierung von CREB und die Transkription seiner Zielgene läßt trotz fortwährender Präsenz von cAMP-Agonisten mit der Zeit (4-6 Stunden) nach. Dies kann jedoch in NIH-3T3-Fibroblasten durch Gabe von Okadaic Acid (OA), eines PP1-Phosphataseinhibitors, oder Überexpression von Inhibitor 1-Protein, einem spezifischen Inhibitor der Serin/Threonin Phosphatase PP-1, verhindert werden (Hagiwara et al.). Die Phosphatase PP-1 wird im Nukleus durch ihren nukleären Inhibitor (NIPP-1) an Chromatin

gebunden (vanEynde et al.). Die Phosphorylierung von NIPP-1 durch PKA bewirkt eine verringerte Affinität zu PP-1, das dadurch freigesetzt und CREB inaktivieren kann.

In Leberzellen wurden als Regulator der Dephosphorylierung von CREB die Phosphatase PP-2a identifiziert (Wadzinski et al.). Die Serin/Threonin-Phosphatase-Aktivitäten scheinen in unterschiedlichen Zelltypen verschieden reguliert zu werden.

1.5 Integration verschiedener Signaltransduktionswege durch CBP

Transkriptionsfaktoren wie die CREB/ATF-Proteine interagieren mit Proteinen des Transkriptions-Initiations-Komplexes, um Effekte auf die Transkription zu vermitteln. Phosphorylierungsbedingte Konformationsänderungen machen die Q2-Domäne für dTAF 110 zugänglich (Ferrerri et al.). Da KID- und Q2-Domänen als unabhängige Elemente fungieren können, die jedoch einen synergistischen Effekt nach Phosphorylierung zeigen, liegt die Vermutung nahe, daß auch die aktivierte KID-Domäne mit bestimmten Komponenten des Transkriptionsapparates assoziieren kann (Quinn, Brindle et al.). Als Bindungspartner wurde das 265 kDa große phospho-CREB Binding Protein (CBP) identifiziert. CBP ist eng mit dem E1A-bindenden Faktor p300 verwandt (Eckner et al.), und beide scheinen identische Funktionen auszuüben. Peptidmotive wie eine Bromodomäne, eine KIX-Domäne und Cystidin/Histidin-reiche Regionen (C/H-Domänen) sind in CBP/p300 Proteinen von Drosophila bis zu Säugern konserviert (Arany et al.; Eckner et al.; Parker et al.; Akimaru et al.).

Die funktionelle Bedeutung von CBP für die transkriptionellen Kontrolle durch cAMP induzierbarer Gene wurde in zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen gezeigt. Zum einen durch einen Zusatz von CBP-Antiserum in Mikroinjektionsassays, wodurch die Induktion eines CRE-Reporterplasmids blockiert wurde (Arias et al.). Zum anderen konnte eine Überexpression von CBP in transienten Transfektionen die Aktivität von CREB je nach Phosphorylierungsgrad verstärken (Arias et al., Kwok et al.).

CBP bindet spezifisch an den Bereich der KID-Domäne nahe Serin-133. Die Komplexbildung verhindert *in vitro* eine Dephosphorylierung des Serins durch PP-1 und PP-2a (Parker et al.).

Es hat sich gezeigt, daß CBP über Protein/Protein-Interaktionen auf die Promotoren vieler Zielgene wirkt (Kwok et al., Lundblad et al.). In Immunneutralisationsexperimenten mit CBP-Antiserum wurde nicht nur die Aktivität des CRE-Reporters, sondern auch Reporter mit Phorbolster Elementen (TRE) oder Serum Response Elementen (SRE) inhibiert. CBP stellt demnach einen multifunktionalen Kofaktor dar (Arias et al.). CBP/p300 interagieren außer mit CREB auch unter anderem mit c-Fos (Bannister et al.), c-Jun, c-Myb, Sap-1a/Elk-1, Tax, Stat2, E1A, pp90^{rsk}, Steroidhormonrezeptoren sowie mit dem Steroidhormonrezeptor-Koaktivatoren (p160/SRC-1) (Janknecht et al.). Verschiedene Signaltransduktionswege

konvergieren somit durch Interaktion unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren mit CBP/p300 auf einer Plattform.

Eine der C/H-Domänen von CBP interagiert mit RNA Helikase A, die wiederum RNA Polymerase II bindet (Nakajima et al., Kee et al.). Die Interaktion von CREB mit CBP und dem Holo-PolIII-Komplex ist jedoch nicht ausreichend für die transkriptionelle Induktion durch cAMP (Brindle et al.). Die Notwendigkeit der Anlagerung von TFIID mittels der Q2-Domäne bedeutet entweder, daß TFIID im CBP-PolIII-Komplex fehlt, oder daß eine stabile Komplexbildung verschiedene Kontakte mit unterschiedlichen Faktoren innerhalb dieses Komplexes benötigt (Montminy et al.).

Zusätzlich zu der Eigenschaft RNA Polymerase II zu binden, besitzt CBP eine potente Histon-Acetyltransferase (HAT)-Aktivität (Bannister und Kouzarides; Ogryzko et al.). Da die Acetylierung von Histonen in transkriptionell aktivem Chromatin erhöht ist, vereinfacht CBP möglicherweise die Transkription durch direkte Modifikation der Chromatinstruktur (Grunstein; Wade et al.).

1.6 Die Rolle von CREB/ATF-Proteinen in verschiedenen physiologischen Prozessen

Die CREB/ATF-Familie sind hochkonservierte Proteine, die in Nagern, im Menschen, Drosophila, Aplysia (Bartsch et al.) und Hydra (Galliot et al.) vorkommen. Die verschiedenen Transkriptionsfaktoren werden mit einer Reihe von unterschiedlichen physiologischen Prozessen während der Embryonalentwicklung und in der adulten Physiologie in Zusammenhang gebracht. CREB/ATF-Proteine sollen unter anderem in die Rezeptor-vermittelte Induktion des c-Fos-Gens involviert sein (Peunova et Enlikolopov, Ginty et al.). Auch werden die Fertilität männlicher Mäuse (Blendy et al., Nantel et al.), die Regulation von Peptidhormonen (Montminy et al.) und die transkriptionelle Antwort auf circadiane Rhythmen (Ginty et al., Stehle et al., Foulkes et al.) von CREM, CREB und ATF1 gesteuert. CREB im speziellen wird mit der Regulation der Gluconeogenese (Boshart et al.), der Erregungsleitung in Neuronen beziehungsweise der Konsolidierung des Langzeit-gedächtnisses (Boutchuladze et al.) sowie der durch NGF vermittelten Effekte in Verbindung gebracht.

Die Funktion von ATF1 ist weitgehend unbekannt. Im Menschen gibt es eine seltene Tumorform, bei der ATF1 eine Rolle spielt. Es handelt sich dabei um das sogenannte Malignant Melanoma of soft Parts (MMSP) oder auch Soft Tissue Clear Cell Sarcoma, das wahrscheinlich neuroektodermalen Ursprungs ist. Dieser sehr aggressive Tumor entwickelt sich hauptsächlich in Sehnen von Patienten im Alter von 15 bis 35 Jahren (Chung et al, Epstein et al.). Eine Genfusion zwischen dem Ewing Sarcoma-Onkogen (EWS) und dem ATF1-Gen, die durch eine chromosomale Translokation (t(12;22)) hervorgerufen wird,

scheint spezifisch für diesen Tumortyp zu sein. Das Ewing Sarcoma Onkogen fusioniert mit zellulären Transkriptionsfaktoren, wodurch natürlich auftretende, dominante Onkogene entstehen. Das EWS/ATF1-Fusionsprotein bildet sich aus einer Verbindung mit durchgehendem Leseraster zwischen Codon-325 der EWS-mRNA und Codon-65 der ATF1-mRNA. Dieses chimäre Protein setzt sich aus Aminoterminus des EWS-Proteins und Carboxyterminus inklusive der bZIP-Domäne des ATF1-Proteins zusammen. Durch die intakte Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdomäne bleibt die Möglichkeit bestehen, Homo- oder Heterodimere mit beispielsweise CREB zu formen. Da das Fusionsprotein jedoch keine Konsensusstelle für PKA mehr enthält, ist es nicht durch cAMP aktivierbar. Umgekehrt werden keine ATF1/EWS-Fusionsproteine in transformierten Zellen gebildet (Zucman et al.). Die Transformation von Zellen durch das EWS/ATF1-Protein entsteht wahrscheinlich durch eine veränderte transkriptionelle Regulation von Genen, die normalerweise durch ATF1 reguliert würden. In JEG3-Zellen kann das Fusionsprotein für einige Promotoren ein starker konstitutiver Aktivator sein, aber gleichzeitig andere Promotoren reprimieren (Brown et al.). Es hat sich gezeigt, daß das Fusionsprotein an CRE-Elemente binden kann und konstitutiv Transkription in Abhängigkeit der EWS-Aktivierungsdomäne aktivieren kann. Diese Transaktivierung braucht jedoch keine vorangegangene Dimerisierung mit anderen CREB/ATF-Mitgliedern (Pan et al.). In MMSP-Zellen sind alle Komponenten vorhanden, die für eine durch cAMP induzierte Transkription nötig sind. cAMP kann zwar in diesen Zellen die effiziente Phosphorylierung von CREB, nicht aber die Aktivierung der Transkription induzieren. Das deutet darauf hin, daß in MMSP-Zelllinien eine Blockade des cAMP-Signals nach der CREB-Phosphorylierung stattfindet. Die Tatsache, daß MMSP-Zellen nicht durch cAMP aktivierbar sind, scheint ein typisches Merkmal dieser Zellen zu sein (Li et Lee).

1.6.1 Expression von CREB, ATF1 und CREM

Die aus Einzelementen bestehende Genstruktur ermöglicht eine regulierte Expression von Proteinen in verschiedenen Zellen. Dementsprechend kann durch differentielles Spleißen (Foulkes et al., Ruppert et al., Yamamoto et al., Waeber et al.), alternative Translationsinitiation (Foulkes et al.), RNA-Stabilität (Foulkes et al.) und posttranslationale Modifikationen ein komplexes Expressionsmuster entstehen. Im Gegensatz zu CREM und CREB sind von ATF1 keine alternativen Spleißvarianten bekannt. Die funktionellen Isoformen von CREB (α , β und δ) scheinen in somatischen Zellen von adulten Säugern ubiquitär exprimiert zu sein, wobei CREB δ dreimal höher exprimiert wird als CREB α (Ruppert et al., Berkowitz et al.), während CREB β ungefähr 15 Prozent aller translatierten Isoformen von CREB ausmacht (Blendy et al.). Andere Isoformen von CREB, denen die DNA-Bindungsdomäne und das Kernlokalisierungssignal fehlen, werden nur in adultem Hoden hoch exprimiert (Ruppert et al., Waeber et al.). Die Funktion dieser Isoformen ist

unbekannt, da sie, nicht direkt die Transkription aktivieren können, falls nicht andere Proteine sie zu den Promotoren deligieren. Das CREB-Gen wird während der Spermatogenese in Sertoli-Zellen zyklisch exprimiert und erreicht einen Peak bei maximalen cAMP-Spiegeln, die durch das Follikel Stimulierende Hormon (FSH) induziert werden (Waeber et al.).

Das Expressionsmuster von ATF1 ist bisher nicht genauer untersucht worden. Verschiedene Phosphorylierungen innerhalb der KID-Domäne könnten zum Auftreten einzelner Varianten von ATF1 mit spezifischen Aufgaben beitragen. Diese zelltypspezifischen Phosphorylierungen wären eine Möglichkeit, die funktionelle Vielfalt der CREB/ATF-Familie zu erklären.

CREM wird in adulten Mäusen am höchsten in Hoden in den runden Spermatozyten exprimiert, die die Meiose durchlaufen haben. In vorpubertären Stadien allerdings findet sich CREM in weitaus geringeren Mengen. Somit wird die Expression von CREM in Hoden in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium reguliert (Foulkes et al.). Das von der Hypophyse ausgeschüttete Hormon FSH dirigiert diese Umstellung der Expression. Es findet aber noch eine weitere Umstellung dabei statt. So werden im vorpubertären Hoden nur Repressorformen detektiert, während man im adulten Hoden ausschließlich den Aktivator CREM τ findet. Das bedeutet, es findet auch eine funktionelle Veränderung statt (Foulkes und Sassone-Corsi). Die hormonelle Induktion von CREM τ durch FSH wirkt nicht über die Transkription, wie schon von der Struktur des P1-Promotors zu erwarten ist. Die mRNA destabilisierenden AUUUA-Elemente der 3'-untranslatierten Region werden durch alternative Polyadenylierung ausgeschlossen, wodurch die Stabilität des CREM-Transkripts dramatisch erhöht wird (Foulkes et al.).

1.6.2 Dominant-negative Mutationen von CREB und ATF1

Experimente mit dominant-negativen Formen von CREB oder ATF1 können interessante Einblicke in die physiologische Bedeutung der CREB/ATF1-Transkriptionsfaktoren bringen, da die mutierten Proteine sowohl mit ihrem Wildtyp-Gegenpart als auch mit anderen Mitgliedern der Familie dimerisieren können. Die Überexpression von transdominant-negativen Formen verändert die von CREB und ATF1 abhängige Transkription insofern, als sich die Zusammensetzung und Anzahl der CREB/ATF1-Hetero- und Homodimere ändert.

Bisher existieren mehrere transgene Mausmodelle, die unter verschiedenen Promotoren eine nicht phosphorylierbare Form des CREB-Proteins exprimieren. So wurde ein transkriptionell inaktives CREB (CREBM1) im Schilddrüsenvorderlappen unter der Kontrolle des Wachstumshormonpromotors exprimiert (Struthers et al.). Da cAMP in somatischen Zellen des Schilddrüsenvorderlappens als mitogenes Signal fungiert, wurde erwartet, daß sich proliferative Defekte einstellen. Der Phenotyp der CREBM1 transgenen Mäuse zeigt

Kleinwuchs mit verkümmelter Schilddrüse, die ein deutliches Defizit an somatotrophen Zellen aufweist (Struthers et al.). Dagegen reicht chronische Überstimulation des somatotrophen cAMP-Signalweges aus, um eine Hyperplasie dieser Zellen hervorzurufen (Kvist et al., Saper et al.). Obwohl die genauen Zielgene der CREB/ATF-Familie nicht bekannt sind, wären als mögliche Kandidaten c-fos und GHF1/pit-1 denkbar. Beide sind für cAMP sensitiv, in die Proliferationsregulation involviert und werden spezifisch in der Schilddrüse exprimiert (Chen et al., Carreno et al., Townsend et al.).

Proliferative Defekte konnten auch in transgenen Mäusen festgestellt werden, in denen nicht phosphorylierbares CREB unter der Kontrolle des T-Zell-spezifischen CD2-Promotors und Enhancers exprimiert wurde. Die Thymozyten und T-Zellen dieser Tiere zeigen eine stark verringerte Interleukin-2 (IL-2)-Produktion, einen Zellzyklusstop in der G1-Phase und nachfolgend auftretende Apoptose (Barton et al.). Die Aktivierung von T-Zellen könnte zur Phosphorylierung und Aktivierung von CREB führen, wodurch AP1-Transkriptionsfaktoren induziert werden, die wiederum für IL-2-Produktion und Progression des Zellzyklus benötigt werden.

Auch in anderen Organen scheinen die Transkriptionsfaktoren der CREB/ATF-Familie in physiologische Prozesse involviert zu sein. So entwickeln Mäuse, die mutiertes CREB unter der Kontrolle eines muskelzellspezifischen α -MHC-Promotors exprimieren, typische Symptome der auch beim Menschen bekannten idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie (IDC). Es handelt sich dabei im wesentlichen um eine Herzmuskelerkrankung, die sich in fortschreitender biventrikulärer Disfunktion und Herzerweiterung äußert und zum frühzeitigen Tod führt. CREB und eventuell auch ATF1 beziehungsweise deren Zielgene scheinen für die Funktion und das Überleben der Herzmuskelzellen benötigt zu werden (Fentzke et al.).

Injektionen von dominant-negativem CREB in *Xenopus* Blastomere zeigen, daß die Proteine der CREB/ATF-Familie schon in viel früheren Entwicklungsprozessen eine Rolle spielen. Die Transkriptionsfaktoren werden für eine normale Gastrulation und Bildung des Neuralrohres benötigt. Die initiale Induktion des Mesoderms scheint nicht gestört zu sein, wohl aber die richtige morphologische Ausbildung der Somiten (Lutz et al., unveröffentlicht).

In Zellkulturen führen Experimente mit dominant-negativem CREB zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. In metastatischen Melanomzellen verringert CREB, das eine Mutation in seiner DNA-Bindungsdomäne trägt (KCREB), die Strahlenresistenz und das Potential, in Nacktmäusen Tumore und Metastasen zu bilden (Xie et al., Yang et al.). Andererseits scheinen CREB und seine verwandten Proteine als Überlebensfaktoren für menschliche Melanomzellen zu dienen und zu deren malignen Phänotyp beizutragen (Didier et al.).

In PC12-Phäochromocytoma-Zelllinien wurde gezeigt, daß CREB und ATF1 in der durch cAMP vermittelten, nicht aber in der durch NGF induzierten Differenzierung dieser Zellen eine Rolle spielen (Shimomura et al.).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die CREB/ATF-Familie an vielen physiologischen Prozessen beteiligt ist. CREB, CREM und ATF1 steuern somit verschiedene wichtige Regulationen im Organismus wie Proliferation und Differenzierung.

1.6.3 Ausschaltung einzelner Gene der CREB/ATF-Familie durch homologe Rekombination

Um die Funktion der einzelnen Transkriptionsfaktoren in den Signaltransduktionskaskaden und der Regulation ihrer Zielgene *in vivo* genauer zu analysieren, wurden einzelne Gene der CREB/ATF-Familie durch homologe Rekombination in der Maus ausgeschaltet.

In Mäusen, deren CREB-Gen in Exon 2 mutiert ist, fehlen die beiden funktionellen CREB-Isoformen α und δ . Die Tiere exprimieren jedoch immer noch CREB β (Hummler et al., Blendy et al.). Diese sogenannten CREB $\alpha\delta$ -Mäuse finden sich jedoch nicht mit einer nach Mendel erwarteten Häufigkeit von 25%, sondern bilden nur 15% der Nachkommen. Die Expression von CREM und CREB β im Gehirn dieser Mäuse wird stark hochreguliert. Die überlebenden Mäuse zeigen keine Abnormitäten während der Entwicklung. Unterschiede zu Wildtyp-Artenossen zeigen sich nur im Verhalten. Die CREB $\alpha\delta$ -Tiere haben ein anderes Lernverhalten und Erinnerungsvermögen (Bourtchuladze et al., Gass et al.) und nach Morphiumgabe verminderte Entzugserscheinungen (Maldonado et al.). Dieser Phenotyp läßt sich durch kompensatorische Überexpression von CREM und CREB β erklären.

Auch in der CREB_{null}-Mutante, die kein funktionelles CREB-Protein mehr bildet (Abb. 2 A), läßt sich eine Hochregulation der Expression von CREM nachweisen. Im Gegensatz zu den CREB $\alpha\delta$ -Mäusen sind diese Tiere kleiner als ihre Wildtyp-Geschwister und sterben innerhalb von 15 Minuten nach der Geburt an einer Atelektase der Lunge. Im Gehirn kann man eine Reduktion des Corpus callosum und der vorderen Kommissuren feststellen. Desweiteren findet man eine gestörte T-Zell-Entwicklung der $\alpha\beta$ -Linie, die in den CREB $\alpha\delta$ -Mäusen (E 18,5d p.c.) normal ist. Es liegt insgesamt eine geringere Anzahl von Thymuszellen vor, wobei alle Stadien der $\alpha\beta$ -T-Zell-Linie betroffen sind (Rudolph et al.). Auch hier sind kompensatorische Funktionen von ATF1 und von CREM vorstellbar.

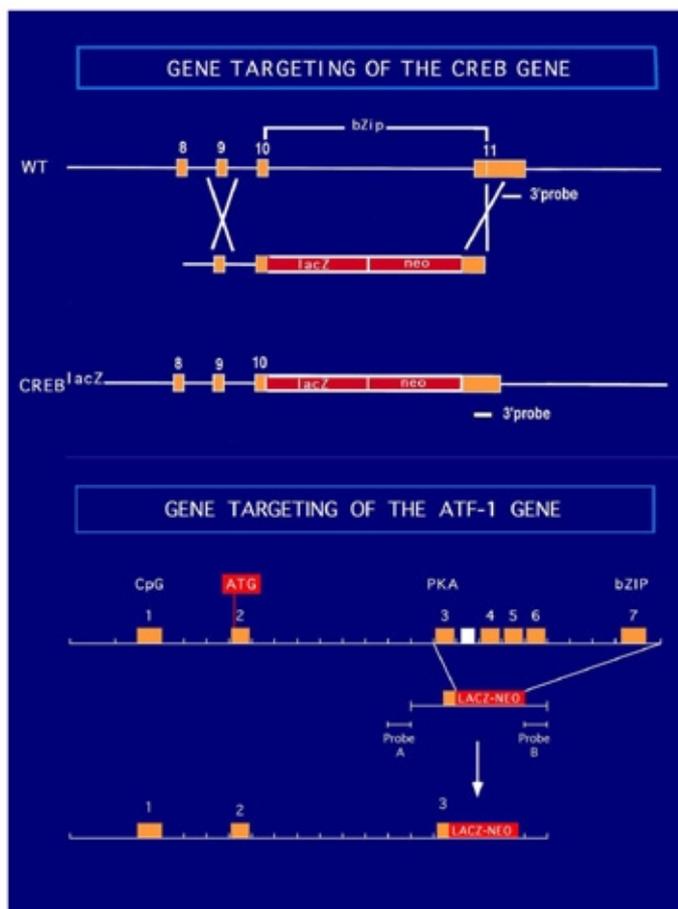


Abb. 2 Darstellung der Gentergating-Strategien der homologen Rekombination von CREB und ATF1

Die Ausschaltung von ATF1 alleine (Abb. 2 B) zeigt keine phenotypischen Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die ATF1^{-/-} Tiere erscheinen gesund, sowohl Männchen als auch Weibchen sind fertil und zeigen auf keine histologischen Veränderungen. CREM wird in diesen Mäusen nicht hochreguliert, und auch die Untersuchung verschiedener Marker in Thymuszellen durch Fluorescent-Activated Cell Sorter (FACS) Analyse läßt keine Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen erkennen (Blendy et Schütz, unveröffentlichte Ergebnisse). In Anbetracht des geringeren Transaktivierungspotentials von ATF1 im Vergleich zu CREB und der Fähigkeit der beiden Heterodimere zu bilden, ist auch hier eine Übernahme der Funktionen von ATF1 durch CREB anzunehmen.

Wird CREM in Mäusen durch homologe Rekombination ausgeschaltet, so entwickeln die Tiere Defekte in der Spermiogenese. Die männlichen Mäuse sind steril. Es bilden sich keine reifen Spermien. Der Stillstand in der Spermiogenese steht jedoch nicht in Zusammenhang mit einem Abfall an FSH oder Testosteron (Blendy et al.; Nantel et al.).

Interessanterweise konnte bei Mäusen, denen sowohl funktionelles CREB als auch funktionelles CREM fehlt, bisher keinerlei Abweichungen vom Phänotyp der CREB_{null}⁻

Mäuse nachgewiesen werden (C. Otto, unveröffentlicht). Die Hochregulation von CREM in den CREB_{null}-Mäusen scheint somit keine kompensatorische Bedeutung während der Entwicklung zu haben.

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine genauere Untersuchung der physiologischen Bedeutung von CREB und ATF1 während der Entwicklung der Maus. Um eventuelle kompensatorischen Funktionen des jeweils anderen Proteins in den ATF1^{-/-}- beziehungsweise CREB_{null}-Mäusen zu umgehen, wurden Doppelverpaarungen vorgenommen. Den Nachkommen dieser Verpaarungen fehlen sowohl funktionelles CREB- als auch funktionelles ATF1-Protein.

Die Analysen zeigen, daß ATF1 in der Embryonalentwicklung wichtig ist, und in einer dosisabhängigen Weise kompensatorisch für fehlendes CREB-Protein wirken kann. CREB dagegen kann komplett die Funktion von ATF1 bis zur Geburt hin übernehmen.

2. Ergebnisse

2.1 Expressionsmuster von CREB, CREM und ATF1

Die Expression von CREB, ATF1 und CREM wurde in der Maus mittels immunohistochemischer Methoden untersucht, um mehr über die Verteilung dieser Proteine insbesondere während der Embryonalentwicklung zu erfahren. Dazu wurden Antikörperfärbungen auf Paraffin- und Gefrierschnitten verschiedener Embryonalstadien angefertigt. Die hierfür verwendeten Antisera sind für das jeweilige Protein spezifisch, jedoch läßt sich zwischen den verschiedenen existierenden funktionellen Isoformen von CREB und CREM nicht differenzieren (siehe auch Methodenteil).

CREB wird in der adulten Maus ubiquitär, CREM am stärksten in Hoden exprimiert (Lee et al.). Ähnlich wie CREB ist ATF1 in fast allen Organen zu finden. So konnte ATF1 in Thymus, Leber, Lunge, Fett und Muskelgewebe nachgewiesen werden. Am höchsten ist die Expression allerdings in adultem Hoden. Im Gegensatz zu CREB wird ATF1 nicht in neuronalen sondern nur in Microgliazellen gefunden und scheint in der Signalvermittlung in Gehirn und Rückenmark keine Rolle zu spielen. Von CREM dagegen findet man in pränatalem, neuronalen Gewebe nur die CREM α - und CREM β -Isoform, allerdings geht deren Expression nach der Geburt zurück. Im adulten Gehirn wird vorwiegend der Repressor S-CREM exprimiert (Delmas et al.).

In allen bisher untersuchten Geweben mit Ausnahme von Hoden traten bisher immer mindestens zwei Proteine der CREB/ATF-Familie kolokalisiert auf.

2.1. Expression von CREB, CREM und ATF1 während der Hodenentwicklung

Ab Tag 13 p.c. der Embryonalentwicklung finden in der Urogenitaldifferenzierung entscheidende Veränderungen der zellulären Architektur statt, und erstmals lassen sich histologisch die Gonaden erkennen. Dies ist der frühestmögliche Zeitpunkt, Ovarien von Hoden eindeutig zu unterscheiden, obwohl sie ähnliche Form und Größe besitzen. Der Hoden besteht in dieser Phase aus Hodensträngen, den Vorläufern der Samenkanälchen, und dem dazwischenliegenden mesenchymalen Gewebe. Beide werden vom Keimepithel umgeben. In den Hodensträngen liegen die primitiven spermatogenetischen Zellen und die Sertoli-Zellen (Stützzellen).

Während dieser Entwicklung der Hoden werden die drei Proteine sehr unterschiedlich exprimiert. ATF1 und CREB werden am Tag E 14,5 p.c. nicht in primitiven spermatogenetischen Zellen exprimiert. CREB liegt hauptsächlich in mesenchymalem Gewebe, das die Hodenstränge umgibt, und in Sertoli-Zellen vor (Abb. 3 D). Zu diesem

Zeitpunkt lassen sich interstitielle beziehungsweise Leydig-Zellen (Zwischenzellen) nicht von mesenchymalen Zellen unterscheiden. ATF1 ist kolokalisiert, wird jedoch nicht sehr stark exprimiert (Abb. 3 A). CREM dagegen läßt sich in den primitiven Keimzellen nachweisen (Abb. 3 G). Während der weiteren Embryonalentwicklung ab Tag E 16 p.c. stoppt die Zellteilung in Hoden und setzt erst wieder nach der Geburt ein. Rund vierzehn Tage nach der Geburt startet die erste Spermatogeneserunde, um reife Spermien zu bilden. Die Samenkanälchen bestehen jetzt aus Sertoli-Zellen, Spermatogonien, primären und frühen sekundären Spermatozyten. Der Epithelverband in den Samenkanälchen wird von Sertoli-Zellen gebildet, die die männlichen Keimzellen ernähren und deren Entwicklung regulieren. Die Keimzellen liegen in Einstülpungen der Sertoli-Zellen. Während der Entwicklung von Spermatogonien über primäre und sekundäre Spermatozyten bis hin zu Spermatischen rücken sie gegen das Lumen der Samenkanälchen vor, von dem aus die reifen Spermien in den Nebenhoden abgegeben werden. CREB läßt sich zu diesem Zeitpunkt in den reifen Sertoli-Zellen nachweisen (Abb. 3 E). ATF1 liegt in den primären Spermatozyten vor (Abb. 3 B). In den ersten auftretenden sekundären Spermatozyten ist eine sehr starke CREM-Färbung erkennbar (Abb. 3 H). Diese Konstellation bleibt auch während der weiteren Reifung erhalten. In adultem Hoden wird CREB in den Sertoli-Zellen (Abb. 3 F) und ATF1 in primären Spermatozyten, spezifischer pachytänen Spermatozyten (Abb. 3 C) exprimiert. Eine wesentliche Funktion im Hoden wurde für CREM in späten primären und vor allem in sekundären Spermatozyten (Abb. 3 I) nachgewiesen. Männliche Mäuse ohne funktionelles CREM sind steril. In den Samenkanälchen stoppt die Spermiogenese nach Bildung runder Spermatischen, so daß sich keine reife Spermien mehr entwickeln (Blendy et al., Nantel et al.).

Trotz der relativ starken Expression von CREB und ATF1 in Sertoli-Zellen beziehungsweise pachytänen Spermatozyten, beeinflußt zumindest das Fehlen von funktionellem ATF1 nicht die Fertilität der Mäuse beider Geschlechter. Eine Aussage bezüglich der Fertilität von CREB^{-/-} Mäusen läßt sich wegen der frühen Sterblichkeit nicht machen. Morphologisch zeigen weder die Gonaden der CREB_{null}⁻ noch der ATF1^{-/-} Mäuse Abnormalitäten. Im Gegensatz dazu hat CREM in sekundären Spermatozyten eine für die Fertilität wesentliche Funktion.

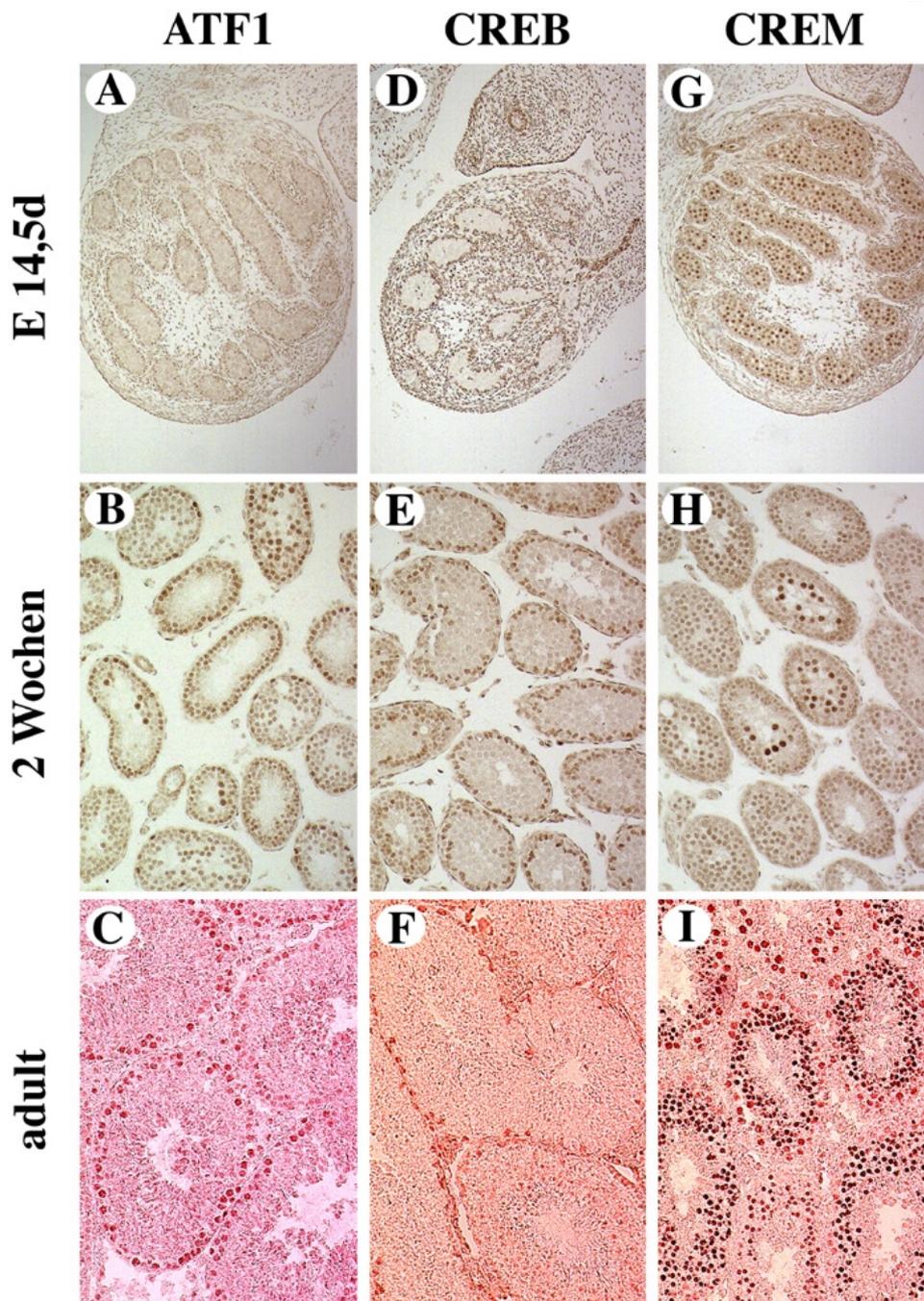


Abb. 3 Expression von ATF1-, CREB- und CREM-Protein während der Hodenentwicklung

(A-C): Immunohistochemische Färbung mit ATF1-spezifischem Antiserum; (A): Während der Embryonalentwicklung wird ATF1 in mesenchyalem Gewebe exprimiert. (B): Zu Beginn der frühen Spermatogenese findet man das Protein in primären Spermatocyten. (C): Im adulten Stadium beschränkt sich die Expression auf frühe primäre Spermatocyten im sogenannten pachytänen Stadium. (D-F): Immunohistochemische Färbung mit CREB-spezifischem Antiserum; (D): CREB wird nur in mesenchyalem Gewebe, um die Hodenstränge, die später die Samenkanälchen bilden, und in Vorläufern der Sertoli-Zellen exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich Leydig-Zellen bzw. deren Vorläufer nicht von anderem Gewebe unterscheiden. (E): 14 Tage nach der Geburt findet man ein starkes Signal für CREB in den schon reifen Sertoli-Zellen. (F): Im adulten Tier wird CREB in Hoden spezifisch nur noch in den Sertoli-Zellen exprimiert. (G-H): Immunohistochemische Färbung mit CREM-spezifischem Antiserum; (G): In sich entwickelndem Hoden des Embryos findet sich das Signal für CREM in den primitiven spermatogenetischen Zellen. Mesenchymale oder Sertoli-Zellen zeigen keine Färbung. (H): Zu Beginn der ersten Spermatogeneserunde (am Tag 14) wird CREM sehr stark in den ersten auftretenden sekundären Spermatocyten exprimiert. (I): In adultem Hoden läßt sich CREM in sekundären und etwas schwächer in späten primären Spermatocyten nicht aber in reifen Spermien nachweisen. (C, F und I: Cryoschnitte, andere: Paraffinschnitte);(verwendete Vergrößerung: 10x)

2.1.2 Expression von CREB, CREM und ATF1 während der Ovarentwicklung

Zum Vergleich der Expressionsmuster in Mäusen beider Geschlechter wurden immunohistochemische Färbungen für CREB, ATF1 und CREM auch während verschiedener Entwicklungsstufen der Ovarien durchgeführt. Der Ursprung und die Wanderung der Urkeimzellen an ihre spätere „Wirkungsstätte“ ist in beiden Geschlechtern gleich. Ab Tag E 13 p.c. läßt sich eine deutliche Organisation des Ovars erkennen. An der äußersten Peripherie befindet sich das Keimepithel, etwas weiter innen liegen die Keimzellen, die sich zu kleinen Gruppen zusammenfinden. Ganz im Inneren liegt das Mesenchym (Stroma). In dieser Phase befinden sich die Oogonien in der Mitose und sind direkt an das Keimepithel angelagert. Im Mesenchym und im Keimepithel wird CREB exprimiert (Abb. 4 D). ATF1 ist zu diesem Zeitpunkt nicht nachzuweisen (Abb. 4 A). CREM dagegen ist deutlich in den mitotischen Keimzellen zu erkennen (Abb. 4 G). Während der weiteren Embryonalentwicklung beginnen die Oogonien zu reifen: sie gruppieren sich als Eiballen in Richtung Cortex, während gleichzeitig eine starke Vermehrung des Zytoplasmas stattfindet. Alle Keimzellen treten noch während der Embryonalentwicklung in die Prophase der Meiose ein. Kurz vor der Geburt umgeben Follikelepithelzellen die Oozyten und bilden gemeinsam mit den Eizellen die Follikel. Wenige Tage nach der Geburt erreichen die Oozyten einen statischen Zustand, den sie bis wenige Stunden vor der Ovulation aufrechterhalten. Nach der Geburt wird CREB in geringem Maße hauptsächlich in Follikelepithelzellen exprimiert. Es ist aber auch in einzelnen Stromazellen zu finden (Abb. 4 E-F). Das Signal für CREM zeigt eine Färbung in den Follikelepithelzellen, es handelt sich hierbei aber um kein Kernsignal. Die interstitiellen Zellen sind frei von CREM-Protein (Abb. 4 H-I). ATF1 wird sehr stark in Oozyten exprimiert. Allerdings befindet sich das Protein überraschenderweise im Zytoplasma und nicht, wie für einen Transkriptionsfaktor erwartet, im Nukleus der Zellen (Abb. 4 B-C).

Aufgrund der Expressionsmuster könnten CREB, das in Mesenchym und Keimepithel nachgewiesen werden kann, und CREM, das in Keimzellen exprimiert wird, während der sehr frühen Keimzellentwicklung im Ovar eine Rolle spielen. ATF1 wird - für einen Transkriptionsfaktor ungewöhnlich - im Zytoplasma der Oozyten gefunden.

Das Ausschalten der Funktion von CREM und ATF1 zeigt keine Auswirkungen auf die Keimzellentwicklung oder Fertilität weiblicher Mäuse. Zu der Fertilität von CREB_{null}-Mäusen läßt sich aufgrund der perinatalen Sterblichkeit keine Aussage machen.

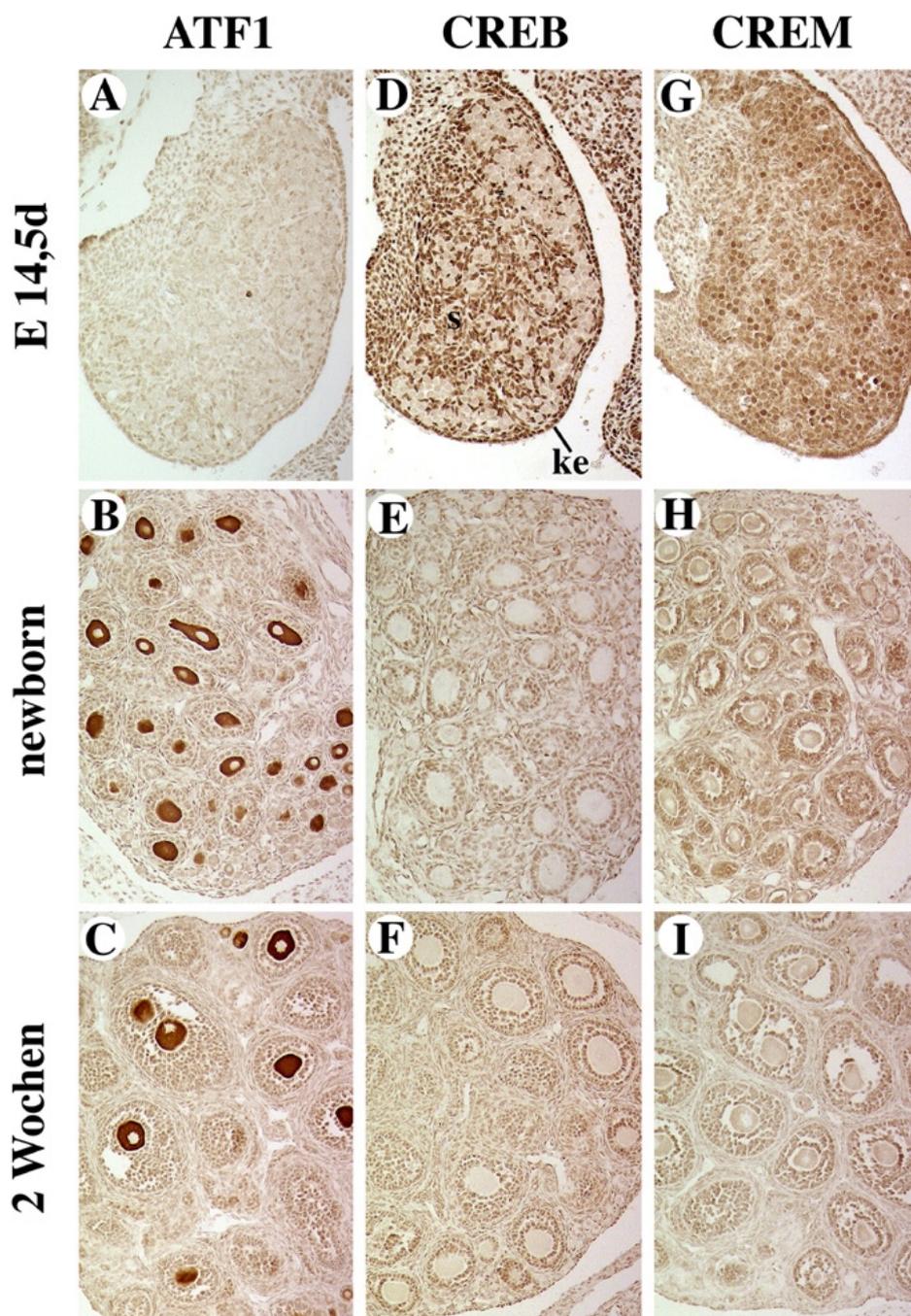


Abb. 4 Expression von ATF1-, CREB- und CREM-Protein während der Entwicklung der Ovarien

(A-C): Immunohistochemische Färbung mit ATF1-spezifischem Antiserum; (A): Während der Embryonalentwicklung wird ATF1 nicht im Ovar exprimiert. (B u. C): Nach der Geburt läßt sich ATF1 spezifisch im Cytosol der primären Oocyten und den Kernen der sie umgebenden Follikelepithelzellen finden. (D-F): Immunohistochemische Färbung mit CREB-spezifischem Antiserum; (D): Wie in den sich entwickelnden Hoden wird CREB in der Embryonalphase auch in den Ovarien vorwiegend in mesenchymalen Zellen exprimiert, jedoch zeigt sich auch eine starke Expression im Keimepithel. (E u. F): In den Follikeln wird CREB nur in den Follikelepithelzellen und nicht in den Oocyten nachgewiesen. Schwächere Signale sind auch in Stromazellen zu erkennen. (G-I): Immunohistochemische Färbung mit CREM-spezifischem Antiserum; (G): Im Gegensatz zu den beiden anderen Proteinen wird CREM deutlich in den sich entwickelnden Keimzellen sichtbar und nicht in mesenchyalem Gewebe. (H u. I): Im Neugeborenen und 14 Tage später zeigt CREM sich hauptsächlich in den Follikelepithelzellen, allerdings handelt es sich hierbei um keine Kernfärbung. ke: Keimepithel; s: Stroma (verwendete Vergrößerungen: A, D u. G: 10x; andere: 16x)

2.1.3 Expression von CREB, CREM und ATF1 während der frühen Embryonalentwicklung

Die Rolle der CREB/ATF-Familie in verschiedenen wichtigen Signaltransduktionswegen und die Ergebnisse von transdominant-negativem CREB in *Xenopus* (B.Lutz, unveröffentlicht) legen nahe, daß CREB, CREM und ATF1 schon während der Embryonalentwicklung wichtige regulatorische Funktionen übernehmen könnten. Aus diesem Grunde wurde das Expressionsmuster der Proteinfamilie während der frühen Embryogenese untersucht.

Antikörperfärbungen von Paraffinschnitten früher Embryonalstadien mit Antiseren, die spezifisch gegen ATF1, CREB und CREM gerichtet sind, brachten folgende Ergebnisse: ATF1 und CREB werden im Embryo schon sehr stark vor der Implantation in den Uterus exprimiert. 3,5 Tage nach Befruchtung der Eizelle liegt der Mausembryo als vor. Zu diesem Zeitpunkt hat der Embryo seine eigene Transkription und Translation übernommen. Die läßt sich in Embryoblast („inner cell mass“), aus dem später Embryo, extraembryonales Mesoderm, viszerales und parietales Entoderm entstehen, und in Trophektoderm, das an der Bildung des Chorions und des parietalen Dottersacks beteiligt ist, untergliedern (Abb. 5 G). ATF1 läßt sich sowohl im Embryoblasten als auch im Trophektoderm nachweisen (Abb. 5 A). CREB dagegen tritt nur im Embryoblasten auf (Abb. 5 C und F), während CREM-Protein nicht nachzuweisen ist (Abb. 5 D). Die Ergebnisse bestätigten LacZ-Färbungen von CREB^{+/-} und ATF1^{+/-} n, durch die das CREB-LacZ-Neomycin- beziehungsweise ATF1-LacZ-Neomycin-Fusionstranskript in diesem frühen Stadium nachgewiesen werden konnte (Abb. 5 E-F).

Der Embryoblast differenziert in primitives Ektoderm, aus dem sich der Embryo bildet, und primitives Entoderm, das sich zu viszeralem und parietalem Entoderm entwickelt. Nach der Implantation (E 4,5-5,5 d p.c.) wachsen primitives Ektoderm und Entoderm immer weiter in das Blastozoele ein. Im primitiven Ektoderm bildet sich die Amnionhöhle. Der Embryo hat jetzt die Form eines Zylinders und wird auch Epiblast oder Eizylinder genannt. Ab Tag E 6,5 p.c. der Embryogenese ist eine deutliche Abgrenzung in Form einer Einschnürung zwischen embryonalem und extraembryonalem Bereich des Embryos zu sehen (Abb. 6 E Pfeile). In dieser Phase wird ATF1 sehr stark in allen Anteilen des Embryos exprimiert (Abb. 6 A-B). Die Expression von CREB zeigt eine deutliche Abgrenzung zum extraembryonalen Pol des Embryos und ist auf den Epiblast beschränkt (Abb. 6 D-E). Dies steht in Kontinuität mit dem Expressionsmuster in der . CREM läßt sich weder embryonal noch extraembryonal nachweisen (Abb. 6 G).

Zwischen Tag 6,0 p.c. und Tag 7,5 p.c. findet im Embryo die Gastrulation statt. Zellmarkierungs- und Transplantationsexperimente haben gezeigt, daß alle drei Keimbätter (Ektoderm, Mesoderm und definitives Entoderm) während der Gastrulation vom Epiblast gebildet werden (Hogan et al.). Im posterioren Bereich des Embryos beginnen Epiblastzellen

zu delaminieren, sich zu Mesodermzellen umzubilden und zwischen Epiblast und primitivem Entoderm in Form des Primitivstreifens einzuwandern. Das Mesoderm entsteht aber nicht nur in distale Richtung sondern auch lateral von posterior nach anterior. Der Primitivstreifen reicht im Laufe der Entwicklung bis an das distale Ende des Embryos. Dort bildet sich ein zweites Zentrum der Mesodermbildung: der sogenannte Primitivknoten. Hier werden anteriores Mesoderm und embryonales Entoderm gebildet. Das posteriore Ende, die Stelle des Ursprungs des Primitivstreifens, behält weiterhin die Potenz Mesoderm zu formen und wird als Schwanzknospe („tail bud“) bezeichnet. Von derselben Stelle aus entsteht auch extraembryonales Mesoderm, das an der Amnion-, Chorion- und der Dottersackbildung beteiligt ist, sowie die Allantois bildet. Auch während dieser Entwicklung findet man ATF1 in allen Zellen des Embryos (Abb. 6 C), während CREB nur im Epiblast und in extraembryonalem Mesoderm, das von den pluripotenten Epiblastzellen gebildet wird, exprimiert wird (Abb. 6 F).

CREM Protein wird in dieser Phase der frühen Embryogenese nicht vorgefunden (Abb. 6 H-I) und scheint dementsprechend keine funktionelle Rolle zu spielen.

CREB und ATF1 werden also vor der Implantation des Embryos in den Uterus im Embryoblast exprimiert. Später findet man sie kolokalisiert in allen embryonalen Geweben sowie in extraembryonalem Mesoderm. ATF1 kann zusätzlich auch in allen anderen extraembryonalen Zellen des Embryos nachgewiesen werden. CREM wird zu diesem frühen Zeitpunkt nicht exprimiert.

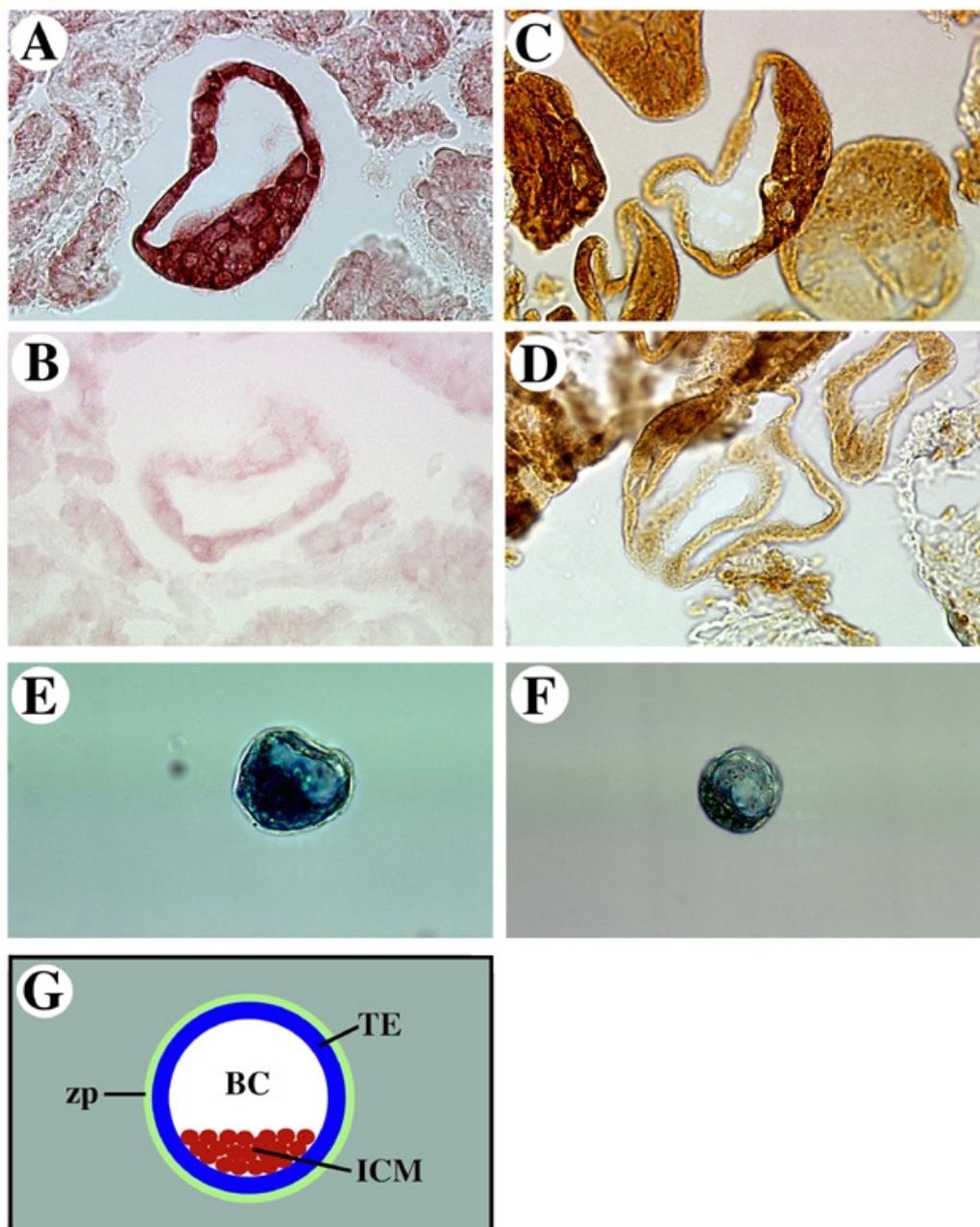


Abb. 5 Expression von ATF1-, CREB- und CREM-Protein im Blastozystenstadium

(A): Immunohistochemische Färbung mit ATF1-spezifischem Antiserum; ATF1-Protein findet sich in allen Zellen der Blastozyste (B):Antikörperfärbung mit ATF1-Preimmunserum; kein Signal (C): Immunohistochemische Färbung mit CREB-spezifischem Antiserum; CREB wird deutlich erkennbar im Embryoblast exprimiert, dagegen zeigt sich im Trophektoderm kein Signal. (D): Immunohistochemische Färbung mit CREM-spezifischem Antiserum; CREM läßt sich in Blastozysten nicht nachweisen. (E): LacZ-Färbung einer ATF1^{+/-} Blastozyste; Der gesamte Embryo weist eine Blaufärbung auf. (F): LacZ-Färbung einer CREB^{+/-} Blastozyste; Wie bei der immunohistochemischen Färbung scheint CREB im Trophektoderm nicht vorhanden zu sein. (G): schematischer Aufbau eines Embryos am Tag E 3,5 p.c.; BC: Blastocoel; TE: Trophektoderm; ICM: Embryoblast („inner cell mass“); zp: Zona pellucida; (Vergr.: A-D: 64x; E-F: 5x)

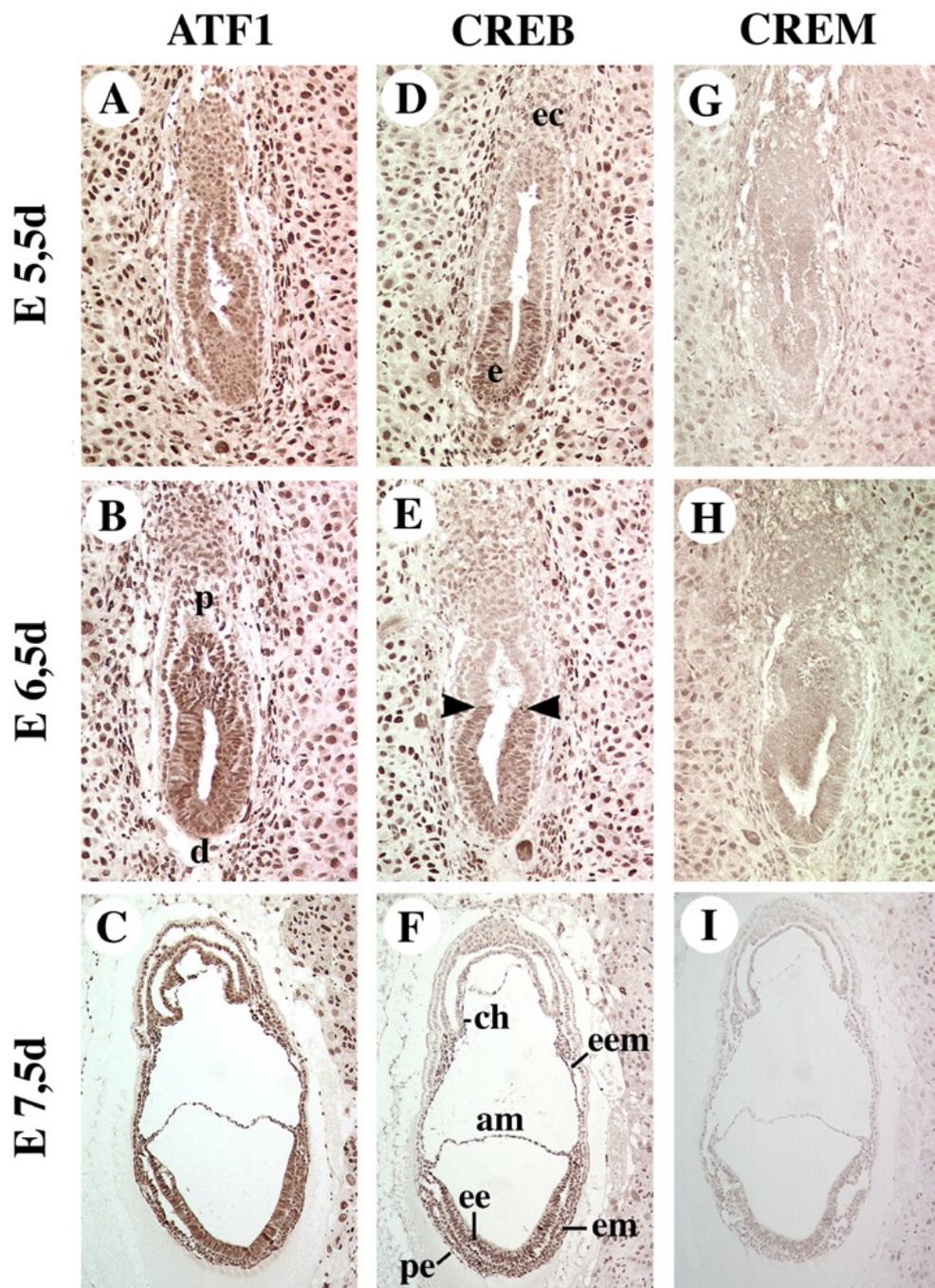


Abb. 6 Expression von ATF1-, CREB- und CREM-Protein während der frühen Embryonalentwicklung (E 5,5d - E 7,5d)

(A-C): Immunohistochemische Färbung mit ATF1-spezifischem Antiserum in E5,5d-E7,5d Embryonen. ATF1 wird in dieser Phase in allen extraembryonalen und embryonalen Zellen des Embryos exprimiert. (D-F): Immunohistochemische Färbung mit CREB-spezifischem Antiserum in E 5,5d p.c.-E 7,5d p.c. Embryonen; CREB wird nur im embryonalen Bereich, im Ektoderm des Amnions und in extraembryonalen Mesodermzellen exprimiert. In der Ektoplazenta und im viszeralem Entoderm läßt sich kein CREB nachweisen. (G-H): Immunohistochemische Färbung mit CREM-spezifischem Antiserum in E5,5d-E7,5d Embryonen. CREM wird zu diesem Zeitpunkt gar nicht im Embryo exprimiert.

ec: Ektoplazenta; e: Epiblast; p: proximal; d: distal; ch: Chorion; am: Amnion; eem: extraembryonales Mesoderm; ee: embryonales Ektoderm; pe: primitives embryonales Entoderm; em: embryonales Mesoderm (verwendete Vergrößerungen: C, F u. I: 10x; andere 16x)

2.2 Erzeugung von Mäusen ohne funktionelles CREB und ATF1

Trotz der hohen Expression von CREB während der Embryonalentwicklung und seiner Beteiligung an verschiedenen Signaltransduktionskaskaden entwickeln sich Mäuse ohne funktionelles CREB normal und sind erst perinatal letal. Allerdings finden sich sowohl CREB $\alpha\delta$ - als auch CREB_{null}-Mäuse aus Verpaarungen heterozygoter Elterntiere nicht mit der erwarteten Mendelschen Häufigkeit von 25%, sondern stellen nur einen Anteil von 15%. ATF1^{-/-} Tiere zeigen keine offensichtlichen Defekte, was auch auf eine Kompensation durch andere Proteine hinweisen könnte. Da sowohl ATF1 als auch CREB, jedoch kein CREM, in der frühen Embryonalentwicklung hoch im Epiblast exprimiert werden, liegt der Gedanke an kompensatorische Effekte des jeweils anderen Proteins in den ATF1^{-/-} beziehungsweise CREB_{null}-Mäusen nahe. Um dies näher zu untersuchen, wurden zur Erzeugung von Doppelmutanten Verpaarungen von Mäusen vorgenommen, die heterozygot für die beiden Gene waren. Sowohl die Tiere mit inaktiviertem CREB als auch die mit funktionslosem ATF1 stammen aus Linien, deren genetischer Hintergrund aus Kreuzungen zwischen C57BL/6- und 129SvEv-Mausstämmen resultiert.

Da die CREB-Mutation in homozygot mutanten Tieren perinatal letal ist, wurden die Nachkommen der Doppelverpaarungen mittels Kaiserschnitt kurz vor der Spontangeburt am Tag E 18,5 p.c. entnommen. Überraschenderweise fanden sich keine Doppelmutanten. Hinzu kam, daß auch keine Tiere des Genotyps ATF1^{+/-} CREB^{-/-} nachweisbar waren (Abb. 7 A). CREB scheint ein komplettes oder auch teilweises Fehlen von ATF1 (ATF1^{-/-} oder ATF1^{+/-}) kompensieren zu können, solange mindestens ein funktionelles Allel für CREB vorhanden ist. Umgekehrt entwickelt sich der Embryo ohne funktionelles CREB nur bis zur Geburt, auch wenn ATF1 in beiden Allelen in der Wildtyp-Form vorliegt.

Um diese auftretende embryonale Sterblichkeit weiter zu untersuchen, wurden Embryonen früherer Entwicklungsstufen entnommen. Der späteste Zeitpunkt, zu dem sich Doppelmutanten nachweisen ließen, war das Präimplantationsstadium der (Abb. 7 B). Allerdings lag die auftretende Häufigkeit von rund 16% deutlich unter den erwarteten 25% Doppelmutanten.

A

		Embryonalstadium		
		E 18,5d	E 9,5d	E 7,5d
Anzahl der Embryonen		147*	161*	65*
Genotypen	erwartete Verteilung	(%)	(%)	(%)
	(%)			
A+/+ C+/+	6,25	6,1	3,1	1,5
A+/+ C+/-	12,5	15,0	13,7	1,5
A+/+ C-/-	6,25	6,1	4,4	3,1
A+/- C+/+	12,5	17,7	13,7	1,5
A+/- C+/-	25,0	34,0	36,0	27,7
A+/- C-/-	12,5	0	14,3	9,2
A-/- C+/+	6,25	7,5	6,2	-
A-/- C+/-	12,5	12,2	8,1	3,1
A-/- C-/-	6,25	0	0	-
nicht kompl. genotypiert				52,3

* Genotyp der Eltern: (ATF1+/- CREB+/-) x (ATF1+/- CREB+/-)

B

		Embryonalstadium			
		E 6,5d	E 3,5d		
Anzahl der Embryonen		24*	8**	37**	82***
Genotypen	erwartete Verteilung	(%)	(%)	(%)	(%)
	(%)				
A+/+ C+/+	-	-	-	-	-
A+/+ C+/-	-	-	-	-	-
A+/+ C-/-	-	-	-	-	-
A+/- C+/+	8,3	-	13,5	-	-
A+/- C+/-	20,8	25	16,2	-	-
A+/- C-/-	12,5	-	13,5	-	-
A-/- C+/+	4,2	-	10,8	26,8	-
A-/- C+/-	4,2	-	35,1	53,7	-
A-/- C-/-	-	-	5,4	15,9	-
nicht kompl. genotypiert		50	75	5,4	3,7

* Genotyp der Eltern: (ATF1+/- CREB+/-) x (ATF1+/- CREB+/-); **Genotyp der Eltern: (ATF1-/- CREB+/-) x (ATF1+/- CREB+/-); ***Genotyp der Eltern: (ATF1-/- CREB+/-) x (ATF1-/- CREB+/-)

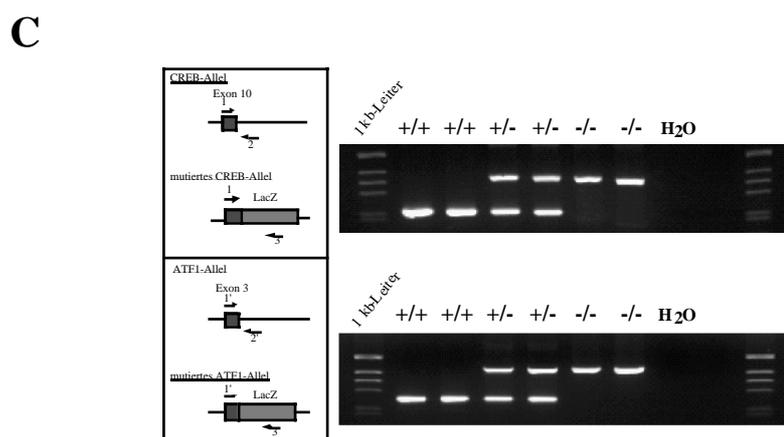


Abb. 7 (A-B): Nachkommenstatistik der Verpaarungen von Mäusen, die Mutationen im ATF1- und im CREB-Gen tragen
(C): PCR-Strategie zur Genotypisierung von ATF1 und CREB

linke Seite: PCR-Strategien aus Bereich Exon 10 von CREB und Exon 5 von ATF1. Die Exone sind durch dunkelgraue, die LacZ-Neomycin-Kassetten durch hellgraue Boxen gekennzeichnet. 1: 5'-CREB-Primer; 2: 3'-CREB-Primer; 1': 5'-ATF1-Primer; 2': 3'-ATF1-Primer; 3: LacZ-Primer; **Rechte Seite:** PCR der entsprechenden Genotypisierungen von 4 Wochen alten Mäusen. Die Genotypen sind durch +/+ (Wildtyp), +/- (heterozygote Mutante) und -/- (homozygote Mutante) gekennzeichnet. In der Negativkontrolle wurde statt DNA-Lösung destilliertes Wasser eingesetzt. PCR-Produkte von: mutiertem CREB-Allel: 370bp, Wildtyp-Allel von CREB: 230bp, mutiertem ATF1-Allel: 420bp, Wildtyp-Allel von ATF1: 260bp.

2.2.1 Phänotyp von Embryonen des Genotyps ATF1^{-/-}CREB^{-/-} am Tag E 3,5 p.c.

Die isolierten ATF1^{-/-} CREB^{-/-} Doppelmutanten am Tag E 3,5 p.c. unterscheiden sich phänotypisch sehr deutlich von Wildtyp-Embryonen. Im Gegensatz zu dem klar definierten Aufbau einer aus Embryoblast, Trophektoderm und Blastozoele gleichen die Mutanten eher einer Morula (Abb. 8 A-B). Entfernt man die den Embryo umgebende Zona pellucida und färbt die Zellkerne mit Hilfe von DAPI an, so erkennt man im Vergleich mit einem Wildtyp-Embryo eine deutlich reduzierte Anzahl von Zellen (Abb. 8 C-D). Die Doppelmutanten bestehen aus etwa der Hälfte der Blastomere, die ein normaler Embryo aufweist. Der Embryo ist demnach in seiner Entwicklung zurückgeblieben, und wahrscheinlich liegt ein Proliferationsdefekt vor.

Um festzustellen, inwieweit sich die Doppelmutanten noch entwickeln können, wurden sie in ES-Zellmedium *in vitro* kultiviert („outgrowth“-Experiment). Zellen normaler n können bis zu einer Woche in Kultur gehalten werden. In dieser Zeit teilen sie sich weiter, die Zona pellucida reißt auf und der Embryo setzt sich an der Oberfläche der Petrischale fest. Dies entspricht *in vivo* dem Implantationsstadium in den Uterus. Nach wenigen Tagen läßt sich eine Differenzierung des Embryo in verschiedene Zelltypen erkennen. Das Trophektoderm bildet eine einlagige Zellschicht. Diese sogenannten Trophoblasten breiten sich am Boden der Petrischale aus und beginnen zu wandern. Der Embryoblast formt einen fast kugelförmigen Zellkörper („cell body“), der sich später in primitives Ektoderm und daran anliegendes primitives Entoderm unterteilen läßt (Abb. 9 A und F). Die Doppelmutanten zeigen nicht dieses Verhalten. Sie setzen sich nicht in der Petrischale fest und differenzieren weiter aus, sondern es scheint zu einem Stillstand der Zellteilung zu kommen, und der Embryo stirbt ab (Abb. 9 E und J). Ein Hinweis darauf ist die Tatsache, daß sich die ATF1^{-/-} CREB^{-/-} Mutanten nach mehr als drei Tagen in Kultur nicht mehr genotypisieren lassen, und somit davon ausgegangen werden muß, daß die DNA degradiert ist. Auch die Zellmorphologie ähnelt der nekrotischer Zellen (Abb. 9 J). *In vitro*-Kulturen von ATF1^{+/+} CREB^{-/-} und ATF1^{-/-} CREB^{+/+} n entwickeln sich völlig normal. Die n lassen sich phänotypisch nicht vom Wildtyp unterscheiden (Abb. 9 B-C). Nach 4 Tagen Kultur zeigen auch sie einen klar definierten Zellkörper, der auf einer Lage von Trophoblasten sitzt (Abb. 9 G und H).

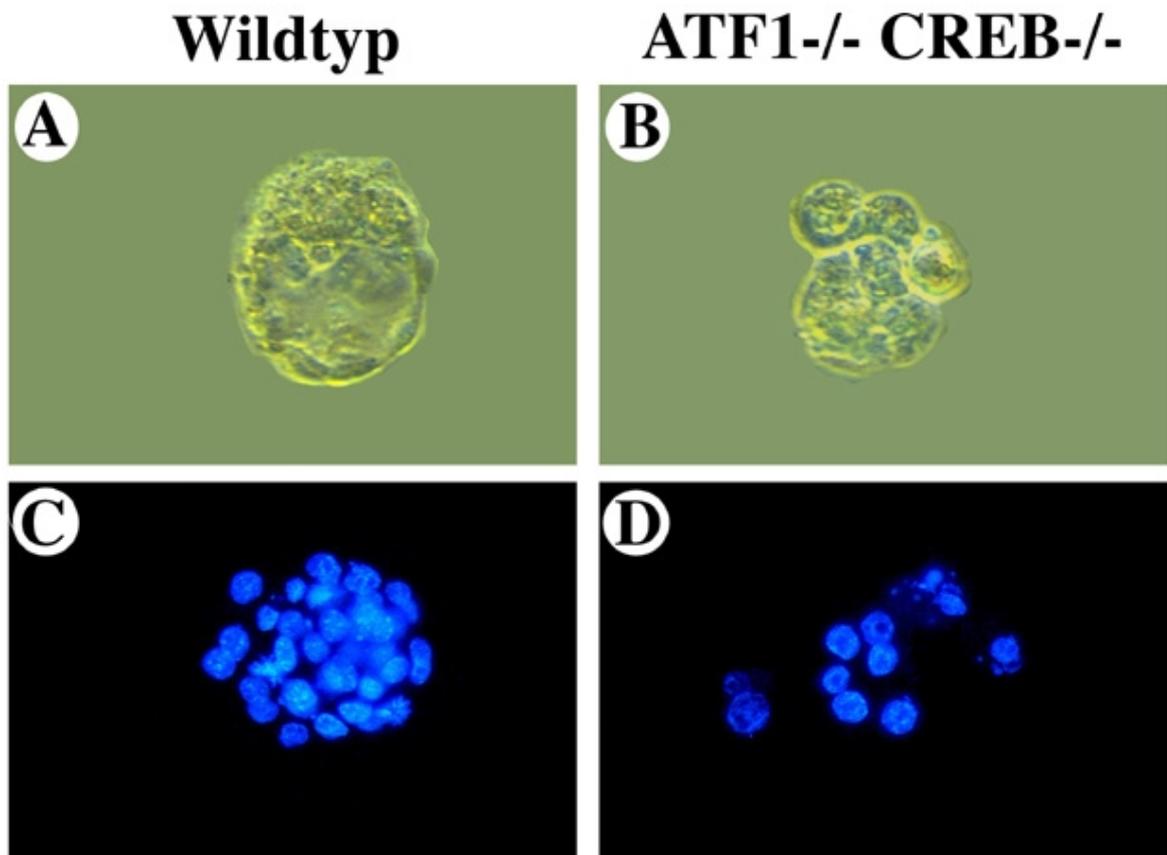


Abb. 8 4', 6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Färbung von Wildtyp-Blastozysten und Blastozysten des Genotyps ATF1^{-/-} CREB^{-/-} (A-B) Blastozysten nach Pronase-Behandlung und anschließender Fixierung über Nacht in 4% PFA; (C-D) DAPI-Färbung der einzelnen Blastomere (A u. C): Wildtyp-Blastozyste ; (B u. D): ATF1^{-/-} CREB^{-/-} Embryo zeigt deutlich geringere Zellzahl im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern (verwendete Vergrößerungen: A u. C: 32x; B u. D: 64x)

CREB/ATF1-Doppelmutanten weisen somit am Tag E 3,5 p.c. eine reduzierte Zellzahl auf und entsprechen vom Phänotyp eher einer Morula als der erwarteten . ATF1^{-/-} CREB^{-/-} Embryonen sterben in *in vitro*-Kultur ab, anstatt weiter zu differenzieren.

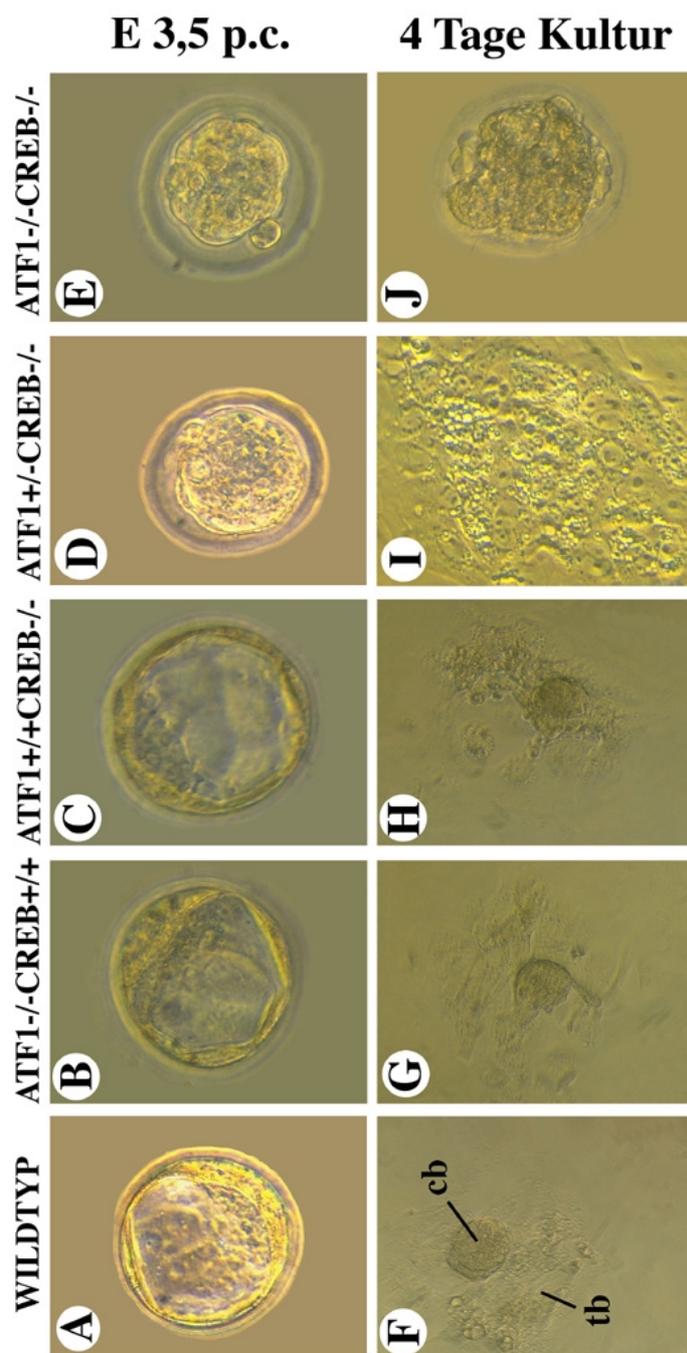


Abb. 9 *in vitro*-Kultur zur Differenzierung von Blastozysten („outgrowth“-Experiment)

(**A-E**): Blastozysten (E 3,5d p.c.) aus (ATF1^{+/-} CREB^{+/-}) x (ATF1^{+/-} CREB^{+/-}) Verpaarungen. (**F-I**): Blastozysten nach 96 Stunden Kultur in ES-Zellmedium. (**J**): Embryo nach 72 Stunden Kultur; (**A u. F**): Wildtyp; (**B u. G**): ATF1^{-/-} CREB^{+/+}; (**C u. H**): ATF1^{+/+} CREB^{-/-}; (**F,G u. H**): Aus den Blastozysten entwickelt sich eine Trophoblastenschicht und ein „Zellkörper“, der später in primitives Ektoderm und primitives Entoderm differenziert. (**D u. I**): ATF1^{+/-} CREB^{-/-}: Der isolierte Embryo sieht aus wie eine Morula. Nach 4 Tage *in vitro*-Kultur entwickelt sich eine normale Trophoblastenschicht. Der aus dem Embryoblast normalerweise entstehende „Zellkörper“ ist im Wachstum stark zurückgeblieben (ohne Abb.) oder fehlt ganz; (**E u. J**): ATF1^{-/-} CREB^{-/-}: Im Stadium E 3,5 p.c. zeigt der Embryo keinen Blastozystenphänotyp, sondern gleicht eher einer Morula. (E). In Kultur entwickelt sich der Embryo nicht. Der Embryo teilt sich nicht weiter, sondern stirbt innerhalb weniger Tage ab. cb: Zellkörper; tb: Trophoblasten (verwendete Vergrößerungen: A-E und J: 32x; F-H: 5x; I: 10x)

2.3 Embryonen ohne funktionelles CREB und heterozygot für ATF1

2.3.1 Phänotyp von Embryonen des Genotyps ATF1^{+/-} CREB^{-/-} am Tag E 9,5 p.c.

Bei der Geburt durch Kaiserschnitt am Tag E 18,5 p.c. fanden sich auch keine Embryonen des Genotyps ATF1^{+/-} CREB^{-/-}. Zu einem früheren Zeitpunkt während der Embryogenese am Tag E 9,5 p.c. jedoch, konnten Embryonen dieses Genotyps mit der erwarteten Häufigkeit isoliert werden (Abb. 7 A). Diese Mutanten unterscheiden sich rein äußerlich deutlich von ihren Geschwistern. Sie sind sehr viel kleiner, der Dottersack ist abnormal verformt, und es lassen sich keine embryonalen Strukturen wie Kopf, Körper oder Schwanz erkennen (Abb. 10 D und H). Im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen (Abb. 10 I) lassen die Einzelmutanten (ATF1^{-/-} und CREB^{-/-}; Abb. 10 G und E) kein abweichendes Aussehen erkennen. Auch Embryonen des Genotyps ATF1^{-/-} CREB^{+/-} weisen keine Unterschiede in der Entwicklung auf, so daß ein normales CREB-Allel auszureichen scheint, um das Fehlen von ATF1 zu kompensieren.

Um die ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen genauer zu untersuchen, wurden Paraffinschnitte mit anschließender Hämatoxylin/Eosin-Färbung angefertigt (Abb. 11 und 12). Anhand der Ergebnisse sind unterschiedliche Schnittebenen nachvollziehbar. Nicht alle Embryonen wurden als Ganzes aus der Dezidua isoliert. Teilweise wurden Ektoplazenta oder Teile des Dottersackes zur Genotypisierung verwendet.

Die Mutanten (ATF1^{+/-} CREB^{-/-}) lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Eine Gruppe besteht nur aus extraembryonalen Anteilen (Abb. 11 B, C und G). Diese Embryonen zeigen entweder nur viszerales Entoderm und Blutzellen (11 B und G), es lassen sich aber teilweise auch zusätzliche Strukturen wie Chorion und Ektoplazenta erkennen (Abb. 11 C). In der anderen Gruppe der Mutanten (Abb. 11 A, D, E und F) finden sich außer diesen Zelltypen auch typisch embryonale Anteile. Die Zellmorphologie läßt auf Gewebe wie Neuroektoderm, embryonales Entoderm und mesodermähnliche Zellen schließen (Abb. 12 A, E, F und H). Keiner der ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen zeigt eine normale Körperform. Es gibt keine klare Strukturierung in Kopf, Körper und Schwanz wie bei Wildtyp-Embryonen (Abb. 11 H).

ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen, die Strukturen von Neuroektoderm erkennen lassen, weisen eher Ähnlichkeiten mit Embryonen im Alter von 7,5d p.c. auf. Der Mausembryo vollführt im Alter von 7,5-8d p.c. normalerweise eine spiralartige Drehung um seine eigene Körperachse. Dadurch wird das Neuroektoderm nach aussen gekehrt, und das Entoderm, das dann den primitiven Darm bildet, kommt innen zu liegen (Inversion der Keimblätter). Einen Vorgang dieser Art durchlaufen ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen nicht. So liegt in diesen Embryonen das definitive (embryonale) Entoderm außen (Abbildung 12 A und E), obwohl es am Tag E 9,5 p.c. eigentlich den primitiven Darm auskleiden sollte.

Alle Mutanten zeigen einen auffallend hohen Anteil von viszeralem Entoderm und sogenannten Blutinseln, deren Zellen primitive Vorläufer von Erythrozyten mit großen Nuklei sind.

Tatsächlich sind alle embryonalen Gewebe und extraembryonales Mesoderm, in denen sowohl ATF1 als auch CREB exprimiert werden, in ihrer Entwicklung gestört. Da in viszeralem Entoderm nur ATF1 exprimiert wird, und kein CREB-Protein zu finden ist, läßt sich dort trotz CREB^{-/-} Genotyps auch kein Defekt erwarten.

Um festzustellen, ob in diesen Embryonen noch Proliferation stattfindet, oder ob diese Auffälligkeiten durch ein erhöhtes Auftreten an Apoptose entstehen, wurden die DNA-Synthese mittels BrdU-Inkorporation bestimmt, und Apoptose mittels TUNEL-Färbung nachgewiesen (Abb. 13). Mit BrdU-Färbung konnten Zellen kenntlich gemacht werden, die sich in einem Zeitraum von 30 Minuten, bevor die Embryonen entnommen wurden, in der S-Phase der Mitose befanden. Die Proliferation der meisten Zellen scheint nicht gestört zu sein. Positive Signale zeigen sich sehr stark im viszeralem Entoderm, aber auch im Neuroektoderm und Mesoderm. Zusätzlich weisen einzelne Zellen der „Blutinseln“ eine Färbung auf (Abb. 13 B, E und H). Zusätzlich zur BrdU-Färbung konnten diese Zellen auch durch Nachweis von Cyclin-abhängiger Kinase 2 (cdk2) kenntlich gemacht werden (Abb. 13 A, D, und G). Cdk2 wird kurz vor dem Start der S-Phase des Zellzyklus durch Cyclin E und A, die zur Initiation der DNA-Replikation nötig sind, aktiviert. Apoptotische Zellen liessen sich in ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen kaum finden. Es handelte sich bei den positiven Zellen um Blutinselzellen, die mit Vorläufern der Erythrozyten vergleichbar sind, und um Zellen mit mesodermalem Charakter (Abb. 13 C, F und I).

Die ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen weisen am Tag 9,5 p.c. eine völlige Desorganisation embryonaler Gewebe auf und sind zusätzlich in ihrer Entwicklung zurückgeblieben.

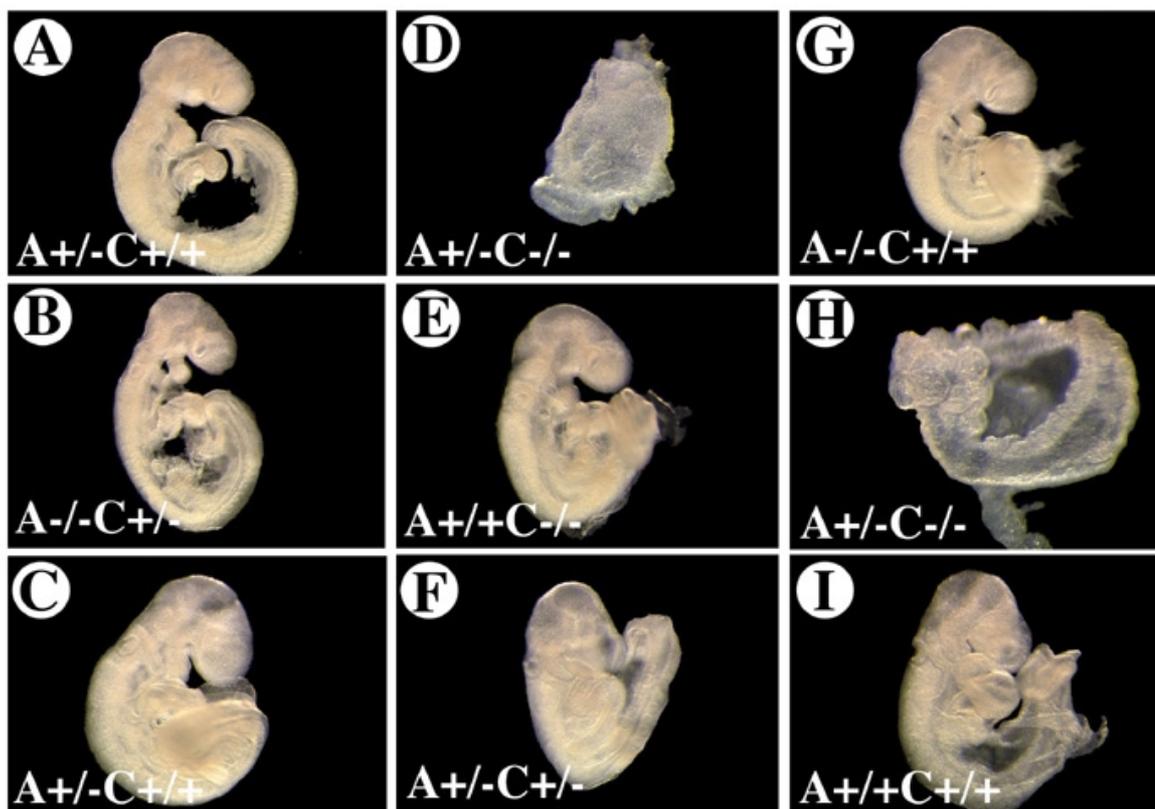


Abb. 10 Wurf einer (ATF1^{+/-} CREB^{+/-}) x (ATF1^{+/-} CREB^{+/-}) Verpaarung am Tag E 9,5 p.c.

(**A**): A^{+/-} C^{+/+}; (**B**): A^{-/-} C^{+/-}; (**C**): A^{+/-} C^{+/+}; (**E**): A^{+/+} C^{-/-}; (**F**): A^{+/-} C^{+/-}; (**G**): A^{-/-} C^{+/+}; (**I**): A^{+/+} C^{+/+}; (**D u. H**): A^{+/-} C^{-/-}; Mutanten sind deutlich kleiner als ihre Geschwister. Es sind keine Strukturen wie Kopf, Herz oder Schwanz zu erkennen. Der Dottersack ist abnormal verformt. (**G u. E**): Die Einzelmutanten dagegen weisen keinen abnormen Phänotyp auf und sind vom Wildtyp-Embryo nicht zu unterscheiden.

A: ATF1; C: CREB

(verwendete Vergrößerungen: D: 4x; H:5x; andere:3,2x)

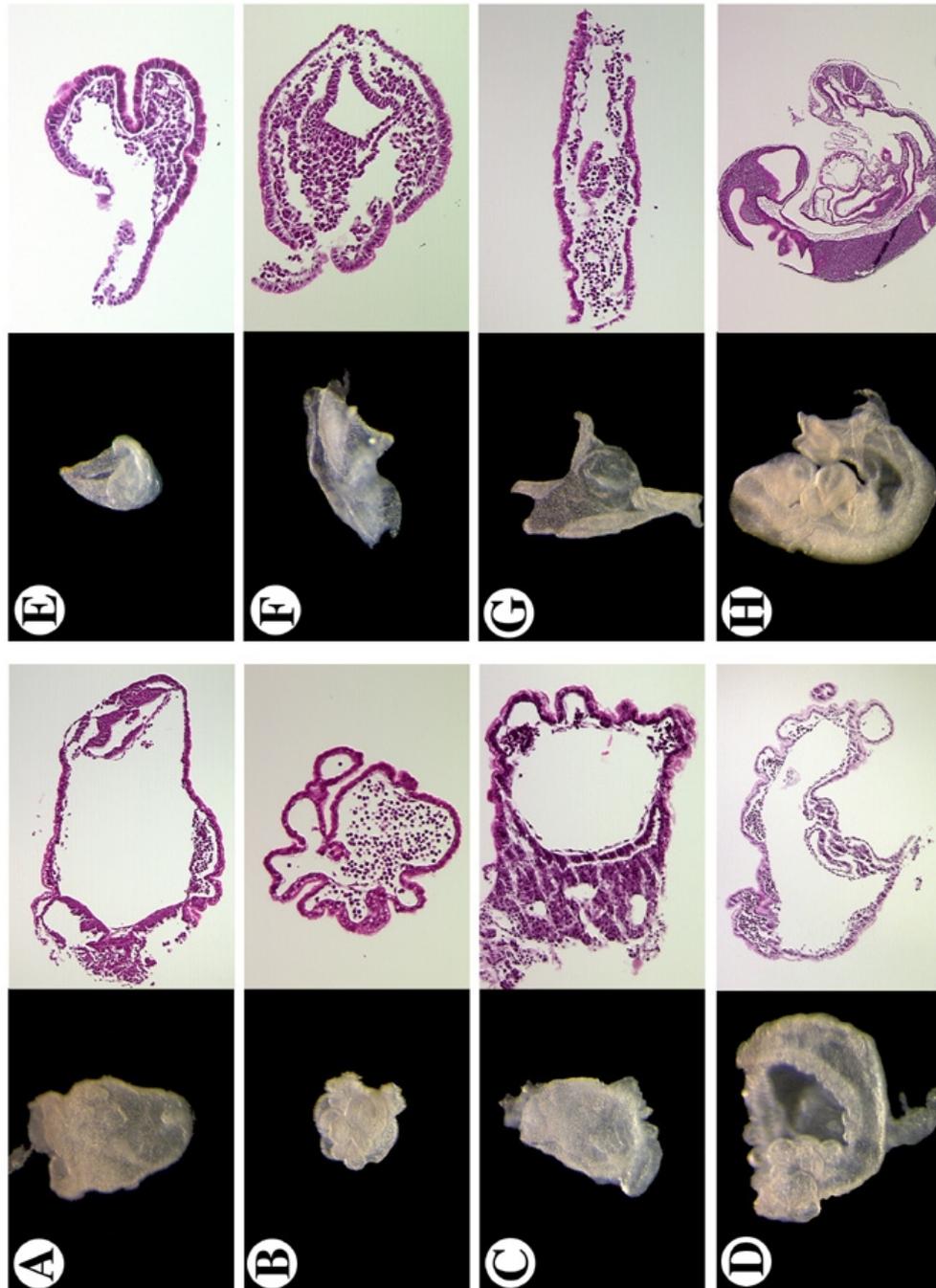


Abb.11 Phänotyp von Embryonen des Genotyps $ATF1^{+/-}$ $CREB^{-/-}$ am Tag E 9,5 p.c.

(A-G): Die Mutanten weisen sowohl äusserlich als auch in Paraffinschnitten erkennbar keinen einheitlichen Phänotyp auf und unterscheiden sich in ihrer Gewebezusammensetzung. Im Vergleich zum Wildtyp-Embryo (H) bestehen die Mutanten nur zu einem geringen Teil aus embryonalem Gewebe. $ATF1^{+/-}$ $CREB^{-/-}$ Embryonen bestehen vorwiegend aus extraembryonalen Bestandteilen (siehe Abb. 12)

HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung; verwendete Vergrößerungen: Aufsicht: A u. C: 4x, B, D-F:5x, G-H: 3,2x; H/E-Färbungen: A: 8x, B, E-F: 16x, C u. G: 12x, D: 6,25x, H: 3,125x)

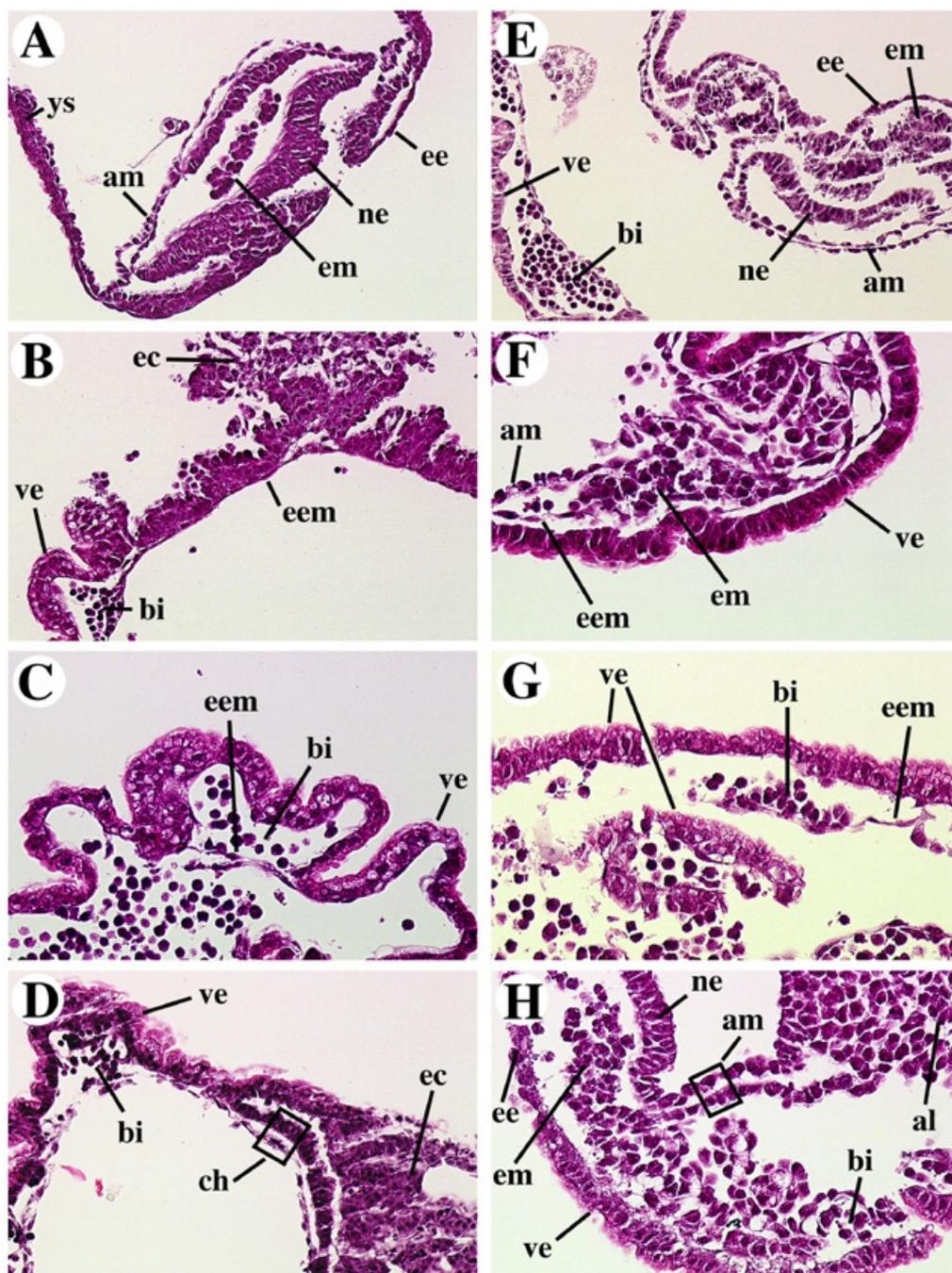


Abb. 12 Ausschnittsvergrößerungen von Abb. 11

(A-B): Ausschnittsvergrößerung von Abb. 11 A; (C): Ausschnittsvergrößerung von Abb. 11 B; (D): Ausschnittsvergrößerung von Abb. 11 C; (E): Ausschnittsvergrößerung von Abb. 11 D; (F): Ausschnittsvergrößerung von Abb. 11 E; (G): Ausschnittsvergrößerung von Abb. 11 G; (H): Ausschnittsvergrößerung von Abb. 11 F; (A-B, E u. H): Mutanten zeigen morphologisch embryonale Bestandteile wie Neuroektodermzellen, embryonales Mesoderm und embryonales Entoderm, jedoch sehr unstrukturiert und nicht in der Form eines Embryokörpers.

(C, D, F u. G): Mutanten scheinen hauptsächlich aus extraembryonalen Geweben zu bestehen. Auffällig ist der hohe Bestandteil an viszeralem Entoderm. Alle Mutanten weisen eine große Menge an Vorläufern fetaler Blutzellen auf, die normalerweise als kleine „Inseln“ im Dottersack zu finden sind. ys: Dottersack; am: Amnion; ee: embryonales Entoderm; ne: Neuroektoderm; em: embryonales Mesoderm; ec: Ektoplazenta; ve: viszerales Entoderm; bi: Blutinsel; eem: extraembryonales Mesoderm; ch: Chorion; al: Allantois; HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung (verwendete Vergrößerungen: A, B u. D: 20x; C u. G-H: 32x; E: 16x)

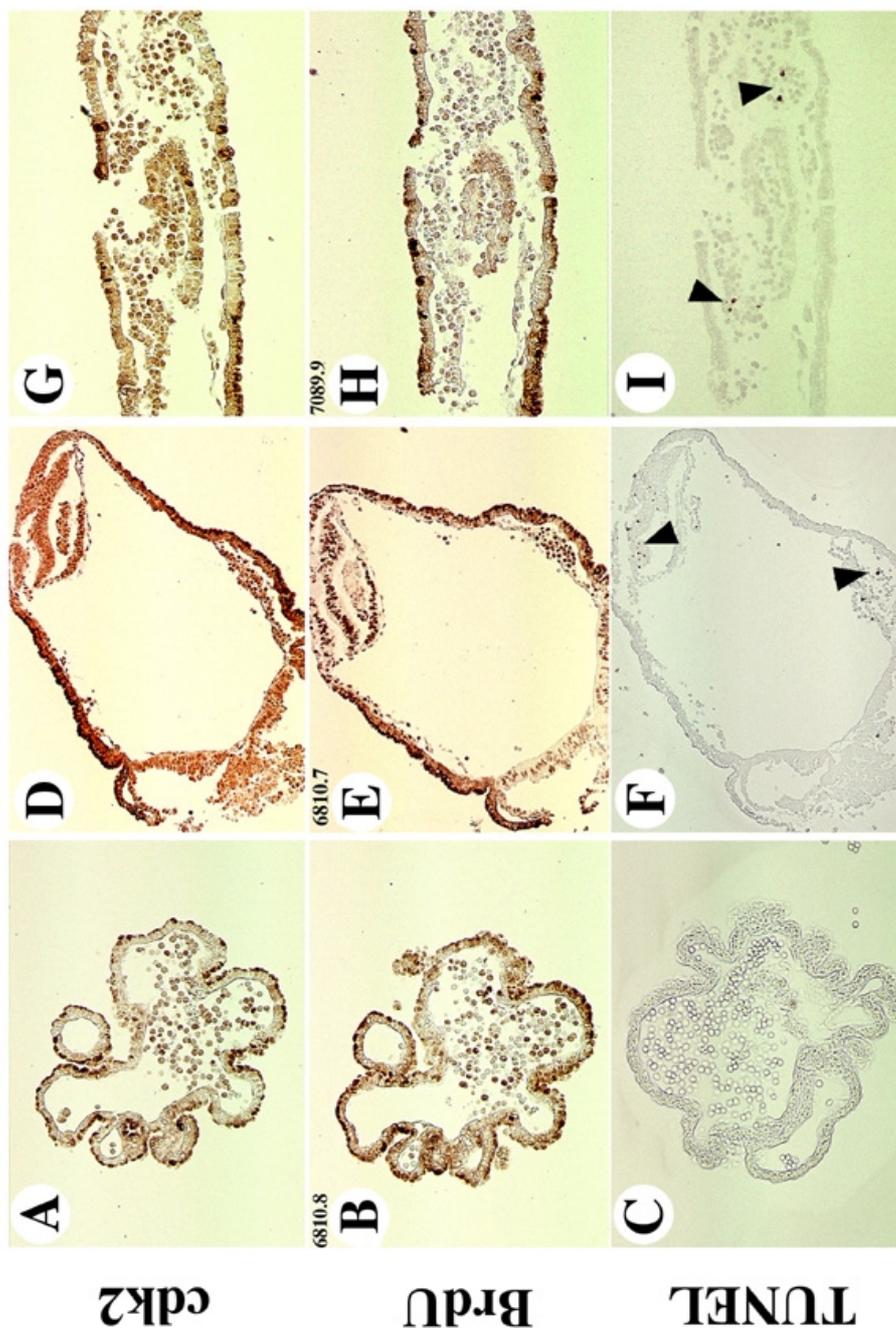


Abb.13 Proliferation und Apoptose in Embryonen des Genotyps ATF1+/- CREB-/- am Tag E 9,5 p.c.

(A, D u. G): Immunhistochemische Färbungen mit cdk2-spezifischem Antikörper; Cdk2 wird kurz vor dem Start der S-Phase der Zellteilung durch Cyclin E und A aktiviert. (B, E u. H): Durch BrdU-Injektion in das Muttertier (30 Minuten bevor dieses getötet wird) können proliferierende Zellen auch in Embryonen nachgewiesen werden. Die Mutanten zeigen keine auffällige Reduktion an proliferierenden Zellen. (C, F u. I): Durch TUNEL-Färbung wird die für apoptotische Zellen typische fragmentierte DNA nachgewiesen. Die Mutanten zeigen kein erhöhtes Maß an Apoptose. (verwendete Vergrößerungen: A-C u. G-I: 16x, D-F: 10x)

2.3.2 Phänotyp von Embryonen des Genotyps ATF1+/- CREB-/- am Tag E 7,5 p.c.

Um die frühe embryonale Differenzierung genauer zu verfolgen, wurden Embryonen am Tag E 7,5 p.c. und E 6,5 p.c. isoliert. In der späten Gastrulationsphase zeigen Embryonen des Genotyps ATF1+/- CREB-/- in Hämatoxylin/Eosin-Färbungen der Paraffinschnitte auffallende morphologische Abweichungen von ihren Geschwister-Embryonen (Abb. 14). Die Mutanten sind auch zu diesem Zeitpunkt etwas kleiner. Es läßt sich keine deutliche Grenze zwischen extraembryonalem und embryonalem Bereich in Form einer Einschnürung finden. Strukturen wie Amnion, Allantois und Chorion, die während der Gastrulation gebildet werden, fehlen. Die normalerweise klar erkennbare Gliederung der drei Keimbätter in embryonales Ektoderm, primitives Entoderm und das dazwischen liegende embryonale Mesoderm ist nicht vorhanden. So findet man in keinem der ATF1+/- CREB-/- Embryonen typische säulenförmigen Ektodermzellen oder Zellen mit typisch mesodermalem Charakter. Die meisten dieser Embryonen bestehen nur aus viszeralem Entoderm und einer zweiten innen anliegenden Schicht extraembryonalen Ektoderms. Diese umschließen eine mehr oder weniger große Amnionhöhle. Im distalen Bereich bilden embryonale Zellen einen unstrukturierten Zellhaufen. Einige Mutanten sind ganz von viszeralem Entoderm umhüllt (Abb. 14 E und F), wohingegen andere distale Zellen erkennen lassen, die embryonalen Entodermzellen ähneln (Abb. 14 B,C und D).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in Mutanten jegliche typisch extraembryonale Struktur wie Chorion, Allantois und Amnion fehlt, und offensichtlich keine normale Gastrulation durchlaufen stattfindet.

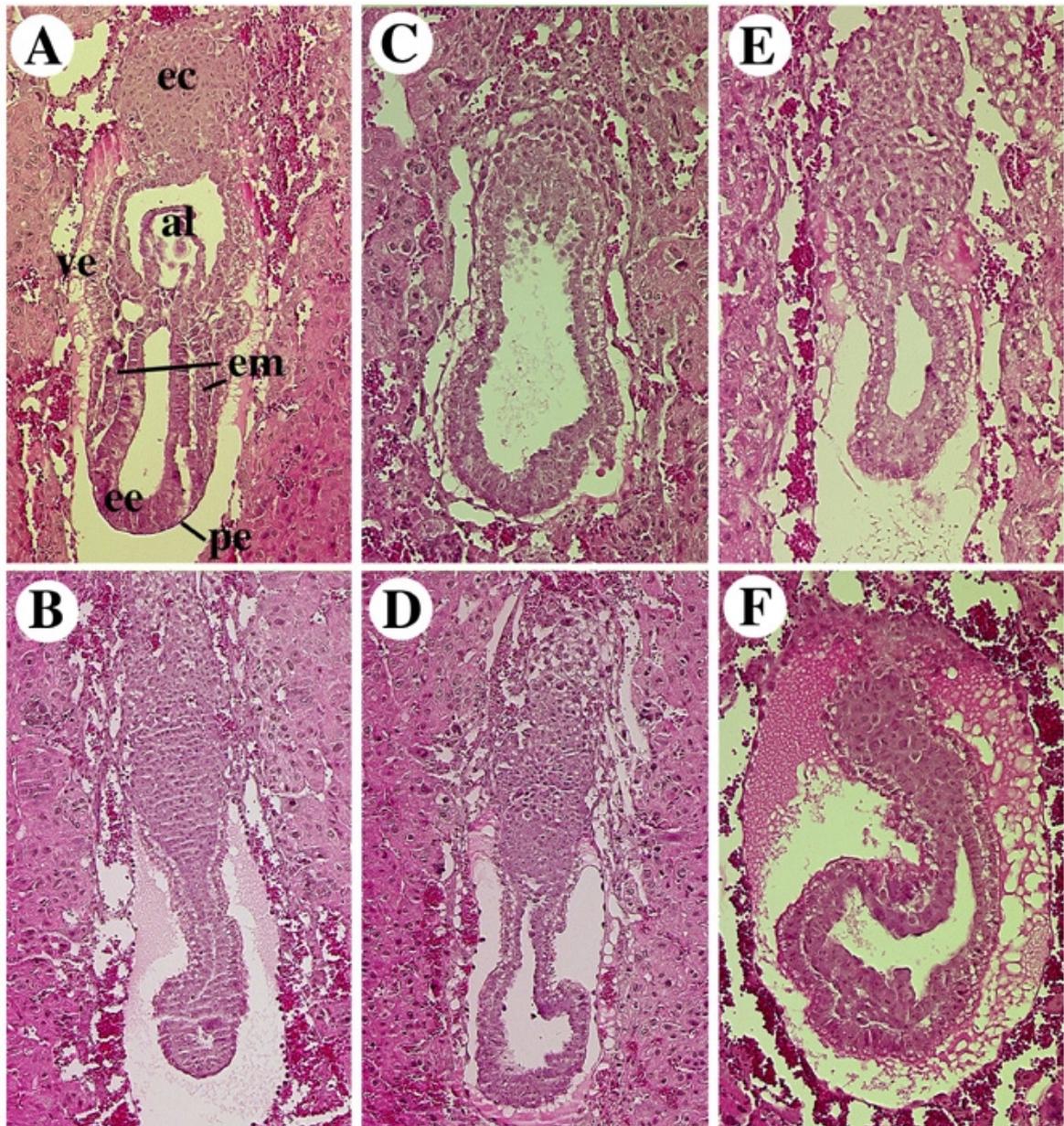


Abb. 14 Phänotyp von Embryonen des Genotyps $ATF1^{+/-} CREB^{-/-}$ während der Gastrulation am Tag E 7,5 p.c.

(A-F): HE-Färbung sagittaler bzw. frontaler (A) Paraffinschnitte

(A): Wildtyp-Embryo; (B-F): Die $ATF1^{+/-} CREB^{-/-}$ Mutanten zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen außer einer auffälligen Größenreduktion eine deutliche Desorganisation sowohl extraembryonaler als auch embryonaler Bestandteile. Die deutliche Absetzung zwischen extraembryonalem und embryonalem Bereich fehlt. Eine Gliederung in Ektoderm, Mesoderm und Entoderm ist nicht erkennbar. Besonders auffällig ist das Fehlen von Amnion und Allantois.

ec: Ektoplazenta; ve: viszerales Entoderm; em: embryonales Mesoderm; ee: embryonales Ektoderm; pe: primitives (embryonales) Entoderm; al: Allantois; HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung

(verwendete Vergrößerungen: A: 12,5x; B u. D: 10x; C, E u. F: 16x)

Um die einzelnen extraembryonalen und embryonalen Derivate genauer zu beschreiben und um festzustellen, ob Gastrulation stattfindet, wurde die Expression molekularer Markergene mittels *in situ* Hybridisierung in den Mutanten untersucht.

Wildtyp-Embryonen exprimieren während des Gastrulationsstadiums α -Fetoprotein (AFP) in viszeralem Entoderm (Abb. 15 C, Pfeil). Auch in ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen findet man am Tag E 7,5 p.c. Expression von AFP in viszeralem Entoderm, das in einigen Mutanten auch den distalen Bereich der Embryonen umgibt (Abb. 15 D).

Zum Nachweis von pluripotenten Stammzellen, die zur Embryobildung nötig sind, wurde oct-4 verwendet. Oct-4 wird zunächst im gesamten primitiven Ektoderm beziehungsweise Epiblast exprimiert. Die Anzahl der Stammzellen verringert sich im Laufe der Gastrulation durch zunehmende Differenzierung der Zellen. Anfangs läßt sich in Wildtyp-Embryonen noch eine enorme Menge oct-4 positiver Zellen nachweisen (Abb. 16 E). Im Laufe der weiteren Entwicklung nimmt das Signal für oct-4 jedoch ab (Abb. 16 F und D), so daß sich oct-4-mRNA nach der Gastrulation nur noch in Urkeimzellen finden läßt. In ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen zeigt sich kein einheitliches Bild der oct-4 Expression (Abb. 17). Oct-4 wird entweder stark im distalen Bereich des Embryos exprimiert (Abb. 17 E und H), oder es lassen sich nur sehr wenige (Abb. 17 F) beziehungsweise gar keine (Abb. 17 G) pluripotenten Stammzellen nachweisen. In Mutanten ohne Epiblastzellen läßt sich auch keine Ausdifferenzierung eines Embryos erwarten.

Die Vorgänge während der Gastrulation in den ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Mutanten wurden mittels der Expressionsmuster von Genen untersucht, die normalerweise in dieser Phase regional begrenzt auftreten. Fgf-8 wird vor Bildung des Primitivstreifens spezifisch im posterioren Bereich des Epiblasts exprimiert. Während der Gastrulation findet man fgf-8 in posterioren Epiblastzellen, kurz bevor sie in den Primitivstreifen einwandern (Abb. 18 D). Der Transkriptionsfaktor lim-1 wird zunächst auch beschränkt auf embryonales Mesoderm exprimiert (Abb. 19 D). Zu Beginn der Gastrulation findet man lim-1-mRNA im posterioren Teil des Epiblasts. In der späten Gastrulation allerdings läßt sich lim-1 im anterioren Mesentoderm nachweisen. In den ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen wird sowohl fgf-8 als auch lim-1 wiederum nur am distalen Ende exprimiert (Abb. 18 E und F; Abb. 19 E und F). Interessanterweise zeigen aber die lim-1 positiven Zellen Entodermcharakter (Abb. 19 B und C), was dafür spricht, daß es sich hierbei um eine anteriore Struktur handelt.

Auch hnf-3 β -mRNA wird zunächst zu Beginn der Gastrulation im posterioren Epiblast exprimiert. Im späten Primitivstreifen-Stadium jedoch findet man hnf-3 β in anteriorem Mesoderm und in der Chorda dorsalis (Notochord) (Abb. 20 A und D). In den Mutanten dagegen läßt sich entweder gar keine oder nur eine auf einen kleinen Bereich begrenzte Expression nachweisen (Abb. 20 E und F).

Ein klassischer Marker für die Mesoderminduktion und -bildung ist brachyury (T). Im Wildtyp-Embryo wird brachyury zunächst vor und in der sehr frühen Phase der Gastrulation im proximalen Ende des posterioren Epiblasts gefunden. Während der Bildung des

Primitivstreifens wird brachyury dann vorübergehend in delaminierenden Epiblast- und neugebildeten Mesodermzellen exprimiert (Abb. 21 F und D). Sobald die Allantois entsteht, wird T im Primitivknoten transkribiert (Abb. 21 E), ehe die Expression herunterreguliert wird. Auch hier zeigt sich in ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen kein einheitliches Bild. Einige Mutanten exprimieren gar keine brachyury-mRNA (Abb. 22 F), andere weisen nur sehr wenig brachyury auf (Abb. 22 E) und wiederum andere zeigen deutlich brachyury Transkription, allerdings nicht entlang eines Primitivstreifens (Abb. 22 D).

Da die Embryonen eine gestörte Bildung embryonalen Mesoderms zeigen und sowohl Amnion, Allantois als auch Chorion fehlen, wurde auch eine Störung der Differenzierung von extraembryonalem Mesoderm vermutet. Um dies zu überprüfen, wurde das Expressionsmuster für bmp-4 während der Gastrulation in den Mutanten kontrolliert. Bmp-4 gehört zur TGF- β -Familie und dient als Marker für extraembryonales Mesoderm. Wie erwartet wird bmp-4 in Wildtyp-Embryonen stark in extraembryonalem Mesoderm exprimiert, das vom posterioren Epiblast gebildet wird (Abb. 23 D). In den Mutanten wiederum findet man die für bmp-4 positive Zellen nicht in Form einer Allantois oder einer einlagigen Zellschicht, die den extraembryonalen Bereich auskleidet, sondern als kleine Zellpopulation im distalen Bereich des Embryos (Abb. 23 E). Einige ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen bilden augenscheinlich gar kein extraembryonales Mesoderm aus (Abb. 23 F).

Die Hämatoxylin/Eosin-Färbungen und die Markeranalysen zeigen, daß ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Mäuse am Tag E 7,5 p.c. vorwiegend aus extraembryonalem Ektoderm und viszeralem Entoderm bestehen. Die Mutanten weisen zu diesem Zeitpunkt kein embryonales Gewebe auf oder nur in Form einer Anhäufung weniger Zellen am distalen Ende. Die teilweise vorhandenen Epiblastzellen zeigen eine gestörte Gastrulation, differenzieren aber in embryonales und extraembryonales Mesoderm.

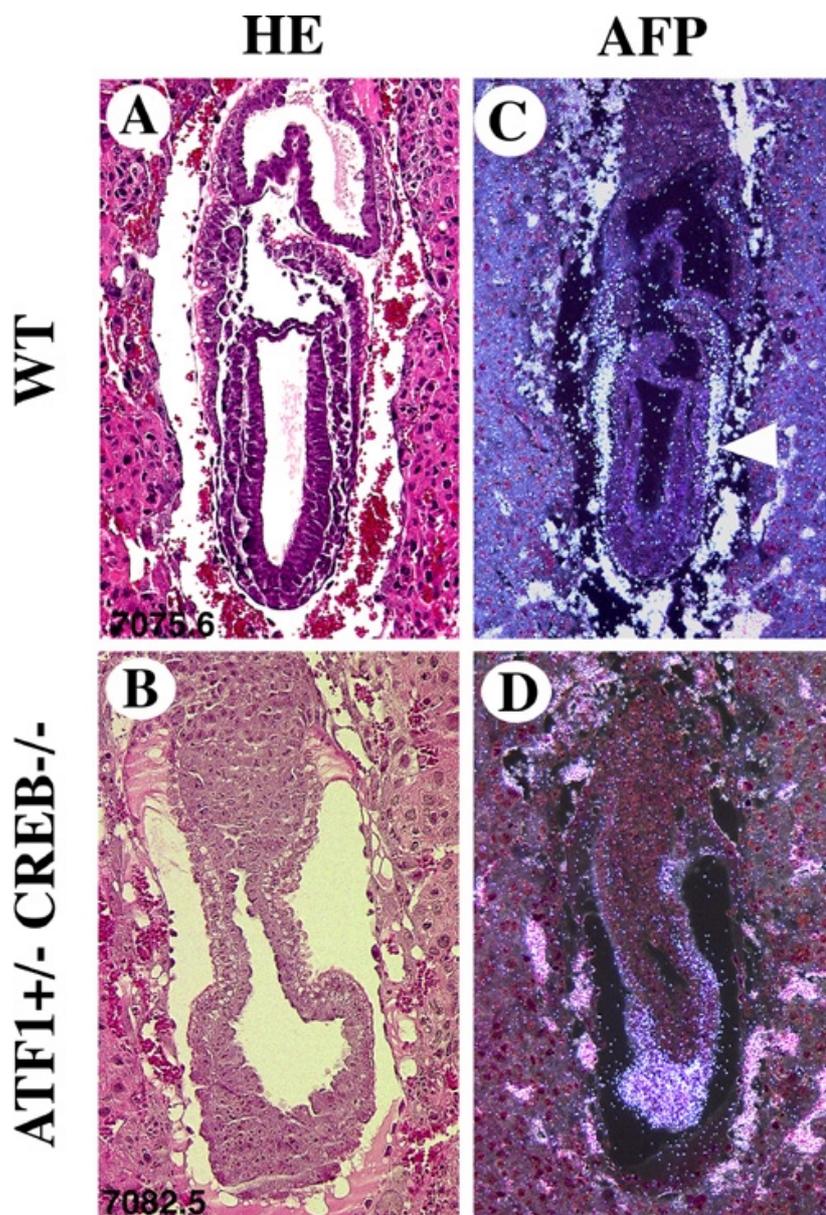


Abb. 15 Expression von alpha-Fetoprotein (AFP) in Wildtyp-Embryonen und Embryonen des Genotyps ATF1+/- CREB-/- am Tag E 7,5 p.c. (*in situ* Hybridisierung)

(A-B): HE-Färbung sagittaler Paraffinschnitte; (C-D): entsprechende Parallelschnitte nach *in situ* Hybridisierung; (C): AFP ist während der Gastrulation ein Marker für viszerales Entoderm und fehlt im definitiven Entoderm, das am distalen Bereich des Embryos anliegt. (D): Die Mutante weist einen sehr hohen Anteil viszeralem Entoderm auf, das in diesem Embryo in auffallend grosser Menge auch im distalen Bereich zu finden ist. WT: Wildtyp; HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung; (verwendete Vergrößerungen: A: 10x; B-C u. E-F: 16x; D: 8x)

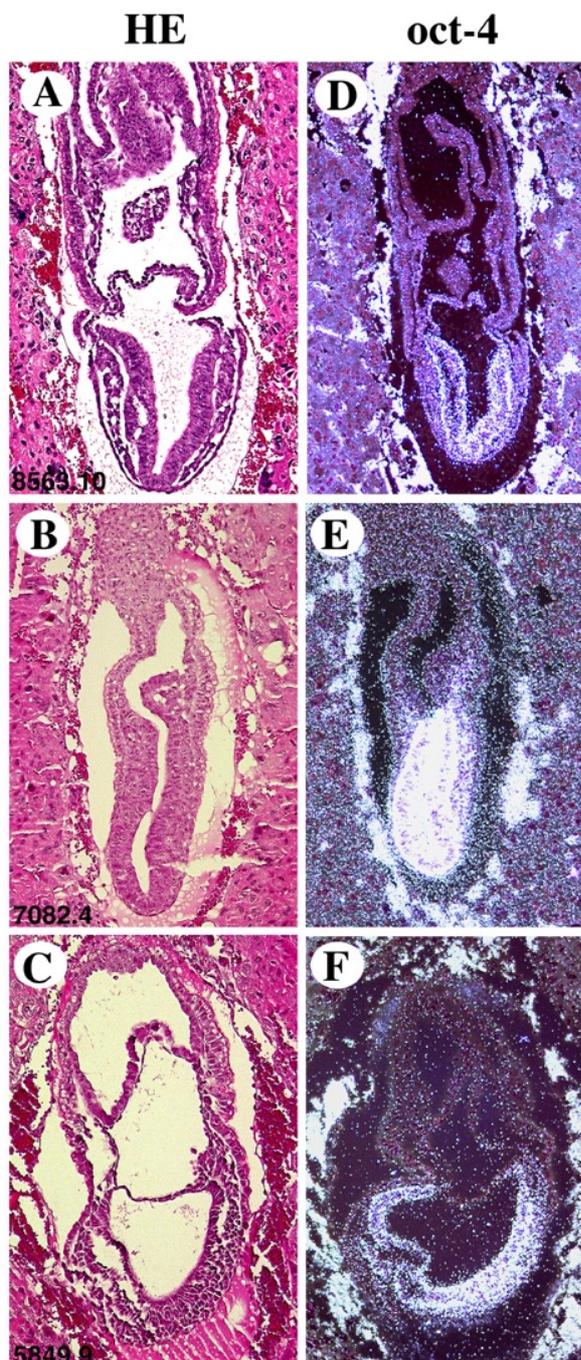


Abb. 16 Expression von oct-4 in Wildtyp-Embryonen am Tag E7,5 p.c.
(*in situ* Hybridisierung)

(A-C): HE-Färbung sagittaler bzw. frontaler (A) Paraffinschnitte; (D-E): entsprechende Parallelschnitte nach *in situ* Hybridisierung

(D, E u. F): oct-4 markiert vor und während der Gastrulation die pluripotente Stammzellen des Epiblasts. Die Anzahl der Stammzellen ist in der frühen Phase der Bildung des Primitivstreifens noch sehr hoch (E), verringert sich aber im Laufe der weiteren Differenzierung (F u. D). HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung (verwendete Vergrößerungen: A, B u. E: 12,5x; C, D u. F: 10x)

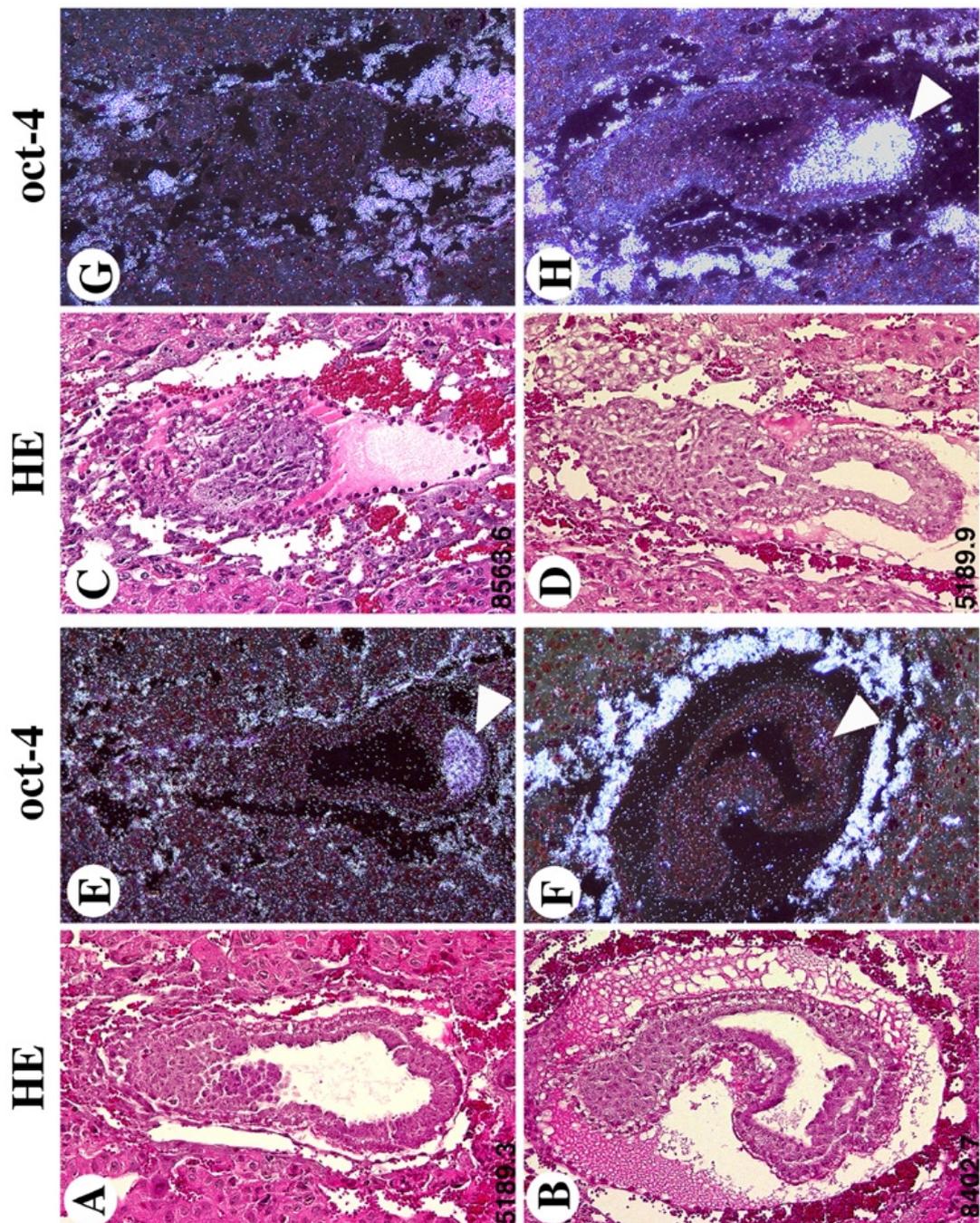


Abb. 17 Expression von *oct-4* in Embryonen des Genotyps *ATF1*^{+/-} *CREB*^{-/-} am Tag E 7,5 p.c. (*in situ* Hybridisierung)

(A-B u. C-D): HE-Färbung sagittaler Paraffinschnitte; (E-F u. G-H): entsprechende Parallelschnitte nach *in situ* Hybridisierung

(E-F u. G-H): Die Mutanten zeigen im Vergleich zu ihren Geschwistern keine oder zumindest eine geringere Anzahl *oct-4*-positiver Zellen, die auf einen kleinen, distalen Bereich des Embryos begrenzt sind und nicht die typische Form des Eizylinders nachbilden, wie es bei Wildtyp-Embryonen der Fall ist.

HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung; (verwendete Vergrößerung: 16x)

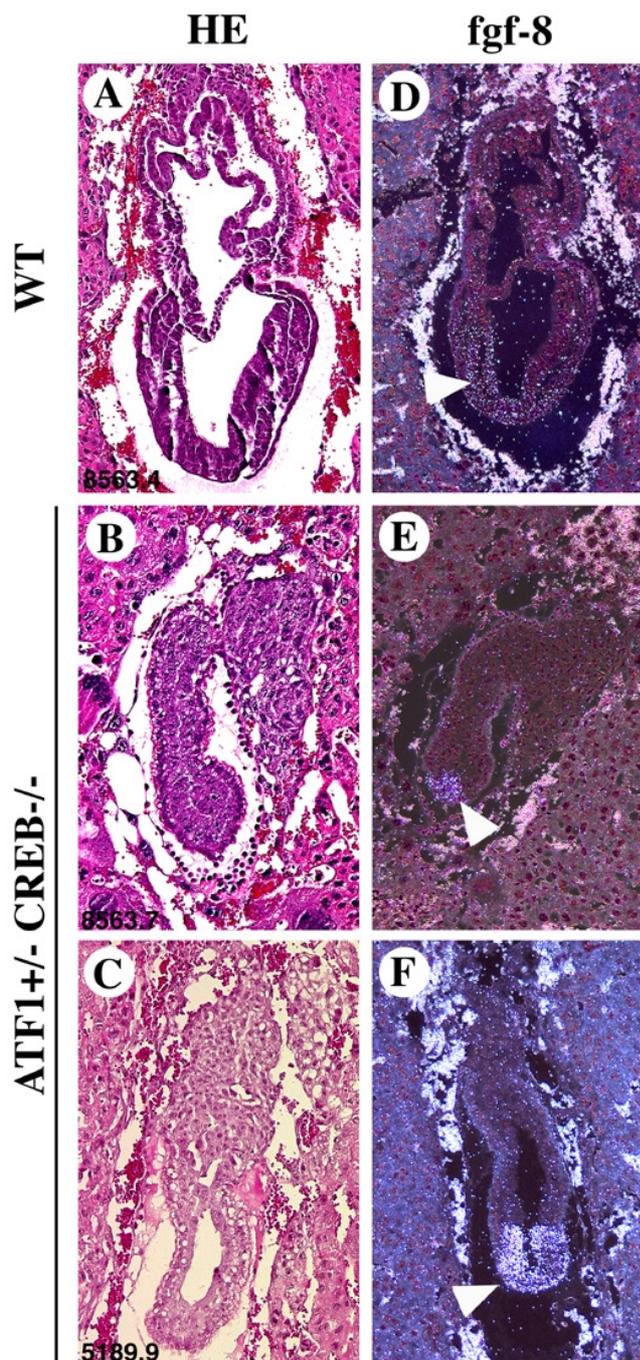


Abb. 18 Expression von *fgf-8* in Wildtyp-Embryonen und Embryonen des Genotyps *ATF1+/- CREB-/-* am Tag E 7,5 p.c. (*in situ* Hybridisierung)

(A-C): HE-Färbung sagittaler Paraffinschnitte; (D-F): entsprechende Parallelschnitte nach *in situ* Hybridisierung; (D): *Fgf-8* markiert während der Gastrulation posteriore Epiblastzellen kurz bevor sie in den Primitivstreifen einwandern. (E u. F): In den Mutanten zeigt sich starke Expression nur in einem beschränkten distalen Bereich des Zylinders. WT: Wildtyp; HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung; (verwendete Vergrößerungen: A u. D: 12,5x; B-C u. E-F: 16x)

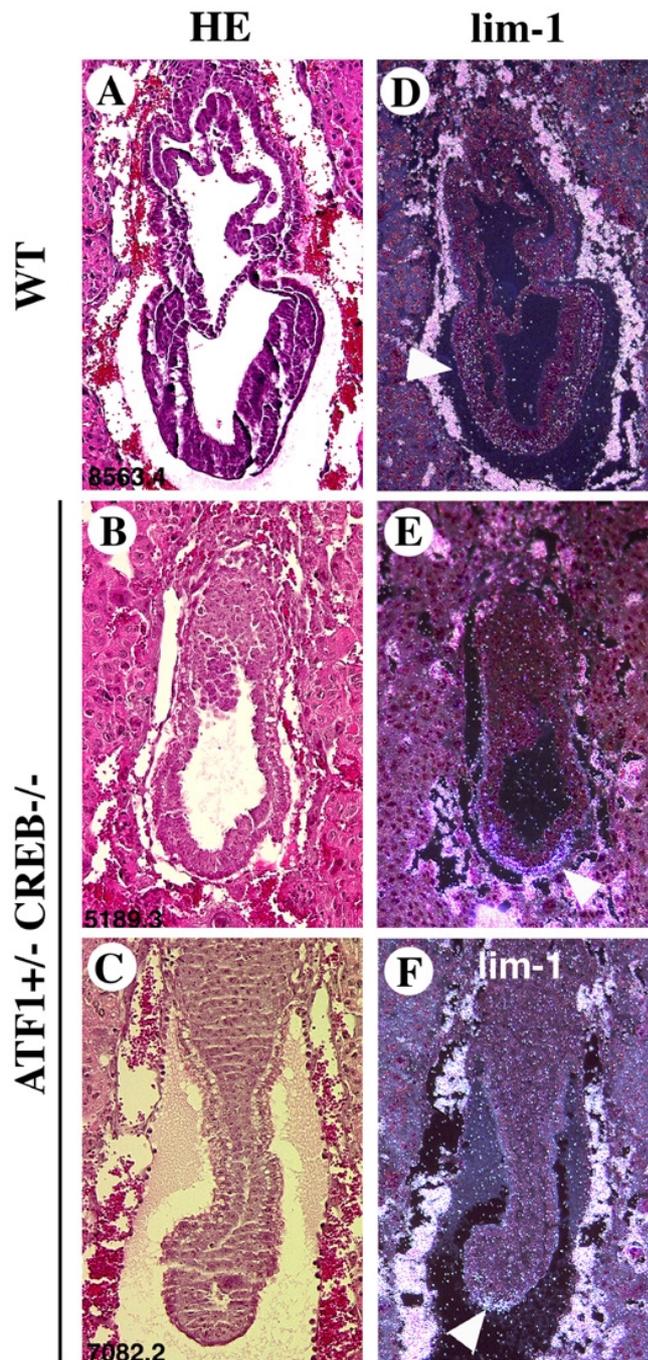


Abb. 19 Expression von *lim-1* in Wildtyp-Embryonen und Embryonen des Genotyps *ATF1+/- CREB-/-* am Tag E 7,5 p.c. (*in situ* Hybridisierung)

(A-C): HE-Färbung sagittaler bzw. frontaler (A) Paraffinschnitte; (D-F): entsprechende Parallelschnitte nach *in situ* Hybridisierung

(D): Die Expression von *lim-1* ändert sich während der Gastrulation. Zu Beginn findet man es im proximalen Epiblast, während es gegen Ende der Gastrulation im anterioren Mesentoderm nachzuweisen ist. (E u. F): *Lim-1* wird distal beschränkt in den Mutanten in Zellen exprimiert, die in der HE-Färbung morphologisch mit embryonalen Entodermzellen (B u. C) vergleichbar sind. Es handelt sich hierbei wohl um anteriores Mesentoderm. WT: Wildtyp; HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung; (verwendete Vergrößerungen: A u. D: 12,5x; B-C u. E-F: 16x)

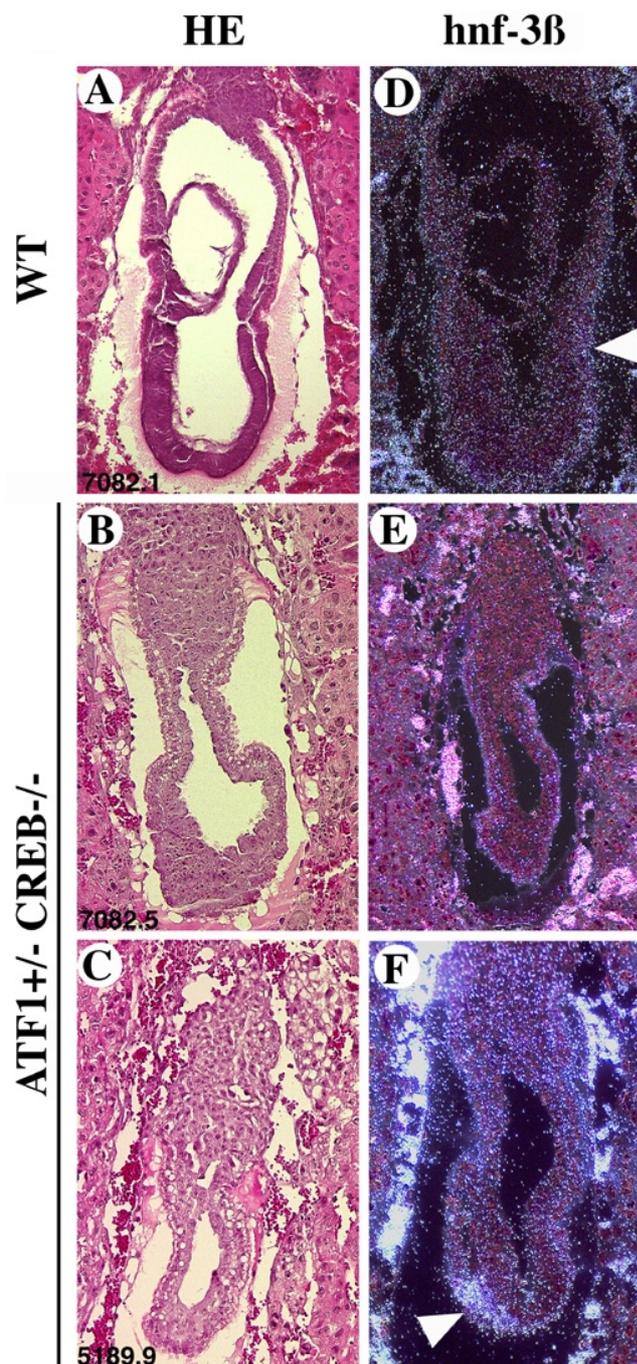


Abb. 20 Expression von *hnf-3β* in Wildtyp-Embryonen und Embryonen des Genotyps *ATF1+/- CREB-/-* am Tag E 7,5 p.c. (*in situ* Hybridisierung)

(A-C): HE-Färbung sagittaler Paraffinschnitte; (D-F): entsprechende Parallelschnitte nach *in situ* Hybridisierung

(D): Während der späten Gastrulation wird *hnf-3β* in anteriorem Mesentoderm exprimiert. (E-F): Die Mutanten zeigen keine konforme Expression, *hnf-3β* wird entweder gar nicht (E) oder fokussiert an einer Stelle exprimiert (F). WT: Wildtyp; HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung; (verwendete Vergrößerungen: A u. E: 10x; B u. F: 12,5x, andere: 16x)

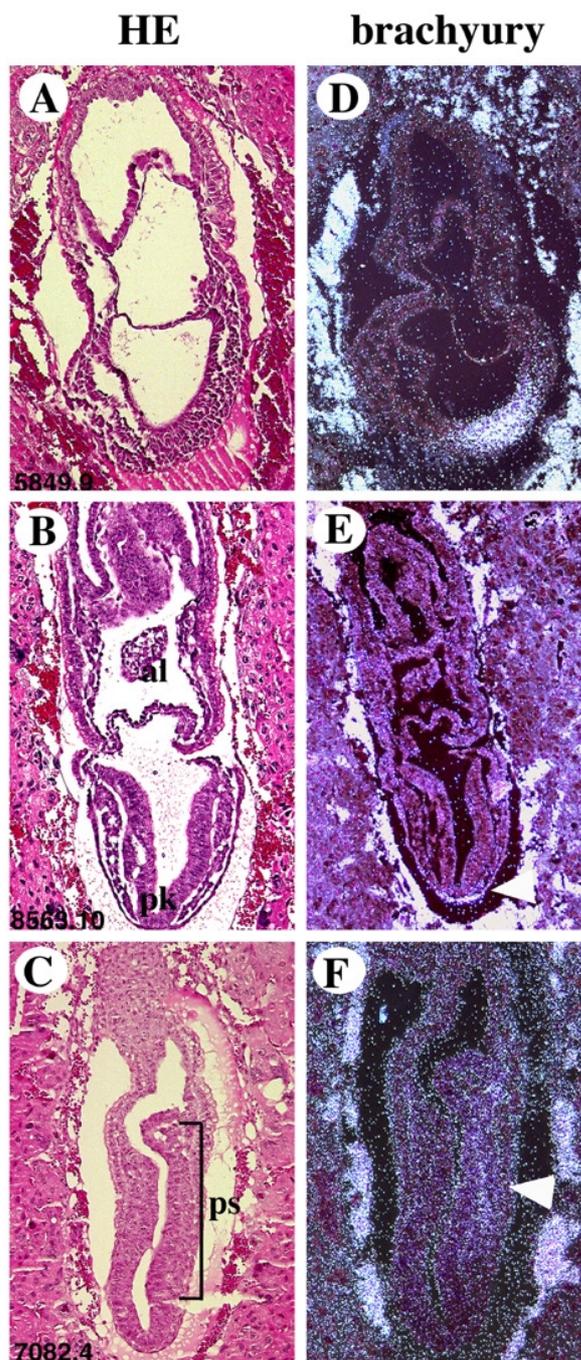


Abb. 21 Expression von brachyury (T) in Wildtyp-Embryonen am Tag E 7,5 p.c.
(*in situ* Hybridisierung)

(A-C): HE-Färbung sagittaler bzw. frontaler (B) Paraffinschnitte; (D-F): entsprechende Parallelschnitte nach *in situ* Hybridisierung

(C u. F): Brachyury wird zunächst in neugebildetem Mesoderm des frühen Primitivstreifens exprimiert. (D): Zu Beginn der Gastrulation beschränkt sich die Expression auf Epiblast- und Mesodermzellen des Primitivstreifens. (E): Im Stadium der Allantoisbildung befindet sich brachyury vorübergehend im Primitivknoten. HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung; al: Allantois; pk: Primitivknoten; ps: Primitivstreifen (verwendete Vergrößerungen: A, D u. E: 10x; B, C u. F: 12,5x)

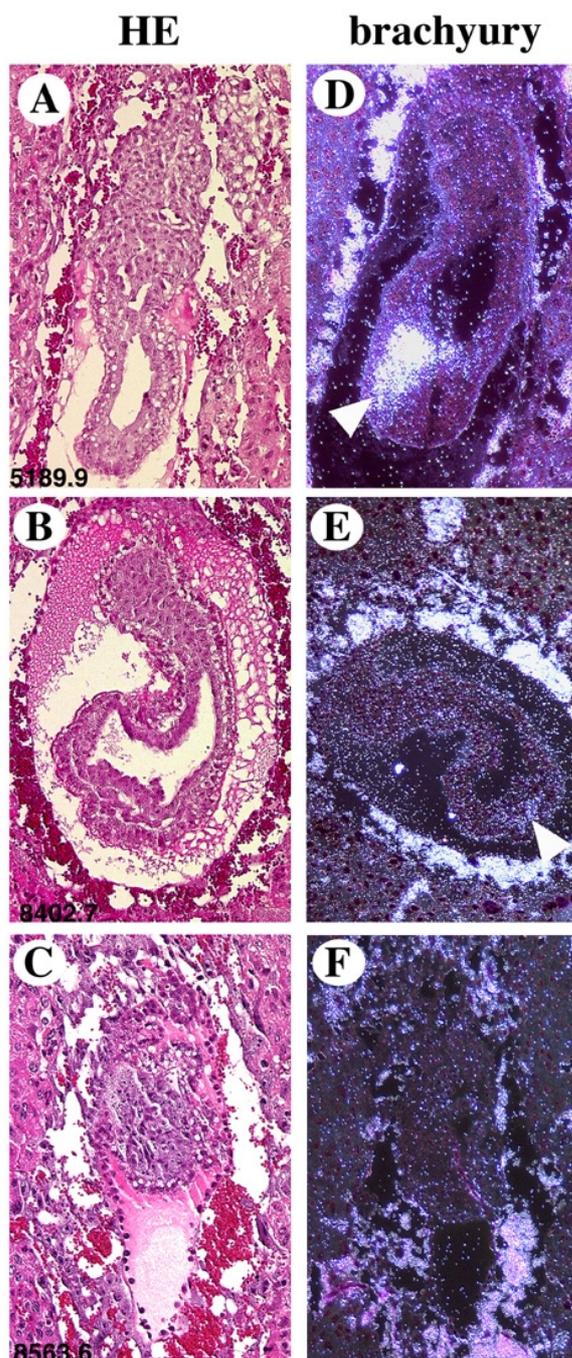


Abb. 22 Expression von brachyury (T) in Embryonen des Genotyps
ATF1^{+/-} CREB^{-/-} am Tag E 7,5 p.c. (*in situ* Hybridisierung)

(A-C): HE-Färbung sagittaler Paraffinschnitte; (D-F): entsprechende Parallelschnitte nach *in situ* Hybridisierung

(D): Starke brachyury Expression in einem lateralen Bereich des Embryos, jedoch nicht in Form eines Primitivstreifens. (E): Schwache brachyury Expression im distalen Bereich des Embryos. (F): Keine Expression von brachyury. Pfeil: Signal; HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung; (verwendete Vergrößerungen: A u. D: 20x; andere: 16x)

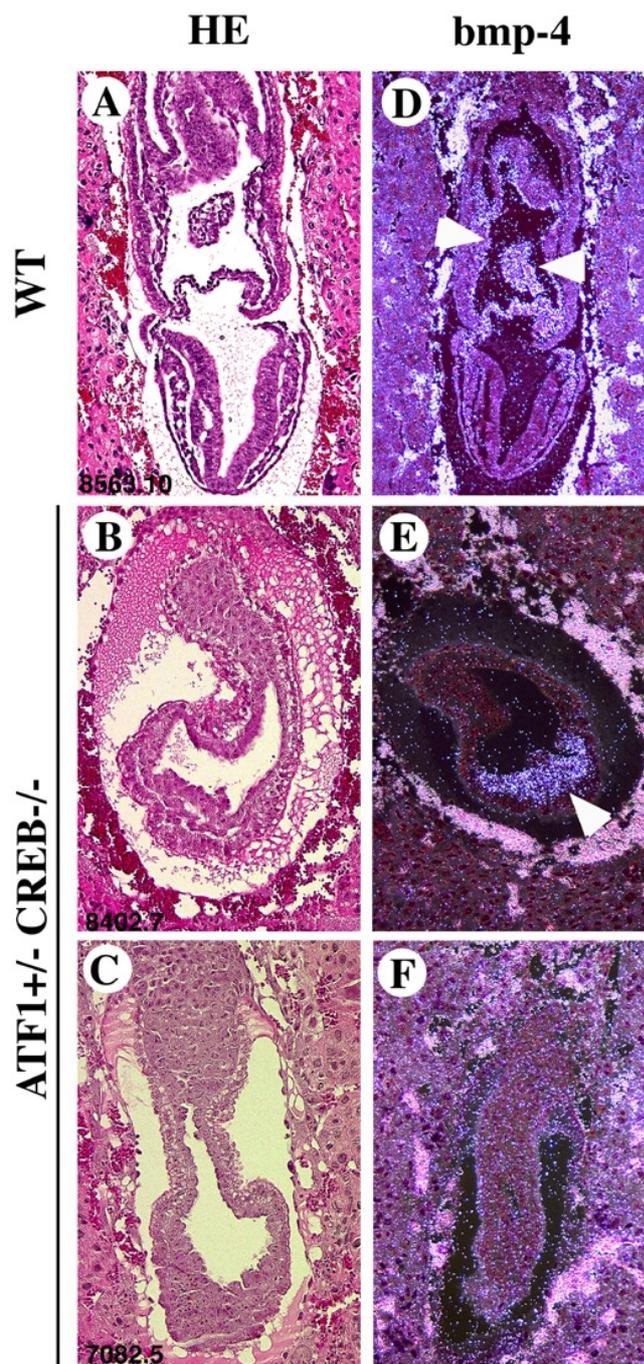


Abb. 23 Expression *bmp-4* in Wildtyp-Embryonen und Embryonen des Genotyps *ATF1+/- CREB-/-* am Tag E 7,5 p.c. (*in situ* Hybridisierung)

(A-C): HE-Färbung sagittaler bzw. frontaler (A) Paraffinschnitte; (D-F): entsprechende Parallelschnitte nach *in situ* Hybridisierung

(D): *Bmp-4* wird in Wildtyp-Embryonen in extraembryonalem Mesoderm, im mesodermalem Anteil des Amnions und in der Allantois exprimiert. (E u. F): In den Mutanten findet man oft kein Signal für *bmp-4* (F) oder es wird im distalen Ende des Embryos exprimiert (E; Pfeil). WT: Wildtyp; HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung; (verwendete Vergrößerungen: A: 12,5x; D: 10x; andere: 16x)

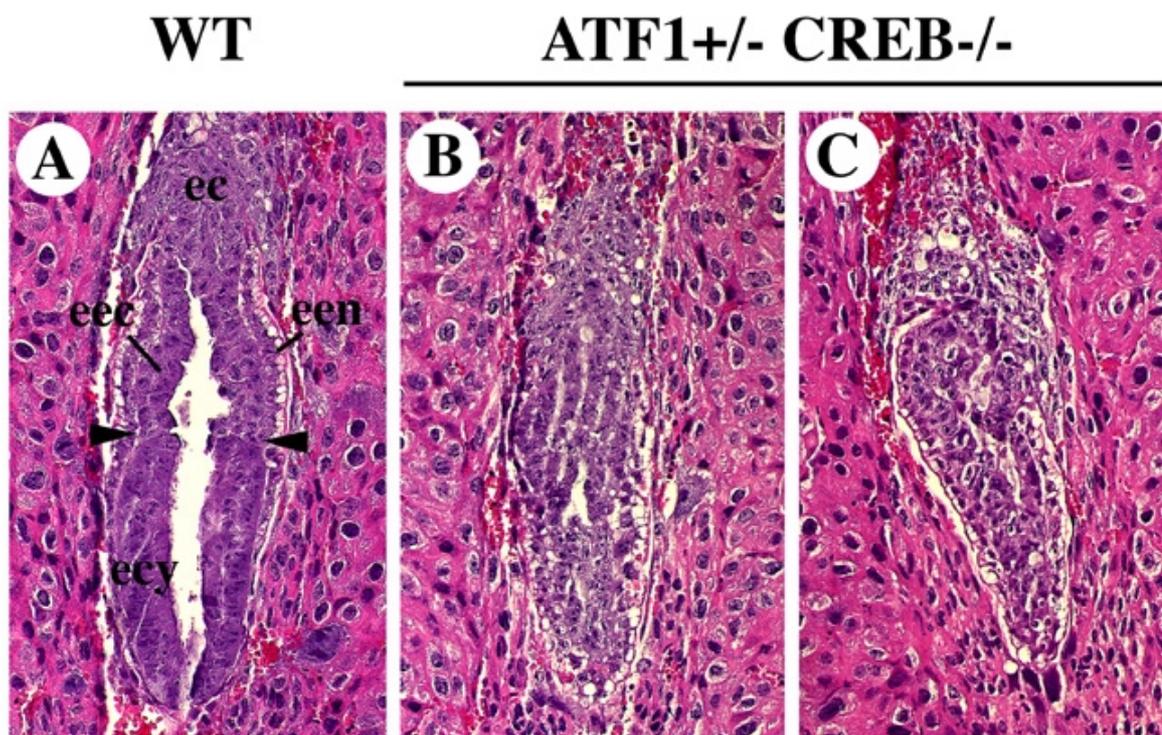


Abb. 24 Phänotyp von Embryonen des Genotyps ATF1+/- CREB-/- am Tag E 6,5 p.c.

(A-C): HE-Färbung sagittaler Paraffinschnitte

(A): Wildtyp-Embryo; (B-C): Mutanten lassen im Vergleich zum Wildtyp keine deutliche Untergliederung in extraembryonalen und embryonalen Bereich erkennen. Sie zeigen keinen für dieses Stadium typischen Eizylinder.

ec: Ektoplazenta; eec: extraembryonales Ektoderm; een: extraembryonales Entoderm; ecy: Eizylinder oder Epiblast; WT: Wildtyp; HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung

(verwendete Vergrößerungen: A-C: 20x)

2.3.3 Phänotyp von Embryonen des Genotyps ATF1+/- CREB-/- am Tag E 6,5 p.c.

Um die zellulären und molekularen Störungen, die zu diesem Phänotyp führen weiter zu beschreiben, wurde die Expression verschiedener Markergene auch im Stadium vor und zu Beginn der Gastrulation mittels *in situ* Hybridisierung untersucht. Zu diesem Zweck wurden ATF1+/- CREB-/- Embryonen am Tag E 6,5 p.c. isoliert, und eine Hämatoxylin/Eosin-Färbung der angefertigten Paraffinschnitte durchgeführt. Wie in Abb. 24 A zu sehen, zeigen Wildtyp-Embryonen zu diesem Zeitpunkt eine klare Unterteilung in einen extraembryonalen und einen embryonalen Abschnitt (Pfeile). Der extraembryonale Bereich läßt sich in extraembryonales Entoderm und extraembryonales Ektoderm untergliedern. Im embryonalen Bereich befindet sich der Epiblast mit seinen typisch säulenförmigen Zellen, der von einer

einzelligen Schicht primitiven Entoderms umgeben wird. Beide Bereiche umgeben die Amnionhöhle. Zu diesem Zeitpunkt unterscheiden sich die ATF1+/- CREB-/- Mutanten sehr stark von Wildtyp-Embryonen (Abb. 24 B-C). Der Größenunterschied ist relativ gering, jedoch läßt keiner der Embryonen eine klare Grenze zwischen extraembryonal und embryonal erkennen. Es gibt keinen uniform gebildeten Epiblasten, der die für den Eizylinder typische Zellform und -anordnung aufweist. Der ATF1+/- CREB-/- Embryo besteht eher aus einer losen Ansammlung weniger Zellen, die von einer Schicht viszeralen Entoderms umgeben ist. Die Mutanten bilden keine oder nur eine sehr kleine Amnionhöhle aus.

Die Markeranalyse zeigt wie am Tag E 7,5 p.c. kein einheitliches Bild. So wird oct-4 in den ATF1+/- CREB-/- Mutanten nur in einem kleinen Bereich oder gar nicht exprimiert (Abb. 25 B und E), dagegen wird oct-4 in einem normalen Embryo in den pluripotenten Stammzellen des gesamten Epiblast transkribiert (Abb. 25 H). Brachyury wird im Wildtyp wie erwartet am proximalen Ende des posterioren Epiblasts exprimiert, wo die Bildung des Primitivstreifens beginnt (Abb. 25 I). Die Mutanten dagegen zeigen kein Signal (Abb. 25 C und F). Im Wildtyp wird fgf-8 an der erwarteten Stelle, dem posterioren Epiblast, exprimiert (Abb. 26 F). Der ATF1+/- CREB-/- Embryo weist ein im Vergleich starkes Signal für fgf-8 auf (Abb. 26 C).

Hnf-3 β wird zu diesem Zeitpunkt weder im ATF1+/- CREB-/- Embryonen noch im Wildtyp exprimiert (Abb. 26 A und D). Im Gegensatz dazu kann AFP im viszeralen Entoderm sowohl in der Mutante als auch im normalen Embryo nachgewiesen werden (Abb. 26 B und E).

Insgesamt läßt sich festhalten, daß die Grundlagen für die Störung der Entwicklung in den ATF1+/- CREB-/- Mutanten schon sehr früh ihren Ursprung haben müssen. So scheinen ATF1+/- CREB-/- Embryonen schon vor der Implantation in den Uterus in der Entwicklung zurückgeblieben zu sein. Sie zeigen am Tag E 3,5 p.c. nicht den Phänotyp einer typischen , sondern ähneln in ihrem Aussehen eher den ATF1-/- CREB-/-Doppelmutanten (Abb. 9 D). Im Gegensatz zu diesen Embryonen können ATF1+/- CREB-/- Embryonen ihre Geschwister in der Entwicklung aufholen und implantieren. Vergleicht man allerdings die *in vitro*-Kulturen dieser Embryonen nach 4 Tagen mit denen der Wildtyp-Embryonen, so zeigen sie kein normales Differenzierungsverhalten. Die Kultur ist kleiner als die normaler Embryonen. Anstatt eines Zellkörpers, der später in primitives Ektoderm und Entoderm differenziert, findet man keine oder nur eine lose Anordnung von Zellen, die entfernt einem Zellkörper ähnelt (Abb. 9 I).

Die ATF+/- CREB-/- Embryonen zeigen somit vom Tag E 3,5 p.c. an eine verzögerte Entwicklung. Auffällig ist eine starke Reduktion oder völliges Fehlen der Embryoblastenzellen. Dieses Bild zeigt sich auch bis Tag E 6,5 p.c. Epiblastzellen sind in nur geringer Anzahl oder gar nicht vorhanden. Die Grundlage für den Phänotyp der

ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Mäuse und der embryonalen Sterblichkeit findet sich folglich schon im Präimplantationsstadium.

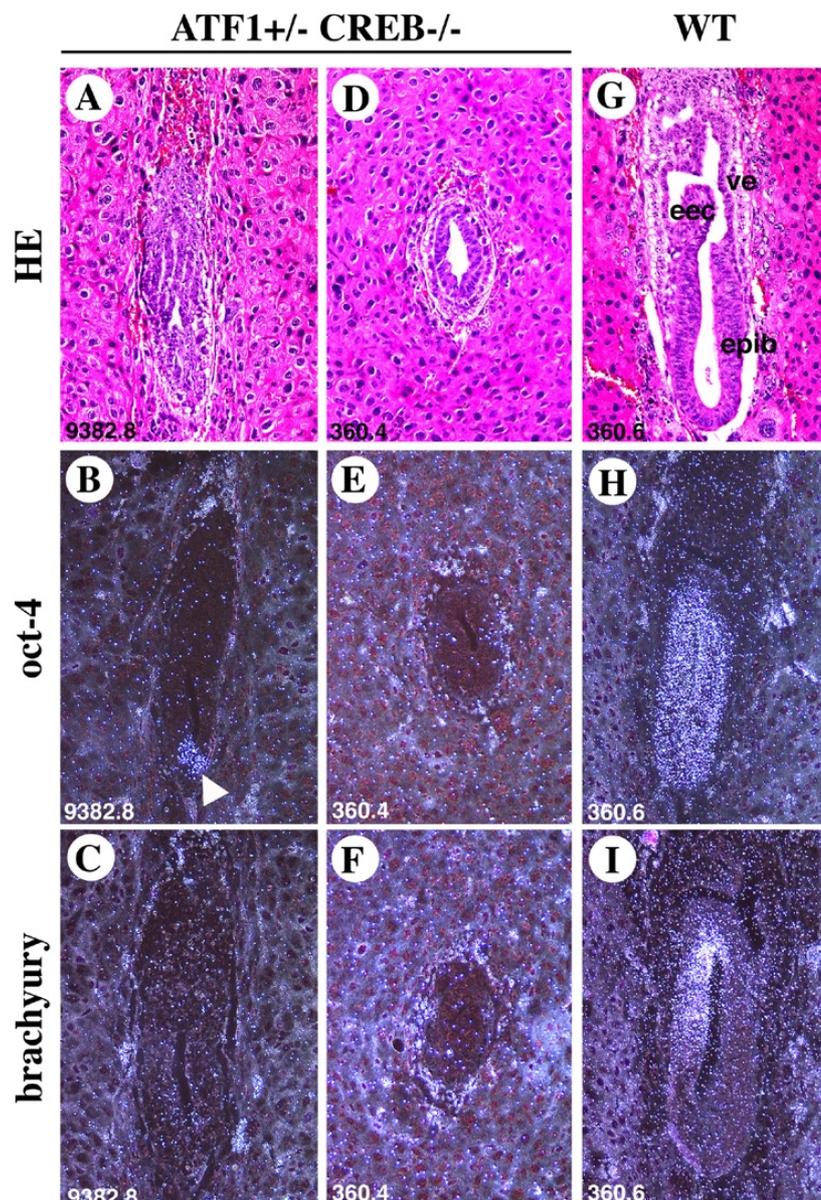


Abb.25 Expression von *oct-4* und *brachyury* (T) in Wildtyp-Embryonen und Embryonen des Genotyps *ATF1+/- CREB-/-* am Tag E 6,5 p.c. (*in situ* Hybridisierung)

(A, D u. G): HE-Färbung sagittaler Paraffinschnitte; (B-C, E-F u. H-I): entsprechende Parallelschnitte nach *in situ* Hybridisierung

(H): *oct-4* wird in allen Stammzellen des Wildtyp-Epiblast exprimiert. (B u. E): Die Mutanten zeigen keine (E) oder nur geringe Expression von *oct-4* im distalen Bereich des Eizylinders (B). (I): Im Wildtyp-Embryo zeigt sich *brachyury* Expression zu Beginn der Bildung des Primitivstreifens im proximalen, posterioren Epiblast. Die positiven Zellen sind determiniert, zu delaminieren und als Mesoderm zwischen Epiblast und primitives Entoderm zu wandern. (C u. F): In den Mutanten läßt sich zu diesem Zeitpunkt keine Expression von *brachyury* nachweisen. ve: viszerales Entoderm; eec: extraembryonales Ektoderm; epib: Epiblast; WT: Wildtyp; HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung (verwendete Vergrößerungen: C. 20x; andere 16x)

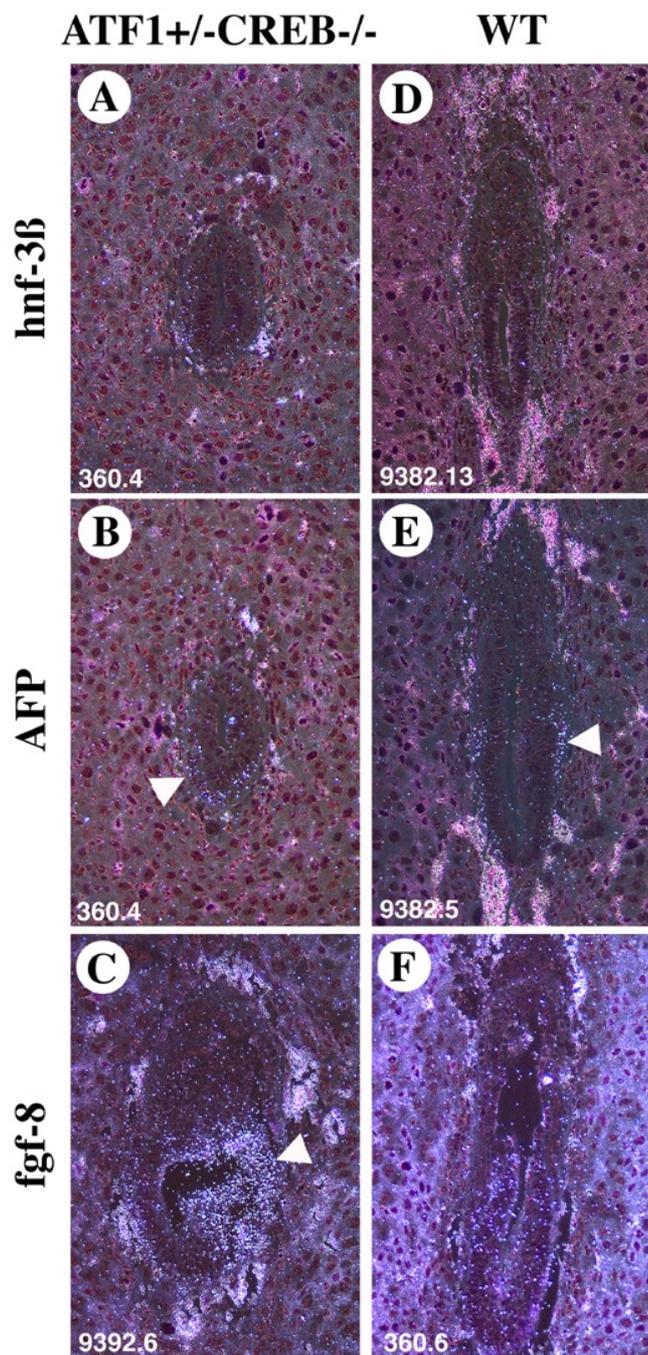


Abb. 26 Expression von $hnf-3\beta$, α -Fetoprotein (AFP) und $fgf-8$ in Wildtyp-Embryonen und Embryonen des Genotyps $ATF1^{+/-} CREB^{-/-}$ am Tag E 6,5 p.c. (*in situ* Hybridisierung)

(A-F): Paraffinschnitte nach *in situ* Hybridisierung

(A u. D): Zu diesem Zeitpunkt wird $hnf-3\beta$ weder im Wildtyp- noch im Mutanten-Embryo exprimiert.

(B u. E): α -Fetoprotein wird sowohl im viszeralem Entoderm des $ATF1^{+/-} CREB^{-/-}$ (B) als auch des Wildtyp-Embryos (E) transkribiert. (F): Der Wildtyp-Embryo zeigt sehr geringe Expression von $fgf-8$, das im posterioren Epiblast und extraembryonalen Ektoderm kurz vor der Primitivstreifenbildung erwartet wird. (C): Die Mutante weist eine für diesen Zeitpunkt sehr hohe Expression an $fgf-8$ auf (Pfeil). WT: Wildtyp (verwendete Vergrößerungen: A-C u. F: 16x; D u. E: 12,5x)

3. Diskussion

3.1 Bedeutung von CREB, ATF1 und CREM in der Keimzellentwicklung

Die Expression von CREB und CREM ist in der Keimzellentwicklung sehr genauen Regulationsmechanismen unterworfen. Spermatogenese und Oogenese werden durch das von der Hypophyse ausgeschüttete follikelstimulierende Hormon (FSH) und durch das luteinisierende Hormon (LH) kontrolliert (Means et Huckins). FSH bewirkt zusammen mit Testosteron eine Stimulation der Sertoli-Zellen, die wiederum die für die Keimzellendifferenzierung nötigen Komponenten sezernieren (Griswold). Es wird angenommen, daß die Bindung von FSH an seine Rezeptoren einen Anstieg von cAMP hervorruft und dadurch die Phosphorylierung von CREB induziert. Der Promotor von CREB besitzt im Gegensatz zum P1-Promotor von CREM CRE-Bindungsstellen. Das bedeutet, daß die Expression von CREB in Hoden nicht nur basal, sondern auch durch cAMP zu induzieren ist (Walker et al.), und CREB sich in den Sertoli-Zellen autoregulierte. Diese Autoregulation verursacht während des Spermatogenesezyklus eine stadiumspezifische Oszillation der Konzentration von mRNA, die CREB kodiert. Unter der Wirkung von FSH und Testosteron setzt in der Pubertät die Spermatogenese ein, wodurch es zu einer gravierenden Veränderung der Expression von CREM kommt. Werden während der vorpubertären Entwicklung hauptsächlich die Repressor-Isoformen gebildet, so findet sich nach Einsetzen der Spermatogenese in postmeiotischen runden Spermatiden vorwiegend der Aktivator CREM τ (Foulkes et al.).

Diese Expressionsmuster spiegeln sich in den durchgeführten Antikörperfärbungen wider. CREB ist in adultem Hoden, nicht in den Sertoli-Zellen aller Samenkanälchen anzutreffen. Dies spricht für ein oszillatorisches Auftreten von CREB in Abhängigkeit des Spermatogenesestadiums der Samenkanälchen.

Das gegen CREM gerichtete Antiserum detektiert auch Repressor-Isoformen. Die Expression von CREM ist in den runden Spermatiden deutlich erkennbar, deren Anzahl in den einzelnen Samenkanälchen variiert, je nachdem in welcher Phase der Spermatogenese sich diese befinden.

In adultem Hoden wird ATF1 in den primären Spermatozyten exprimiert, die sich im pachytänen Stadium befinden. Während der Embryonalentwicklung dagegen wird ATF1 nicht in Keimzellen exprimiert.

Im Vergleich zu anderen adulten Geweben ist das Signal für ATF1 in Hoden am stärksten. In Mäusen ohne funktionelles ATF1 deutet allerdings nichts auf eine wichtige Funktion des Proteins in Keimzellen hin. Die Hoden der Tiere zeigen keine morphologischen oder

histologischen Veränderungen. Die Mäuse sind fertil und zeigen normales Paarungsverhalten. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Funktion wäre, daß es in den ATF1^{-/-} Mäusen zur Kompensation durch eine Repressor-Form des CREM-Proteins oder andere, noch unbekannte Proteine kommt.

Vergleicht man mittels immunohistochemischer Methoden die Expressionsmuster der CREB/ATF-Proteine in Hoden mit denen des Ovars, so finden sich zumindest während der Embryonalentwicklung auffallende Parallelen. Am Tag E 14,5 p.c. ist auch hier die Expression von ATF1 vernachlässigbar, während man CREM in Keimzellen und CREB vorwiegend in mesenchymalen Zellen findet. Nach der Geburt läßt sich CREB hauptsächlich in den Follikelepithelzellen nachweisen. Follikelepithelzellen und Sertoli-Zellen entstehen aus gemeinsamen Vorläufern. Dies könnte bedeuten, daß CREB in Ovar und in Hoden eine ähnliche Funktion zukommt. Das Ausschalten von funktionellem CREB gibt allerdings aufgrund der perinatalen Sterblichkeit der Mäuse keinerlei Aufschluß über die Bedeutung von CREB in der Keimzellreifung.

Die Hypophysenhormone FSH und LH (Gonadotropine) kontrollieren im Ovar Vorgänge wie Follikelwachstum, Oozytenentwicklung, Ovulation und Bildung des Corpus luteums. Auch hier scheinen Transkriptionsregulatoren der CREB/ATF-Familie eine Rolle zu spielen (Moley et Schreiber). Nach Stimulation von Follikelepithelzellen aus Rattenovarien durch Gonadotropine trat vermehrt phosphoryliertes CREB auf (Mukherjee et al.). Dies zeigt, daß CREB schnell und transient durch Gonadotropine aktiviert werden kann und wahrscheinlich eine wichtige Funktion in der Transkriptionskontrolle vieler Gene hat, die durch Gonadotropine reguliert werden. Mehr Aufschluß über die Bedeutung von CREB in der Keimzellentwicklung würde die Ausschaltung der Proteinfunktion spezifisch in Hoden, beziehungsweise Ovar geben.

Ein Zielgen, dessen Expression im Ovar von CREB und CREM reguliert wird, ist Inhibin. CREB scheint in Follikelepithelzellen an der Aktivierung von Inhibin durch FSH beteiligt zu sein, wohingegen ICER eine Reprimierung kurz vor der Ovulation aufgrund von Stimulation durch LH bewirkt (Pei et al.; Mukherjee et al.). In diesem Fall taucht CREM nur zyklisch in den Follikelepithelzellen der adulten Maus auf und läßt sich in diesen Zellen in der pubertären Maus nicht nachweisen. Da die in Ovar gezeigte Färbung keine Kernfärbung ist, und die Signalintensität im Vergleich mit anderen positiven Färbungen sehr gering ist, handelt es sich wahrscheinlich um unspezifische Hintergrund-Färbung.

Bei der starken Expression von ATF1 im Zytoplasma der Oozyten könnte es sich um eine noch unbekannte Isoform des ATF1-Proteins, die keine Kernlokalisationssequenz enthält handeln. Eine andere Erklärung der ungewöhnlichen Lokalisation wäre, daß ATF1 durch einen anderen Faktor im Zytoplasma zurückgehalten wird. Wie schon in Hoden scheint ATF1 auch im Ovar keine essentielle Funktion zu übernehmen, da auch die weiblichen Tiere ohne funktionelles ATF1 keine Auffälligkeiten zeigen.

3.2 ATF1/CREB-Heterodimere und CREM spielen keine wesentliche Rolle in der frühen Embryonalentwicklung

Die immunohistochemischen Untersuchungen an frühen Embryonalstadien (E 3,5-7,5p.c.) zeigen, daß CREB und ATF1 in dieser Phase stark exprimiert werden. ATF1-Protein findet man sowohl in allen embryonalen als auch extraembryonalen Zellen des sich entwickelnden Embryos. CREB dagegen läßt sich interessanterweise schon ab dem Blastozysten-Stadium ausschließlich im Embryoblasten, später im Epiblasten und den daraus resultierenden Derivaten nachweisen. Das bedeutet auf molekularer Ebene, daß in allen embryonalen Zellen, im Ektoderm des Amnions und in Zellen des extraembryonalen Mesoderms ATF1- und CREB-Homodimere sowie ATF1/CREB-Heterodimere zu erwarten sind. In der Ekto-plazenta, dem viszeralen Entoderm und dem extraembryonalen Ektoderm treten demnach nur ATF1-Homodimere auf, da dort kein CREB-Protein nachgewiesen wurde. Bei den CREB-Isoformen, die nicht mit dem verwendeten Antiserum detektierbar sind, handelt es sich um Spleißvarianten, die keine Dimerisierungsdomäne besitzen und somit auch nicht mit ATF1 interagieren können.

Das Zusammenspiel der Homo- und Heterodimere von CREB und ATF1 scheint je nach Zelltyp verschieden zu sein. Das beruht wohl auf Unterschieden zwischen den beiden Proteinen. Zum einen binden CREB und ATF1 mit unterschiedlicher Affinitäten an die Bindungsstelle, zum anderen zeigen sie unterschiedliches Transaktivierungsverhalten (Hurst et al.).

Embryonale F9 Karzinom-Zellen zeigen nur in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsstatus eine cAMP-Antwort. Undifferenzierte F9-Zellen sind für cAMP insensitive, obwohl CREB-Protein und Proteinkinase A nachweisbar sind. Nach Differenzierung zu Entoderm-ähnlichen Zellen werden sie cAMP-sensitiv. Eine mögliche Erklärung hierfür findet man in unterschiedlichem Proteingehalt. In undifferenzierten F9-Zellen ist sehr viel ATF1-Protein vorhanden (Masson et al.), allerdings verringert sich mit fortschreitender Differenzierung der Gehalt an ATF1-Protein. Dies resultiert in einer drastischen Veränderung der Dimerpopulation. In undifferenzierten F9-Zellen findet man vorwiegend ATF1/CREB-Heterodimere und ATF1-Homodimere, während man in differenzierten F9-Zellen hauptsächlich CREB-Homodimere und kaum noch Heterodimere antrifft. Es wird davon ausgegangen, daß Veränderungen in den Proteinkonzentrationen von ATF1 und CREB direkte Konsequenzen haben. Das Transaktivierungspotential von CREB könnte direkt durch ATF1 beeinflusst werden oder eine Folge dessen sein, daß CREB-Homodimere und ATF1/CREB-Heterodimere an unterschiedliche Promotoren binden. ATF1/CREB-Heterodimere binden mit einer geringeren Affinität an DNA als CREB-Homodimere (Hurst et al.). Es wird davon ausgegangen, daß ATF1/CREB-Heterodimere relativ schwache Aktivatoren sind und somit die cAMP-Antwort durch Konkurrenz mit CREB-Homodimeren in undifferenzierten F9-Zellen verhindern (Masson et al.; Ellis et al.).

In der frühen Embryonalentwicklung spielen ATF1/CREB-Heterodimere trotz einer großen Menge an ATF1-Protein wohl eher eine geringe Rolle. ATF1 und CREB werden zwar kolokalisiert im Epiblast und den daraus entstehenden Geweben exprimiert, jedoch durchlaufen CREB_{null}- und ATF1^{-/-} Embryonen eine normale Entwicklung. Phänotypisch lassen sie sich nicht von Wildtyp-Geschwistern unterscheiden. Die Ergebnisse zeigen, daß ATF1^{-/-} und CREB^{-/-} Embryonen am Tag E 3,5 p.c. eine normale Blastozyste bilden, die auch in *in vitro*-Kultur ein normales Differenzierungsverhalten zeigt. Auch am Tag E 9,5 p.c. unterscheiden sie sich weder in Größe noch Morphologie von Wildtyp-Embryonen. ATF1- bzw. CREB-Homodimere scheinen das Fehlen der Funktion des jeweils anderen Proteins zumindest in diesem Zeitraum kompensieren zu können. Das Fehlen von ATF1/CREB-Heterodimeren hat somit keinen Einfluß auf die frühe Embryonalentwicklung. Der Phänotyp der Doppelmutanten und der ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Mäuse läßt sich demnach nicht mit einem Fehlen von ATF1/CREB-Heterodimeren begründen.

CREM wurde in den untersuchten Embryonalstadien nicht exprimiert. Dieses Ergebnisse und die Tatsache, daß sich CREM^{-/-} Mäuse pränatal normal entwickeln, schließt eine Rolle für CREM in der frühen Embryonalentwicklung aus.

3.3 Kompensatorische Effekte von CREB und ATF1

Durch eine Serie von Zellteilungen wird das Zytoplasma der Zygote sukzessive in kleinere Blastomere unterteilt. Nach einer bestimmten Anzahl von Teilungen verändert sich die Form der Blastomere, so daß der interzelluläre Kontakt maximiert wird. Der Embryo kompaktiert und formt eine Morula. Daraus bildet sich durch Abscheidung von Flüssigkeit in das Blastozoele eine Blastozyste. Im 8-Zell-Stadium findet in der Maus die Kompaktierung statt (Ducibella et Anderson). Die Blastozystenbildung fällt mit dem Ende der fünften Teilung im 32-Zell-Stadium zusammen (Smith et McLaren). Während dieses Zeitraums ist die G1-Phase des Zellzyklus, in der normalerweise Wachstum stattfindet, sehr kurz (Bolton et al) oder gar nicht vorhanden (Gamow et Prescott; Mukherjee). Es ändern sich weder das Volumen des Zytoplasmas noch der Proteingehalt (Sellens et al.).

Vergleicht man Phänotyp und Zellkernfärbung von Wildtyp- und ATF1^{-/-} CREB^{-/-} Embryonen am Tag E 3,5 p.c., so befinden sich die Doppelmutanten im Morulastadium und setzen sich aus der Hälfte der Anzahl an Blastomeren zusammen, aus denen ein Wildtyp-Embryo gebildet wird. Ob tatsächlich eine Kompaktierung stattgefunden hat, läßt sich nicht eindeutig feststellen. Allerdings kann man die Zona pelluzida entfernen, ohne daß der Embryo in einzelne Blastomere zerfällt.

Da der ATF1^{-/-} CREB^{-/-} Embryo sich auch in *in vitro*-Kulturen nicht weiter entwickelt, kann davon ausgegangen werden, daß es sich hierbei nicht um eine Verzögerung in der Entwicklung, sondern eher um einen Stop der Zellteilung handelt. Maternale CREB/ATF-

Proteine, die die Funktion von embryonalem CREB und ATF1 übernehmen könnten, sind offensichtlich nicht mehr oder zumindest nicht ausreichend vorhanden. CREB und ATF1 sind also schon im Präimplantationsstadium wichtig für den Embryo. Die Analysen der ATF1^{-/-} und CREB^{-/-} Mäuse sowie die Kolo-kalisation der beiden Proteine im Epiblast und den sich daraus entwickelnden Geweben machen deutlich, daß sowohl CREB als auch ATF1 das Fehlen des anderen kompensieren kann und für eine normale, frühe Embryonalentwicklung ausreichen. Die Kompensation der Funktion von CREB durch ATF1 findet jedoch mit Einschränkung statt. In ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen reicht ein gesundes Allel von ATF1 zwar dafür aus, das Präimplantationsstadium zu überwinden, doch zeigen diese Embryonen starke Entwicklungsdefekte und sind embryonal letal. Die ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Mutanten entwickeln entweder gar keine oder nur eine geringe Anzahl an primitive Ektodermzellen. Der Embryo selber ist stark deformiert. Es lassen sich am Tag E 9,5 p.c. keine Strukturen wie Kopf, Körper oder Schwanz erkennen, und er ist in der Entwicklung zurückgeblieben, was sich dadurch zeigt, daß keine Inversion der Keimblätter stattgefunden hat. Das bedeutet, daß ein gesundes Allel von ATF1 nicht für eine normale Embryonalentwicklung ausreicht, wenn kein funktionelles CREB gebildet werden kann. Die Kompensation von CREB durch ATF1 muß somit dosisabhängig sein.

3.4 Gestörte Proliferation in Mutanten des Genotyps ATF1^{+/-} CREB^{-/-}

ATF^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen zeigen in *in vitro*-Kultur ab Tag 3,5 p.c. ein gestörtes Wachstum, haben Defekte in der Gastrulation und sind embryonal letal.

Vor Implantation in den Uterus befinden sich die Mutanten im Gegensatz zu Wildtyp-Embryonen nicht im Blastozysten- sondern noch im Morulastadium. Kultiviert man sie *in vitro*, so entwickeln sich keine oder nur eine geringe Anzahl an Embryoblastzellen. Diese formen im Vergleich zu Wildtyp einen kleineren Zellkörper, dessen Zellen potentiell den Embryo bilden können. Entsteht ein Zellkörper, so ist er weniger kompakt und die Embryoblastzellen liegen teilweise einzeln oder in kleineren Aggregaten über der Trophoblastenschicht verteilt.

Am Tag E 6,5 p.c., nach Implantation des Embryos, zeigen die ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Mutanten keine klare Gliederung in Epiblast und extraembryonalen Teil. Die hauptsächlichen Strukturen dieser Embryonen sind viszerales Entoderm und extraembryonales Ektoderm. Der Epiblast, dessen Zylinderform sich in Wildtyp-Embryonen leicht durch oct-4 Expression nachweisen läßt, findet sich in den Mutanten gar nicht oder nur als kleiner Zellhaufen am distalen Ende. Somit besteht der Epiblast der ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen aus einer geringen Anzahl von Zellen, die nicht in der Lage sind, einen Eizylinder zu bilden. Das

zeigt, daß sich die primitiven Ektodermzellen innerhalb dieses Zeitraums nicht in dem Maße vermehrt haben, wie das in Wildtyp-Embryonen der Fall ist.

Am Tag E 7,5 p.c. sind die Mutanten etwas größer, allerdings hat sich hauptsächlich die Größe des extraembryonalen Bereichs verändert. Die Anzahl der Epiblastzellen dagegen scheint sich nicht sehr stark vermehrt zu haben.

Die pluripotenten Stammzellen, die durch Expression von oct-4 nachgewiesen werden, finden sich in den ATF[±]- CREB^{-/-} Embryonen auch jetzt am distalen Ende. Innerhalb dieses Zellhaufens gibt es keinen Hinweis auf eine anterior-posteriore oder proximal-distale Achseneinteilung. Dennoch findet Gastrulation statt, allerdings ohne Bildung eines Primitivstreifens. Die Expression von fgf-8 und brachyury markieren embryonales Mesoderm und Epiblastzellen, die determiniert sind, Mesoderm zu bilden. Mit Hilfe von bmp-4 läßt sich extraembryonales Mesoderm nachweisen. Keine dieser positiven Zellen in den ATF1[±]- CREB^{-/-} Mutanten bilden Strukturen wie beispielsweise Primitivstreifen, Amnion, Chorion oder Allantois, die mittels dieser Marker in Wildtyp-Embryonen nachgewiesen werden können.

Proliferation ist ein elementarer Prozess, der an der Ausbildung der Keimblätter beteiligt ist. Die Zellteilungsrate des Epiblasts reicht theoretisch aus, um das gesamte embryonale Gewebe zu bilden, das während der Gastrulation entsteht (Snow; Poelmann; MacAuley et al.).

Das wenig pluripotente embryonale Gewebe in ATF1[±]- CREB^{-/-} Embryonen scheint nicht sehr stark zu proliferieren, sondern differenziert direkt in verschiedene Zelltypen. Gastrulation findet demnach nicht in der Form statt, daß Mesodermzellen als Primitivstreifen zwischen Epiblast und primitivem Entoderm einwandern. Die Ursache hierfür könnte in einer fehlenden Menge von Epiblastzellen liegen. Trotzdem werden Zelltypen aller drei Keimblätter gebildet. Dies zeigt sich in den 9,5 Tage p.c. alten ATF1[±]- CREB^{-/-} Embryonen. Dort findet man Zellen, die morphologisch Ektoderm, Mesoderm und Entoderm entsprechen. Jedoch scheint die Zellzahl nicht auszureichen, spezifische Strukturen wie Kopf, Körper und Schwanz zu bilden. Mutanten mit Anteil an embryonalem Gewebe entsprechen in ihrer Entwicklung eher denen jüngerer Embryonen. Dies kommt dadurch zum Ausdruck, daß keine Inversion der Keimblätter stattgefunden hat. Das noch aussen liegende Entoderm läßt darauf schließen, daß die ATF1[±]- CREB^{-/-} Embryonen sich nicht um ihre Körperachse gedreht und somit eher den Status eines Embryos vom Tag E 7,5-8 p.c. haben.

Eine verringerte Zellzahl im Blastozystenstadium, eine verspätete Implantation, keine starke Zellvermehrung während der Gastrulation und eine zurückgebliebene Entwicklung deuten auf einen Proliferationsdefekt hin. Es scheint sich nicht um einen kompletten Zellteilungsstopp zu handeln, sondern eher um eine verzögerte Proliferation, da noch Zellteilung stattfindet. Diese Erklärung wird auch durch die positive BrdU- und cdk2-Färbung am Tag E 9,5 p.c. gestützt. Quantitativ läßt sich diese Färbung nicht mit der eines

Wildtyp-Embryos vergleichen, da sich die Embryonen zu stark in Zellzahl und Entwicklungsstadium unterscheiden.

Die Tatsache, daß es in ATF1^{-/-} CREB^{-/-} Doppelmutanten zu einem Stop der Entwicklung kommt, und ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen gar keine oder nur eine geringe Anzahl an primitiven Ektodermzellen bilden, deutet darauf hin, daß die CREB/ATF-Proteinfamilie in proliferative Prozesse der frühen Entwicklung involviert ist.

3.5 CREB und ATF1 als Regulatoren des Zellzyklus

Der Zellzyklus ist an eine phasenabhängigen Transkription bestimmter Gene gekoppelt, die für spezifische metabolische und regulatorische Vorgänge während der jeweiligen Zellzyklusphasen nötig sind. Für die Induktion dieser Gene sind verschiedene Transkriptionsfaktoren zuständig, die selbst während des Zellzyklus differentiell reguliert werden. Zwei Transkriptionsfaktoren, die im Übergang von der G1- zur S-Phase eine Rolle spielen, scheinen ATF1 und CREB zu sein. Während der Transition von G1 nach S werden sukzessive Cycline der G1-Phase induziert, die Cyclin-abhängige Kinasen (cdks) aktivieren. Cyclin A assoziiert mit Cdk2 in der S-Phase des Zellzyklus und wird für die DNA-Replikation benötigt (Girard et al., Pagano et al.). Der Promotor von Cyclin A enthält neben fünf CRE-Bindungsstellen vier DNA-Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktor SP1 und eine für das ATF1-Protein (Brindle et Montminy, Ziff).

In proliferierenden Bovine Endothelial Cells (BAEC) wurde nachgewiesen, daß die ATF-Bindungsstelle sowohl für die Promotoraktivität als auch für eine geringere Menge an mRNA von Cyclin A in konfluenten, sich nicht mehr teilenden BAEC-Zellen verantwortlich ist. Gelretardationsexperimente haben gezeigt, daß ATF1 an diese Stelle bindet (Yoshizumi et al.). Die ATF/CRE-Bindungsstellen scheinen aber auch in die Hochregulation des Promotors von Cyclin A am Übergang von der G1- zur S-Phase nach Wachstumsstimulation von humanen Fibroblasten involviert zu sein (Nakamura et al.).

Mäuse ohne funktionelles Cyclin A2 sind embryonal letal. Sie scheinen sich bis Tag E 5,5 p.c. normal zu entwickeln, sterben aber um Tag E 8,5 p.c. Das Überleben der Embryonen bis nach der Implantation in den Uterus, wird durch das Vorhandensein von maternalem Cyclin A2-Protein erklärt (Murphy et al.).

CRE-Elemente scheinen nicht nur in die Regulation von Cyclin A sondern auch in die Regulation von Cyclinen des D-Typs involviert zu sein (Yang et al.; Herber et al.).

Diese Daten und der frühe Entwicklungsstop der ATF1^{-/-} CREB^{-/-} Doppelmutanten lassen die These zu, daß eine gestörte Regulation der Expression der Cycline A und D in den ATF1/CREB-Mutanten somit nicht auszuschließen wäre.

Auch andere Arbeiten haben gezeigt, daß CREB und ATF1 an proliferativen Prozessen regulierend beteiligt sind. So spielt Interleukin-2 (IL-2) in der Immunantwort eine zentrale

Rolle. Il-2 stimuliert Antigen-aktivierte Lymphozyten, von der G1-Phase in die replikative (S-) Phase des Zellzyklus überzugehen (Smith). Diese Stimulation steht mit einer erhöhten Phosphorylierung von CREB und ATF1 während des Phasenwechsels, jedoch nicht mit einem Anstieg des cAMP-Spiegels in Zusammenhang. ATF1 und CREB scheinen somit eine durch Il-2 induzierte, wichtige regulatorische Funktion während des Zellzyklus zu haben, dessen Mechanismus unabhängig von cAMP ist (Feuerstein et al.). Eine Funktion von CREB und ATF1 scheint die Kontrolle der zellzyklusregulierten Transkription von Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) zu sein (Huang et al.). Expression von PCNA wird von Mitte bis Ende der G1-Phase in durch Il-2 stimulierten T-Lymphozyten induziert. PCNA ist ein Hilfsfaktor der Polymerase δ , die zum Übergang in die S-Phase nötig ist (Shipman-Appasamy et al, Moore et al.). Somit spiegelt PCNA ein wichtiges Zellzyklusgen wider, dessen Expression in Il-2-stimulierten T-Lymphozyten durch CREB/ATF-Transkriptionsfaktoren reguliert wird.

Die Bedeutung der CRE-Bindungsstellen in den Promotoren von Cyclin A und D, der Phänotyp der Cyclin A2^{-/-} Mäuse sowie die Regulation der Expression von PCNA durch CREB und ATF1 in Il-2-stimulierten T-Lymphozyten bestärken die Annahme, daß die beiden Proteine eine wesentliche Funktion in der Regulation von Zellwachstum und Proliferation haben. Die Erzeugung von Mäusen, die einen genetischen ATF1^{-/-} Hintergrund haben, und in denen CREB mittels des CRE-Lox-Systems (Gu) spezifisch im Thymus ausgeschaltet werden kann, wird voraussichtlich weitere Informationen liefern. Es wäre denkbar, daß ATF1 und CREB sowohl in diesem System, als auch in den ATF1/CREB-Doppelmutanten bzw. ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Mäusen in die gleichen Prozessen eingreifen.

3.6 Embryonen des Genotyps ATF1^{+/-} CREB^{-/-} weisen einen Defekt während der Gastrulation auf

Nach der Implantationsphase in den Uterus (5-6 Tage p.c.) verändern sich Größe und Form des Embryos sehr stark, und das Volumen des embryonalen Gewebes nimmt aufgrund von Zellproliferation etwa vierzigfach zu (Snow). Der Beginn der Gastrulation hängt aber nicht ausschließlich von Zellzahl und Volumen des Epiblasts ab (Henery et al.), obwohl Zellteilung eine der Hauptantriebskräfte der Entwicklung der Keimblätter ist. Allerdings wird die Ausdehnung des Mesoderms wahrscheinlich durch andere formgebende Kräfte wie beispielsweise das Vordrängen neugebildeter Mesodermzellen in den Primitivstreifen und der Tendenz anderer Zellen, sich vom Primitivstreifen wegzubewegen, angetrieben (Tam et Behringer).

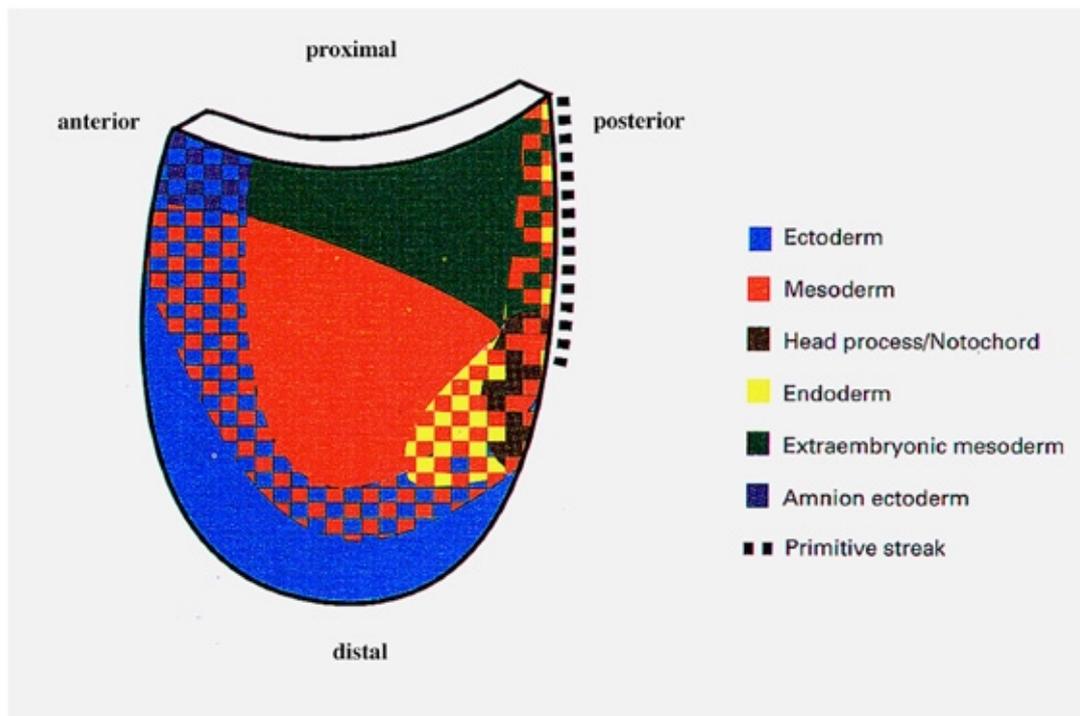


Abb. 27 „fate map“ eines Epiblasts, kurz nach Beginn der Gastrulation

(aus: B.Hogan et al.; Manipulating the Mouse Embryo; Cold Spring Harbor Lab. Press)

Die ursprüngliche Position von späteren Gewebe im Epiblast wurde auf die linke Hälfte des Embryos projiziert. Die Grenzen dieser späteren Gewebe überlappen sich teilweise.

Analysen der Transplantate bestimmter Epiblastzellpopulationen sowie der Nachkommen einzelner markierter Epiblastzellen brachten Informationen über die Determinierung von Zellen in Abhängigkeit ihrer Position innerhalb des Eizylinders vor oder im frühen Gastrulationsstadium (Lawson et al.; Tam et Zhou). Diese Ergebnisse wurden in sogenannten „fate maps“ zusammengefaßt (Abb.27) (Beddington et Lawson; Tam et Behringer). Die Spezifikation von Zelllinien ist somit Ergebnis bestimmter positionssabhängiger Einflüsse im Epiblast (Tam et Zhou). So entwickeln sich distale Epiblastzellen vorwiegend in Neuro- oder Oberflächenektoderm, während proximale Epiblastzellen hauptsächlich in extraembryonales Mesoderm, andere mesodermale Gewebe der posterioren Region oder in Ektoderm des Amnions differenzieren.

Zu Beginn der Gastrulation wandern in Wildtyp-Embryonen proximale, posteriore Epiblastzellen als erste in Form des Primitivstreifens zwischen primitives Ektoderm und primitives Entoderm. Diese Epiblastzellen befinden sich zum Zeitpunkt fortgeschrittener Gastrulation im Bereich des Primitivknotens am distalen Ende und differenzieren zu anteriorem Mesoderm. Epiblastzellen, die erst spät in den Primitivstreifen einwandern, formen posteriore Strukturen des Embryos. Dieser Vorgang erklärt, warum Organizerspezifische Gene wie *hnf-3 β* und *lim-1*, zu Beginn der Gastrulation im posterioren Epiblast exprimiert werden (Sasaki et Hogan; Shawlot et Behringer), während sie gegen Ende in

anteriorem Mesentoderm und der Chorda dorsalis (Notochord) anzutreffen sind (Monaghan et al; Shawlot et Behringer).

ATF1+/- CREB-/- Embryonen bilden am Tag E 7,5 p.c. entweder keinen oder nur einen kleinen Epiblast in Form einer Anhäufung weniger Zellen im distalen Bereich des Embryos. Die fehlende Zylinderform verhindert somit eine deutliche Ausbildung des Primitivstreifens. Dennoch wird mesodermales Gewebe gebildet, was mittels *in situ* Hybridisierung verschiedener Marker gezeigt wurde. So exprimieren Mutanten mit Epiblastzellen *fgf-8* und *brachyury*. Das zeigt, daß embryonales Mesoderm vorhanden ist. Expressionsmuster von *lim-1* und *hnf-3 β* machen allerdings deutlich, daß es sich vorwiegend um anteriores Mesoderm handelt. Während der späteren Gastrulation (E 7,5d p.c.) zeigen die Signale positive Zellen mit Entodermcharakter im distalen Bereich, was auf anteriores Mesentoderm hinweist.

In einigen Embryonen finden sich auch extraembryonale Mesodermzellen, die *bmp-4* exprimieren. Jedoch bilden diese keine extraembryonalen Strukturen wie Amnion, Chorion oder Allantois.

In den ATF1+/- CREB-/- Embryonen scheint somit ein Defekt des Epiblasts, die Bildung von Geweben des posterioren Primitivstreifens und des ektodermalen Anteils des Amnions zu verhindern. Die in den Mutanten vorhandenen primitiven Ektodermzellen spiegeln den distalen Bereich eines normalen Epiblasts wider. Proximale Bereiche des Eizylinders, die extraembryonales Mesoderm und ektodermalen Anteil des Amnions bilden, fehlen (Abb. 27). Zu Beginn der Gastrulation entsteht folglich Mesoderm, das trotz Abwesenheit eines morphologisch erkennbaren Primitivknotens anteriore Strukturen wie Chorda dorsalis (Notochord) und anteriores Mesentoderm formt. Während der weiteren Gastrulation wird jedoch durch mangelnde Proliferation nicht genügend Zellmaterial gebildet. Die meisten primitiven Ektodermzellen differenzieren also verfrüht, anstatt in eine weitere Zellteilungsrunde einzutreten. Das bewirkt, daß sich der Differenzierungsprozess aufgrund mangelnder Epiblastzellen sehr stark verlangsamt, und posteriore Strukturen nicht mehr geformt werden können.

Die Entwicklung posteriorer Bereiche wird jedoch in den ATF1+/- CREB-/- Mutanten nicht völlig verhindert, was durch Expression von *bmp-4* in einigen Zellen gezeigt wird. BMP-4 kann auch anteriores, primitives Ektoderm induzieren, Blutzellen zu bilden (Johansson et Wiles; Kanatsu et Nishikawa). Zellen, die BMP-4 bilden, könnten folglich Ursache der große Menge an Blutzellen sein, die am Tag E 9,5 p.c. in den ATF1+/- CREB-/- Embryonen zu finden sind.

Die gestörte Proliferation der ATF1+/- CREB-/- Embryonen führt somit direkt und indirekt zu einer Ansammlung von Effekten. Die wenigen vorhandenen Epiblastzellen bilden keinen Eizylinder, und der proximale Bereich scheint größtenteils zu fehlen. Somit ist die Ausbildung posteriorer und extraembryonaler Strukturen sowie des ektodermalen Anteils des Amnions gestört. Das Fehlen des Eizylinders und extraembryonaler Strukturen auch zu

einer veränderten Signalvermittlung und Beeinflussung zwischen den Zellen führen. Das Fehlen von Amnion, Allantois und Chorion bewirkt, daß der Embryo während der weiteren Entwicklung nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden kann und folglich abstirbt.

Diese Ergebnisse gehen konform mit Untersuchungen von dominant-negativem CREB in *Xenopus*. Der distale und anteriore Bereich des Epiblasts ist das Equivalent des sogenannten „animal caps“ in *Xenopus* (Tam et Behringer). Die durch Activin induzierte Elongation von isolierten „animal caps“ wird in Explantaten aus Embryonen, in die dominant-negative CREB-mRNA injiziert wurde, inhibiert. Untersuchte mesodermale Marker wurden in gleichen Mengen in „animal caps“ injizierter wie auch nicht-injizierter Embryonen exprimiert (Lutz et al., unveröffentlicht). Sowohl in *Xenopus* als auch in der Maus verhindert ein Mangel an funktionellen CREB/ATF-Proteinen somit nicht die Induktion von Mesoderm. Allerdings wäre ein Defekt der Signalvermittlung in ATF1^{+/-} CREB^{-/-} Embryonen, die zur Ausdehnung des Epiblasts in posteriore Richtung führt, eine mögliche Erklärung für den Gastrulationsdefekt.

3.7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit belegt, daß CREB und ATF1 eine wichtige Bedeutung in der frühen embryonalen Mausentwicklung zukommt. Welche Signaltransduktionswege und welche Zielgene dabei genau betroffen sind, sollte in weiterführenden Experimenten ermittelt werden

Weitere Untersuchungen der Mutanten durch RT-PCR oder mittels immunohistochemischer Methoden auf Cycline, PCNA oder andere möglichen Zielgene sind somit nötig. Zusätzlich wird die Erzeugung von Mäusen in einem genetischen ATF1^{-/-} Hintergrund, in denen CREB gewebsspezifisch mittels des CRE-Lox-Systems (Gu) ausgeschaltet werden kann, die physiologische Funktion der beiden Proteine weiter aufklären.

4. Material

4.1 Enzyme, Chemikalien und anderes Material

Die während der Doktorarbeit verwendeten Enzyme und Chemikalien wurden soweit nicht anders bezeichnet von folgenden Firmen bezogen:

Enzyme:

- Beckmann, Frankfurt
- BRL, Neu-Isenburg
- Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Mannheim
- New England Biolabs GmbH, Schwalbach
- Promega, Heidelberg
- Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
- Stratagene, Heidelberg

Chemikalien:

- Bio-Rad, München
- Difco, Detroit
- Merck & Co., Darmstadt
- Serva Feinchemikalien GmbH & Co., Heidelberg
- Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
- Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenstein
- Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg

Radioaktive Nukleotide:

- Amersham-Buchler GmbH, Freiburg

Spezielle Chemikalien werden im Methodenteil unter den entsprechenden Abschnitten aufgelistet.

4.2 Puffer und Lösungen

4.2.1 Lösungen und Medien für die Kulturen von Bakterien

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):

10	g/l	Bacto-Trypton (Difco)
5	g/l	Hefeextrakt (Difco)
5	g/l	NaCl

Mit 5N NaOH auf pH 7 einstellen; anschließend autoklavieren

SOC-Medium:

20	g/l	Bacto-Trypton (Difco)
5	g/l	Hefeextrakt (Difco)
2	ml/l	5M NaCl-Lösung
2,5	ml/l	1M KCl-Lösung
5	ml/l	2M MgCl-Lösung
10	ml/l	1M MgSO ₄ -Lösung

Mit NaOH auf pH 7 einstellen; anschließend autoklavieren

Vor Gebrauch:

1M Glucose-Lösung (steril), Endkonzentration 20 mM hinzufügen. Die Glucose-Lösung wird mittels Filtration durch einen 0,22 Micron-Filter sterilisiert.

SOB-Medium:

20	g/l	Bacto-Trypton (Difco)
5	g/l	Hefeextrakt (Difco)
0,5	g/l	NaCl

Mit 5N NaOH pH 7 einstellen; anschließend autoklavieren

Vor Gebrauch 5 ml/l 2M MgCl₂-Lösung (steril) hinzufügen.

LB-Agarplatten:

15	g/l	Bacto-Agar (Difco) in LB-Medium
----	-----	---------------------------------

Gleiche Volumina 2x LB-Medium und 3% Bacto-Agar (vorher aufgekocht) mischen und zum Gießen auf 50°C abkühlen lassen.

Amp-Agarplatten

LB-Agarplatten, die als Zusatz Ampicillin enthalten, das in einer Konzentration von 150µg/ml hinzugefügt wird.

Stammlösung:

Ampicillin:	100 mg/ml in 70% Ethanol
	(Aufbewahrung bei -20°C)

4.2.2 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung und Aufbewahrung

<u>TE-Puffer:</u>	10	mM	Tris/HCl	pH 7,5
	1	mM	EDTA	pH 8,0

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1)

Gleiche Volumina Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) werden gemischt. Vor der Verwendung muß das Phenol durch mehrmaliges Rühren mit gleichen Volumina 0,5M Tris/HCl pH 8,0 auf pH > 7,8 gebracht werden, da bei sauren pH-Werten die DNA in die organische Phase übertritt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C, lichtgeschützt in einer Glasflasche (bis zu einem Monat stabil).

4.2.3 Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese (Agarosegel)

10 x Tris-Borat-Puffer (TBE):

900	mM	Tris
889	mM	Borsäure
25	mM	EDTA

10 x Proben-Puffer:

25	%	Ficoll
0,4	%	Bromphenolblau
0,4	%	Xylencyanol
0,17	%	SDS

4.2.4 Puffer und Lösungen für die *in situ* Hybridisierung

Alle Puffer und Lösungen müssen entweder mit Depc-Wasser angesetzt oder Depc behandelt werden. Stammlösungen, die Tris enthalten oder Lösungen die diese Stammlösungen enthalten, müssen mit bereits autoklavierten H₂O_{Depc} angesetzt werden, da das Tris sonst durch das Depc zerstört wird.

H₂O_{Depc}:

0,1% (v/v) Depc (Diethylpyrocarbonat) in destilliertes Wasser, schütteln, mehrere Stunden stehen lassen und anschließend autoklavieren.

4.3 Biologisches Material

4.3.1 Bakterienstamm von *Escherichia coli*

XL1-Blue:

ermöglicht die Klonierung von IZAP II Phagen

4.3.2 Vektoren

pBluescript II KS(+):

2961bp großes Plasmid, das von pUC 19-Vektor abgeleitet ist. Es enthält einen f1 und colE1-Origin sowie einen T3- und T7-Promotor. Das Plasmid ermöglicht eine Blau-Weiß-Selektion durch eine α -Komplementation in einem entsprechendem Wirtstamm. Der Vektor besitzt zur Selektion das Ampicillin-Resistenzgen.

4.3.3 sonstige Nukleinsäuren

- Desoxyribonukleotide (dNTP), 10mM, Boehringer Mannheim
- Synthetische Oligodesoxyribonukleotide, Werner Fleischer (DKFZ)
- Größenmarker für Gelelektrophorese: - Gibco-BRL (kb-Leiter)

4.3.4 Enzymlösungen

Proteinase K:	20	mg/ml in Depc-Wasser
RNaseA:	10	mg/ml in Depc-Wasser
DNaseI:	3	mg/ml (RNase-frei)
Lysozym:	10	mg/ml

Ale Enzymlösungen werden bei -20°C gelagert.

5. Methoden

5.1 Allgemeine Methoden

5.1.1 Methoden zur Aufreinigung von DNA-Molekülen

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion

Die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion dient der Abtrennung von Proteinen. Die die DNA enthaltende Lösung wird mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gut gemischt. Durch 10minütige Zentrifugation werden die vermischten Phasen wieder getrennt. Die denaturierten Proteine befinden sich als weißer Niederschlag in der Interphase. Der wässrige Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um überschüssiges Phenol aus der Lösung zu entfernen, wird dieser meist ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und gemischt. Beide Phasen werden durch Zentrifugation getrennt. Der wässrige Überstand enthält die DNA.

Ethanolpräzipitation

Nukleinsäuren werden durch Hinzufügen von 2,5 Volumina Ethanol und 1/10 Vol Natriumacetat (3M, pH 5,2) 20 min bei -20°C gefällt. Bei sehr geringen DNA-Mengen (< 500 ng) kann zusätzlich 0,5 µl Glycogen (20 mg/ml, Boehringer Mannheim) oder 1µl HefetRNA (10mg/ml) als Trägersubstanz addiert werden. Das Präzipitat wird 15 Minuten bei hoher Umdrehungszahl (13000 rpm in der Eppendorf-, 5000 rpm in der Haereus-Zentrifuge) bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Durch ein- bis zweimaliges Waschen mit 70% Ethanol werden überschüssige Salzionen entfernt. Schließlich wird das Niederschlag an der Luft oder in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

5.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen kommen zwei Methoden in Frage. Die Bestimmung im Spektrophotometer eignet sich für Nukleinsäure-Lösungen nach präparativen Plasmidaufbereitungen und nach Aufreinigung mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion. Die Absorption der Nukleinsäure wird bei 260nm ermittelt. Die Absorption bei 280nm gibt Verunreinigung mit Proteinen (aromatische Aminosäurereste) an, wobei das Verhältnis OD-Wert₂₆₀/OD-Wert₂₈₀ ein Maß für den Reinheitsgrad der Nukleinsäure ist. Bei guten DNA- und RNA-Präparationen beträgt dieses

Verhältnis ungefähr 1,6-1,8. Die Konzentration wird durch Multiplikation der gemessenen OD-Werte bei 260nm mit einem nukleinsäurespezifischen Faktor (ssDNA, RNA, dsDNA, Oligonukleotide) erhalten.

Ein Vergleich von DNA-Banden im Agarosegel mit DNA bekannter Konzentration und Größe wird z.B. bei der Phagen-DNA-Präparation angewendet, da diese DNA-Lösungen i.a. Verunreinigungen enthalten, die die photometrische Analyse stark beeinflussen.

5.1.3 Gelelektrophorese

Mit Hilfe von Agarose- und Polyacrylamidgelen kann DNA entsprechend ihrer Länge nach aufgetrennt werden. Dabei wird über das Gel ein elektrisches Feld gelegt, so daß die negativ geladene DNA zum Pluspol gezogen wird. Das Gel dient als Matrix, in der sich die DNA bewegt. Kleine DNA-Fragmente wandern schneller durchs Gel als große. Mit Hilfe der Agarose- oder Polyacrylamidkonzentration kann der optimale Längenauftrennungsbereich gewählt werden (siehe Tabelle 6.2 in Sambrook, 1989). Als Elektrophoresepuffer wird 1 x TAE-Puffer für präparative Gele und 0,5 x TBE-Puffer für analytische Gele verwendet. TBE-Puffer haben zwar eine höhere Pufferkapazität, sind aber für präparative Gele nicht so geeignet, da Borat Komplexe mit Cis-Diolgruppen von Zuckern eingehen.

Polyacrylamidgele besitzen eine höhere Auflösung als Agarosegele. DNA-Längen mit einem Basenpaar Differenz können von ihnen getrennt werden. Daher werden sie zum Sequenzieren benutzt.

Zur Sichtbarmachung der DNA-Banden im Gel wird Ethidiumbromid verwendet (0,1mg/ml). Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngiger DNA und kann unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe von Marker-DNA, deren DNA-Fragmentlängen und deren Konzentration bekannt ist, können Längen- und Konzentrationsbestimmungen durchgeführt werden.

5.1.4 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA-Moleküle können mit Hilfe von bakteriellen Restriktionsenzymen in kleinere Fragmente geschnitten werden. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen hydrolysieren dabei die DNA sequenzspezifisch und können so gezielt eingesetzt werden. Die Reaktionsbedingungen werden entsprechend der Empfehlung der Hersteller ausgewählt, wobei die von den Firmen migelieferten 10 x Puffer verwendet werden. Der Bedarf an Enzym berechnet sich anhand der im Molekül vorhandenen Schnittstellen relativ zu den in Lambda-DNA vorhandenen Schnittstellen. Eine Unit Enzym schneidet 1mg Lambda-DNA unter optimalen Reaktionsbedingungen in einer Stunde. Dabei sollte allerdings darauf

geachtet werden, daß nur 1/10 des Gesamtvolumens aus unverdünnten Enzym bestehen darf. Zu hohe Glycerolkonzentrationen können sonst zu Sternaktivität führen.

5.2 Klonieren von DNA

5.2.1 Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen/Quiaex Gelextraktion der Firma Diagen

Bei der Quiaex DNA Extraktion aus Agarosegelen wird zunächst der die DNA enthaltende Agaroseblock mit einer sterilen Klinge ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe hoher Salzkonzentrationen an Silikatpartikel gebunden. Waschen mit niedrigen Salzkonzentrationen führt zum Abdissoziieren der DNA von den Partikeln.

Zunächst wird der Agaroseblock der gewünschten DNA Bande in QX1-Puffer unter Zugabe von 10ml Quiaex-Suspension für 10min bei 50°C gelöst. (Die hohe Natriumperchloratkonzentration des Puffers führt zu einem Aufbrechen der Wasserstoffbrücken zwischen den Zuckern, so daß das Gelstück in Lösung gehen kann. Desweiteren dissoziieren DNA-gebundene Proteine von der DNA ab). Die Suspension enthält die Silikatkügelchen, an die die DNA bindet. Dies wird durch hohe NaCl, NaClO₄ und GuSCN-Konzentrationen unterstützt. Durch Zentrifugieren der Matrix kann der die Agarose enthaltende Überstand verworfen werden. Zweimaliges Waschen mit QX2-Puffer beseitigt verbleibende Verunreinigungen. Mit Hilfe des Ethanol enthaltenden Puffers QX3 werden durch zweimaliges Waschen Salze entfernt. Der Puffer QX3 sollte durch Lufttrocknen des Pellets vollständig entfernt werden. Die DNA wird anschließend mit TE 10min bei 50°C eluiert.

5.2.2 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren und Phosphorylierung der Inserts

Vektoren, die nur durch ein Enzym linearisiert wurden, können bei der Ligasereaktion wieder religieren. Aufgrund der räumlichen Nähe der intramolekularen Enden ist eine Religation wahrscheinlicher als eine intermolekulare Ligation zwischen verschiedenen DNA-Molekülen. Durch eine Dephosphorylierung der linearisierten Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase kann dies verhindert werden.

Die DNA wird mit 1µl alkalischer Phosphatase (18U/ml), 10 x Phosphatase-Puffer und, wenn notwendig, H₂Odd. Dabei soll das Volumen des Reaktionsansatzes so klein wie möglich gehalten werden. Der Ansatz wird erst 30min bei 37°C, dann 30min bei 55°C und schließlich 30min bei 75°C inkubiert.

Das Reaktionsvolumen wird anschließend auf ca. 200 µl gebracht und meist Phenol/Chloroform extrahiert, um die alkalische Phosphatase zu entfernen.

Da die durch PCR gewonnenen Fragmente blunt-Enden ohne Phosphat besitzen (Pfu-Polymerase), müssen diese vor der Ligation in Vektoren erst kinasiert werden.

Das PCR-Produkt wird aus einem präparativen Agarosegel ausgeschnitten, über Quiaex-Gelextraktion aufgereinigt und in 20 µl TE aufgenommen. Zur Phosphorylierung wird die DNA mit 1 µl Polynukleotidkinase (10 U/ml), 2,5 µl 10 x Puffer und 2,5 µl ATP (Stammlösung 10 mM) für 30 min bei 37 °C und anschließend für 10 min bei 70 °C inkubiert. Dieser Ansatz wird mittels Wizard™ DNA Clean-Up System der Firma Promega (Anleitung: siehe beiliegende Beschreibung) von Enzym und Salzen befreit.

5.2.3 Ligation

Der Standardreaktionsansatz einer Ligation enthält 50 ng linearisierten Vektor sowie das Insert in 2 molarem Überschuß. Das Gesamtvolumen beträgt maximal 10 µl, wovon 1 µl 10 x Ligasepuffer und 0,5 µl T4-DNA-Ligase sind. Die Ligation erfolgt entweder bei 16 °C (sticky end-sticky end, sticky end-blunt end) oder bei Raumtemperatur (blunt end-blunt end) normalerweise über Nacht, mindestens 4 Stunden.

5.2.4 Kompetente Zellen für die Elektroporation

Zunächst wird ein *E. coli* Stamm direkt von einer gefrorenen Stammkultur auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen. Die Platte mit der Kultur wird für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Vier oder fünf einzelne Kolonien werden in 5 ml LB-Medium überführt und für 5 Stunden bis über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

800 ml LB-Medium werden dann mit 4 ml dieser Kultur in einer sterilen 2-Liter Flasche angeimpft und wieder bei 37 °C im Schüttler inkubiert, bis der OD₆₀₀-Wert ungefähr 0,5-0,7 beträgt.

Die Zellen und mehrere 500 ml-Flaschen mit destilliertem Wasser werden anschließend in einem Eiswasserbad 10-15 min abgekühlt. Die Bakterien werden 20 min bei 2 °C mit 4200 rpm in einer Beckman J-6M Zentrifuge (oder entsprechendem) abzentrifugiert, und das Pellet erst in 5 ml eiskaltem H₂O resuspendiert, ehe weitere 500 ml eiskaltes Wasser zu der Zellsuspension hinzugefügt werden.

Daraufhin wird der Zellmix wieder unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgegossen.

Das Zellpellet kann durch Schütteln leicht in der Restflüssigkeit gelöst werden, bevor zusätzliche 500 ml eisgekühltes dest. Wasser dazugegeben werden. Erneut wird der Ansatz

unter gegebenen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird wieder sofort nach der Zentrifugation abgegossen und das Pellet in Restflüssigkeit gelöst.

Üblicherweise werden die Zellen unter Bedingungen weiterbehandelt, die es ermöglichen, die Zellen zur Aufbewahrung einzufrieren:

Zu der Zellsuspension werden 40ml eisgekühltes 10%iges Glycerol hinzugefügt. Der Ansatz wird gut gemischt und in ein 50ml Falcon-Gefäß überführt, ehe er 10min bei 2°C mit 4200rpm abzentrifugiert wird. Anschließend wird der Überstand abgenommen, das Volumen des Pellets abgeschätzt und entsprechend in gleichem Volumen eiskaltem 10-20%igem Glycerol aufgenommen. Die Zellsuspension wird in 50-300ml Aliquots in gekühlte, sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Diese werden durch Eintauchen in ein Ethanol/Trockeneisbad (-50°C) schockgefroren. (Nicht in flüssigen Stickstoff!)

Die gefrorenen Zellen werden bei -80°C aufbewahrt.

5.2.5 Transformation von *E.coli* mittels Elektroporation

Materialien:

- Biorad gene pulser Apparat
- Biorad pulse controller
- Biorad gene pulser Küvetten (Elektrodenabstand 0,2cm)
- SOC-Medium

Zunächst werden die gefrorenen Zellen auf Eis aufgetaut und die Küvetten gekühlt (ca.15min).

Der Biorad gene pulser wird auf 2,47KV, 25mF und 200 oder 400 Ohm eingestellt.

1µl (=5pg bis 0,5mg) der Plasmid-DNA wird mit 50µl der Zellsuspension in die gekühlten Küvetten pipettiert und gut gemischt, indem man mit dem Finger gegen die Küvette schnippt. So werden auch eventuelle Luftblasen entfernt, und die Suspension am Boden der Küvette gesammelt. Anschließend müssen die Küvetten mit einem Papiertuch außen gründlich abgetrocknet werden, ehe man sie in die Proben-Kammer stellt.

Die Spannung wird angelegt, wenn beide Spannungsknöpfe für 4-5 Sekunden gedrückt werden, bis das Gerät summt. Die Küvetten werden entnommen und sofort 1ml SOC-Medium zum Transformationsansatz hinzugefügt. Die elektroporierten Zellen im SOC-Medium werden bei Raumtemperatur mit einer Pasteurpipette in ein steriles 2ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei 37°C 30-60min schüttelnd inkubiert, ehe die Zellen auf LAX- oder Amp-Agarplatten ausplattiert werden.

5.3 Präparation von Plasmid-DNA

5.3.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

2ml LB-Medium mit 150mg Ampicilin pro 1ml werden mit einer Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Diese Kultur wird in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellen 1min bei 7000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Bakterienpellet in 400ml STET-puffer resuspendiert und nach Zugabe von 32µl Lysozymbilösung (10mg/ml in TE) für eine Minute auf 95°C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen auf Eis werden die Zellreste 30min bei 4°C mit 13000rpm abzentrifugiert. 150µl des Überstandes werden mit 120µl Isopropanol gefällt und sofort bei 4°C für 15min mit 13000rpm abzentrifugiert. Das entstehende Pellet wird mit 70% Ethanol unter gleichen Bedingungen gewaschen, anschließend in der Vakuum-Zentrifuge oder bei Raumtemperatur luftgetrocknet und in 100µl TE wiederaugenommen.

STET-Puffer:

50	mM	Tris/HCl pH 8,0
50	mM	EDTA
5	%	Triton x 100
8	%	Saccharose

5.3.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Subklonierung und Sequenzierung wurde die DNA mit Hilfe von Quiagen-Säulen der Firma Diagen gereinigt.

400ml LB-Medium mit Ampicillin (150mg/ml) werden mit einer Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Zellen werden in einer Sorvall-Zentrifuge (GS9-Rotor, 4°C, 4000rpm, 10min) abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 4ml Lösung I (mit 0,1mg/ml Lysozym) resuspendiert und in 50ml Falcon-Gefäße überführt. Nach genau 5min werden 6ml Lösung II hinzugegeben, gut gemischt und für 10min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und genomische DNA werden durch Zentrifugation (10min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wird durch Glaswolle, Mull oder Filterpapier in ein neues Falcon-Gefäß filtriert. Die Plasmid-DNA wird durch Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol, 10minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation (15min, 5500rpm, 4°C) sedimentiert. Das DNA-Pellet wird in 10ml TE resuspendiert. Die Bakterien-RNA wird mit RNase A degradiert (10µl RNase - 10mg/ml - 15min bei 37°C inkubieren). Die DNA-Lösung wird einmal mit 10ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und die DNA aus dem wäßrigen Überstand nach Zugabe von 1/10 Vol NaAcetat (3M, pH 5,2), 2

Vol Ethanol und 1µl tRNA (10mg/ml) gefällt (20min bei -20°C). Die DNA wird sedimentiert (Zentrifugation: 15min, 13000rpm bei 4°C) und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen.

Die DNA wird luftgetrocknet und in 2ml TE resuspendiert. Die Ausbeute lag bei 2-3mg DNA/400ml Kultur.

Lösung I: GET (Glucose-EDTA-Tris)-Puffer

50 mM Glucose

25 mM Tris/HCl pH 8,0

10 mM EDTA pH 8,0

Lösung II: 0,2 M NaOH

1 % SDS

5.4 Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Genotypisierung mittels PCR werden 2mm lange Schwanzbiopsien von 4 Wochen alten Mäusen genommen und mit 200µl NID-Puffer sowie 1,2µl Proteinase K (10mg/ml) über Nacht bei 56°C inkubiert. Die Proteinase K wird anschließend durch Erhitzung des Lysats für 10min auf 95°C denaturiert. Für die PCR wird 2-3µl des Lysats eingesetzt. Eine Reaktionsansatz mit H₂O wird als Negativkontrolle benutzt.

Die Polymerase-Ketten-Reaktionen wird in einem Thermocycler der Firma Stratagene durchgeführt. Dabei wird Taq-Polymerase der Firma Boehringer Mannheim benutzt. Die MgCl₂-Konzentrationen, sowie die Anlagerungstemperatur für die jeweiligen Primer wird in Vorexperimenten optimiert.

<u>Reaktionsansätze:</u>	<u>für ATF1:</u>	<u>für CREB:</u>
5'-Primer (10pmol/µl)	1,5 µl	1,5 µl
3'-Primer (10pmol/µl)	1,5 µl	1,5 µl
Lac.Z-Primer (10pmol/µl)	1,5 µl	1,5 µl
dNTPs (10mM)	1,0 µl	1,0 µl
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µl	2,0 µl
10x Puffer ohne MgCl ₂	2,5 µl	2,5 µl
Taq-Polymerase (1U/µl)	0,5 µl	0,5 µl
DNA-Lysat	2,0 µl	1,0 µl
H ₂ O	<u>12 µl</u>	<u>12,5 µl</u>
	25 µl	25 µl

Der Reaktionsansatz wird mit Mineralöl überschichtet und 5min bei 94°C denaturiert.

Im Anschluß wird mit folgendem Temperaturzyklus gearbeitet:

Temperaturen zur Primer-Anlagerung: für ATF1: 65°C für CREB: 58°C

94 °C - 40 sec (Denaturierungsschritt)
58/67 °C - 1 min (Primer/Starterfragment-Anlagerung)
72 °C - 1 min (Extension/Verlängerung der Startersequenz)

dieser wurde über 35 Runden wiederholt.

danach: 72 °C - 10 min (Extension)

Primer:

ATF1-5´-Primer: GCAGGTGATGGAAGACAGATCATTCC
ATF1-3´-Primer: AGACCTGCCTCCTCACCTAACTGCC
CREB-5´-Primer: GATGTACAAACATAACCAGATCCGC
CREB-3´-Primer: CACAGAACCTACTGTTAGCAGATG
Lac-Z-Primer: AAGCGCCATTCGCCATTCAGGC

Nicht-ionischer-Detergenzien (NID)-Puffer:

50 mM KCl
10 mM Tris/Cl pH 8,3
2 mM MgCl₂
0,1 mg/ml Gelatin
0,45 % NP-40
0,45 % Tween-20
anschließend autoklavieren

5.4.1 Genotypierung von Paraffinschnitten mittels PCR

Die Paraffinschnitte werden zunächst 10min in Xylol entparaffiniert, dann zweimal je 10min in Ethanol inkubiert und luftgetrocknet. Mit einer Injektionsnadel (25G5/8), die zuvor mit NID-Puffer angefeuchtet wurde, wird anschließend vorsichtig das embryonale Gewebe abgekratzt. Die Dezidua sollte dabei nicht berührt werden, da ansonsten das Ergebnis durch maternales Gewebe verfälscht wird. Das an der Injektionsnadel klebende Material wird dann in 25µl NID-Puffer mit Proteinase K abgespült. Diese Lösung wird mit Mineralöl überschichtet und 5 Stunden bei 56°C inkubiert. Ehe ein Aliquot aus der Lösung entnommen wird, sollte die Proteinase K zunächst 10min bei 95°C denaturiert werden.

Zur Genotypierung werden für ATF1 und CREB je 10µl eingesetzt. Die PCR-Konditionen entsprechen denen zur Genotypierung adulter Mäuse.

5.5 Anfertigen von Gewebsschnitten

5.5.1 Gefrierschnitte

Das Gewebe adulter Tiere wird mittels Perfusion fixiert. Das heißt, den anästhesierten Mäusen wird nach mehrfachem Einschneiden der Leber durch den linken Ventrikel zunächst PBS und danach 4% vorgekühltes Paraformaldehyd (in PBS; pH 7,3) injiziert. Anschließend werden die Gewebe entnommen, zweimal 5 min mit PBS bei RT gewaschen und in eine 15%-ige Sukroselösung bei 37°C überführt. Während der Inkubation sinken die Gewebe nach ca. 10min bis 3h an den Boden des Gefäßes ab. Sie werden dann in eine 7%-ige Gelatinlösung (in 15% Sukrose) gebracht und wieder bei 37°C inkubiert, bis sie abgesunken sind.

Ist dies der Fall, so können die Gewebe in der gleichen Lösung auf Eis in Gelatinblöcke eingebettet werden. Diese können entweder mehrere Tage bei 4°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden. Die Gelatinblöcke werden dann auf ein Stück Pappe gelegt, die so lange mit einer Pinzette in flüssigen Stckstoff gehalten wird, bis der block weiss geworden und tiefgefroren ist. Diese Blöcke können bei -20°C galagert werden, oder mit dem Cryostaten (Leica) in 10µm Schnitte geschnitten werden, die auf TESPA-behandelte Objektträger überführt werden.

5.5.2 Paraffinschnitte

- siehe in situ Hybridisierung

5.6 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Paraffinschnitte werden zunächst 10min in Xylol entparaffiniert, ehe sie zur Rehydrierung durch einen Ethanolgradienten (100%, 96%, 70%, Aqua dest.) geführt werden. Anschließend werden die Schnitte 10min in saurem Hämalaun gefärbt. Nach kurzem Abspülen in Aqua dest. und einer HCl/Ethanol-Lösung (25% HCl; 70% EtOH) werden die Schnitte 10min in Leitungswasser geblaut. Danach werden sie 5min in alkalischem Eosin gegengefärbt. Nach kurzem Abspülen in H₂O, werden die Schnitte zur Dehydrierung wieder durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 96%, 100%) geführt, ehe sie nach Inkubation in Xylol mit Eukitt und Deckgläschen eingedeckt werden.

Eosin-Lösung:

30	ml	Stocklösung (2,5g Eosin G in 250ml H ₂ O _d)
270	ml	70% Ethanol
3	ml	Essigsäure

5.7 Antikörperaufreinigung von ATF1-Antiserum

Das Antiserum wird über Säulenchromatographie mit immobilisiertem Antigen-Peptid aufgereinigt. Zunächst wird das Serum 1:1 mit ImmunoPure Gentle Ag/Ab-Bindungspuffer (Pierce) verdünnt, um passende um die für die optimale Bindung nötige Ionenstärke und pH-Wert aufrechtzuerhalten. Die Säule wird mit 5 Säulenvolumen Bindungspuffer equilibriert, ehe man das verdünnte Serum aufgetragen. Nachdem das Serum im Gel versickert ist, wird die Säule mit 15 Säulenvolumen Bindungspuffer gewaschen. Anschließend eluiert man die gebundene Immunglobuline mit 5 Säulenvolumen Immuno Pure gentle Ag/Ab-Elutionspuffer (Pierce). Die eluierten Fraktionen werden dann im Spektrophotometer auf ihren Proteingehalt getestet. Die Absorbtion von Proteinen liegt bei 280nm. Die konzentriertesten Fraktionen werden gepoolt und zur Stabilisierung mit 0,02% Natriumazid versetzt..

5.8 Immunohistochemische Färbungen

Epitope gegen die die verwendeten Antikörper gerichtet sind:

ATF1 (#32)	Aminosäuresequenz: 10-36	(N-Terminus)
CREB (affi 88)	Aminosäuresequenz: 136-150	(Q1-Domäne)
CREM (NEET)	Aminosäuresequenz: 230-243	(γ -Exon)

verwendete Konzentration:

ATF1 (#32)	1:250	(aufgereinigtes Serum)
ATF1 (#32)	1:1000	(Serum nicht aufgereinigt)
CREB (affi88)	1:2000	
CREM (NEET)	1:3000	

5.8.1 an Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte werden zunächst durch 2x 5min Xylol entparaffinisiert und mit einem Ethanolgradienten (100%, 100%, 96%, 80%, 70%) rehydriert. Anschließend werden sie kurz mit PBS gespült, bevor man endogenen Peroxidasen durch 10min H₂O₂-Behandlung (3% in H₂Odest) blockt.

Zur Mikrowellenbehandlung überführt man die Paraffinschnitte in ein Glasgefäß mit Deckel, das man mit Antigen Retrieval Citra Solution (BioGenex) füllt, so daß die Objektträger mit der Lösung bedeckt sind. Das Glasgefäß mit den Schnitten wird dann in die Mikrowelle gestellt:

für ATF1/CREB/CREM:	2min	30sec	800W (Lösung muß kochen)
	8min		360W

für Cdk2:	2min	30sec	800W
	7min		360W

Nach der Mikrowellenbehandlung läßt man die Objektträger auf Raumtemperatur abkühlen. Anschließend werden sie erst kurz mit Wasser und dann 3x 2min mit PBS gewaschen, ehe man die Schnitte einzeln mit einem Fettstift umrandet. Es folgt das Blocken unspezifischer Bindungsstellen für 60min bei RT mit 1,5% Normalserum (Ziege) in PBS („Blocking-Lösung“). Nach Entfernen der „Blocking-Lösung“ wird dann der erste Antikörper aufgetragen (ATF1-, CREB-, CREM-Serum mit „Blocking-Lösung“ entsprechend verdünnt) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Antikörperlösung entfernt

und nach 3x 2min Waschen bei RT mit PBS erneut durch frische „Blocking-Lösung“ ersetzt (60min RT). Mittels des Vecta Stain Elite Kits (Serva) wird der erste Antikörper detektiert. Danach werden die Schnitte 3x kurz in PBS gewaschen und das Signal mittels Diaminobenzidin (DAB)-Substrat (Boehringer Mannheim) für alkalische Phosphatase sichtbar gemacht (5-15min).

Zur Entfernung von DAB werden die Schnitte erneut gewaschen und durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 80%, 96%, 100%) und 5min. Xylol dehydriert, ehe sie mit Eukitt eingedeckt werden.

5.8.2 an Gefrierschnitten

Zunächst werden die Gefrierschnitte eine halbe Stunde bei 37°C getrocknet, ehe sie 10min in vorgekühltem Aceton bei -20°C fixiert werden. Nach 2x 5min waschen in PBS bei RT werden die Schnitte in 10min in 1% H₂O₂ in PBS gebleicht, um die Wirkung endogener Peroxidasen zu minimieren. Die Objektträger werden dann wieder 2x 5min in PBS gewaschen, bevor unspezifische Bindungsstellen zunächst mit „Blocking-Lösung“ und dann mit Avidin-Biotin-Lösung blockiert werden. Anschließend wird mit den Gefrierschnitten wie mit Paraffinschnitten verfahren und zur Markierung des ersten Antikörpers das Vecta Stain Elite Kit (Serva) verwendet.

Zur Sichtbarmachung des Signals werden die Schnitte mit mikrogefilterter AB-Lösung bedeckt. Diese Farbreaktion wird durch Waschen in Leitungswasser abgestoppt, ehe die Gefrierschnitte mit Kaiser's Gelatin (Merck) eingedeckt werden.

Blocking-Lösung: 10% hitzeinaktiviertes Schafserum
 1% Rinderserumalbumin
 0,1% Triton X-100)
 in PBS

AB-Lösung: A: 7,9ml 0,1M Natriumacetat
 2,1ml 0,1M Essigsäure
 B: 4mg AEC in 500µl Dimethylformamid
 AEC: 9-Ethylcarbazol-3-Ylamin
 3-Amino-9-Ethylcarbazol
 9-Ethylcarbazol-3-Illamina (Sigma; A-5754)

Von Lösung A werden 500µl verworfen, ehe Lösung B und 5µl H₂O₂ hinzugefügt werden. Vor dem Auftrag auf die Schnitte, sollte die AB-Lösung durch einen 2mm Millipore Filter gegeben werden.
 Der Ansatz bleibt ca. 30min auf Eis und lichtgeschützt stabil.

5.9 Blastozysten-Entnahme

Zum Erhalt von Blastozysten wird der Uterus 3,5 Tage p.c. der schwangeren Maus entnommen, die Enden der Uterushörner werden kurz vor dem Übergang zu den Eileiter durchtrennt und überschüssige Membranen entlang des Uterus werden entfernt. Anschließend wird der Uterus kurz in M2-Medium gespült und in ein kleines Glasschälchen überführt. Mit Hilfe einer ausgezogenen Pasteurpipette, die in die Cervix geschoben wird, werden die Blastozysten aus beiden Seiten des Uterus mit je ca. 0,5ml M2-Medium ausgespült.

M2-Medium:

94,66 mM	NaCl
4,78 mM	KCl
1,71 mM	CaCl ₂ H ₂ O
1,19 mM	KH ₂ PO ₄
1,19 mM	MgSO ₄ 7H ₂ O
4,15 mM	NaHCO ₃
20,85 mM	HEPES
23,28 mM	Sodium-Laktat
0,33 mM	Sodium-pyruvat
5,56 mM	Glukose
4 g/l	Rinderserumalbumin
0,06 g/l	Penicillin G potassium salt
0,05 g/l	Streptomycin sulfat
0,01 g/l	Phenol Red

mit doppelt destilliertem Wasser auf 1l auffüllen.

5.10 „whole-mount“-Lac Z-Färbung

Embryonen entnehmen, in PBS waschen und je nach Alter bei 4°C in 4% PFA fixieren. Anschließend werden sie wieder in PBS gewaschen, ehe sie über Nacht bei 37°C in Färbelösung inkubiert werden. Nach der Färbung werden die Embryonen wieder in PBS gewaschen und mit 4% PFA nachfixiert. Danach können sie in 70% Ethanol gelagert werden.

Färbelösung:

4	mM	K ₃ (Fe(CN) ₆)
4	mM	K ₄ (Fe(CN) ₆)
2	mM	MgCl ₂
2	mM	EGTA
0,02	%	NP-40
0,01	%	Na-Deoxycholat
0,4	mg/ml	X-Gal in DMSO
		in PBS

5.11 *in vitro*-Kultur von Blastozysten („outgrowth“-Experiment)

Die Blastozysten werden dem Muttertier entnommen und steril in die Vertiefungen einer Multititerplatte überführt. Nach Hinzufügen von ES-Zell-Medium ohne Zusatz von Lif werden die Blastozysten in einer feuchten Atmosphäre bei 37°C unter Zufuhr von 5% CO₂ mehrere Tage inkubiert. Zur Kontrolle des Differenzierungsverhaltens werden sie alle 24 Stunden fotografiert.

ES-Zell-Medium:

500	ml	DMEM mit 4,5g/l Glukose (Gibco)
6	ml	Glutamin (100mM)
6	µl	β-ME (7µl β-Mercaptoethanol in 10ml PBS)
6	ml	Na-Pyruvat (100x)
6	ml	Aminosäuren (100x)
90	ml	fetales Kälberserum (30min bei 50°C hitzeinaktiviert; Gibco)

Medium filtersterilisieren und bei 4°C aufbewahren.

**5.12 4',6'-Diamino-2-phenylindol (DAPI)-
Färbung von Blastozysten**

Blastozysten werden mit M2-Medium aus dem Uterus des Muttertieres ausgespült (siehe Blastozystenentnahme). Die Zona pellucida wird mittels 3-10minütiger Inkubation in Pronase-Lösung bei 37°C entfernt. Anschließend werden die Blastozysten über Nacht in 4% PFA (in PBS) bei 4°C fixiert. Danach werden sie zunächst in Lösung 1 gespült, ehe sie nochmals in PBS gewaschen und dann in einen Tropfen PBS auf einen TESPA-Objektträger gebracht werden. Dieser wird bei RT inkubiert, bis der Tropfen getrocknet ist. Auf die

getrockneten Blastozysten wird für 10min Hoechst 33258 (Vectashield/H-1200) gebracht. Dann wird der Objektträger mehrfach in PBS gewaschen, ehe die gefärbten Blastozysten unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Pronaselösung: 0,5 % in M2-Medium
Um Nukleasen und andere Kontaminationen zu entfernen, wird die Lösung 30min bei RT inkubiert.
Anschließend wird unlösliches Material durch Zentrifugation entfernt. Nach Filtersterilisation wird die Lösung in Aliquots eingeteilt, ehe sie bei -20°C gelagert werden.

Lösung 1: 50 mM Tris (pH7,5)
150 mM NaCl
1 % NP-40
in PBS

5.13 TUNEL-Färbung (nach Gavrieli et al., Ferrer et al.) (Endlabeling und Detektion fragmentierter DNA)

Die Paraffinschnitte werden mit Xylol 10min entparaffiniert und mit abfallender Ethanolreihe (100%, 96%, 80%, 70%, H₂O) rehydriert. Die Zellen werden dann 5min bei RT mit Proteinase K (20µg/ml in H₂O) anverdaut und durch 5minütige Inkubation in 2% H₂O₂ gebleicht. Danach werden sie 15min mit TdT-Puffer gewaschen und mit 2xTdT-Mix und einem Deckglas bedeckt für 60min bei 37°C in eine feuchten Kammer gebracht. Anschließend kommen die Schnitte 15min bei RT in 2x SSC, 10min in 2% BSA-Lösung (in H₂O) und 5min in PBS, ehe sie zur Biotin-Detektion 30min bei RT mit AB-Lösung (Vecta Stain Elit kit; Serva) bedeckt werden. Danach werden sie 3x kurz in PBS gewaschen und das Signal mittels Diaminobenzidin (DAB)-Substrat (Boehringer Mannheim) sichtbar gemacht (5-15min).

Zur Entfernung von DAB werden die Schnitte erneut gewaschen und durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 80%, 96%, 100%) und 5min. Xylol dehydriert, ehe sie mit Eukitt eingedeckt werden.

1X TdT-Puffer:

200	mM	Cacodylic Acid
200	mM	KCl
25	mM	Tris oder Trizma (pH 6,6)
1,25	mg/ml	Rinderserumalbumin (kurz vorher hinzufügen)

TdT-Mix:

7 μ l Biotin-16-UTP
 2 μ l Terminale-Deoxynukleotidyl- Transferase (TdT)
 in 500 μ l 5x TdT-Puffer

2x SSC:

300 mM NaCl
 30 mM Sodium Citrate

5.14 Bromodeoxyuridin (BrdU)-Färbung

Bromodeoxyuridin wird in proliferierenden Zellen (S-Phase) während der DNA-Replikation inkorporiert. Es kann nachfolgend durch einen monoklonalen Antikörper, der gegen BrdU gerichtet ist, detektiert und über Streptavidin-Peroxidase und Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht werden.

Zunächst wird schwangeren Mäusen 30 min vor cervicaler Dislokation intraperitoneal eine BrdU-Lösung injiziert.

Anschließend werden die Embryonen entnommen, in Paraffin eingebettet und geschnitten.

Die Paraffinschnitte werden wie bei anderen Immunfärbungen behandelt (siehe 5.8.1). Zur Markierung des BrdUs wird ein biotinylierter, monoklonaler anti-BrdU-Antikörper (Biotinylated Mouse anti-BrdU; BrdU Staining Kit; Calbiochem) verwendet. Durch die Kopplung an Biotin ist somit kein zweiter Antikörper notwendig, und die Schnitte können direkt mit der ABC-Lösung des Vecta Stain Elite Kits (Serva) weiterbehandelt werden. Das Signal wird mittels Diaminobenzidin (DAB)-Substrat (Boehringer Mannheim) sichtbar gemacht.

Die Objektträger werden dann wie andere Paraffinschnitte nach Immunohistochemischer Färbung mit PBS gewaschen und durch einen Alkoholgradienten und Xylol dehydriert, ehe sie mit Eukitt eingedeckt werden (siehe 5.8.1).

BrdU-Lösung:

60ng/kg Bromodesoxyuridin
 (Stocklsg. 18mg/ml; Calbiochem)
 6ng/kg 5-Fluoro-2-Deoxyuridin
 (Stocklsg. 72mg/ml; Sigma)
 ad 120 μ l PBS

5.15 *in situ* Hybridisierung

Alle Lösungen außer Tris müssen Depc behandelt werden.

5.15.1 Isolierung der Embryonen

Die Mäuse werden am frühen Morgen auf Vaginalproben untersucht. Embryonen, die um 12.00 Uhr entnommen werden, datiert man mit 9,5 Tagen, 10,5 Tagen usw., die um 18.00 Uhr mit 9 Tagen, 10 Tagen usw.. Jüngere Embryonen, 6-9 Tage, sollten mindestens alle 2-4 Stunden isoliert werden, um alle Stadien während der Entwicklung zu erhalten.

Die Embryonen werden aus dem Uterus entnommen und in eiskalte phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; Sambrook et al), die einen pH-Wert von 7,2 besitzt und Depc behandelt wurde, überführt.

Daraufhin werden alle extraembryonalen Membranen entfernt. Es muß zügig gearbeitet werden. Danach werden die Embryonen in eiskaltem 4%igem Paraformaldehyd (PFA), das einen pH-Wert von 7,2 besitzt, über Nacht fixiert.

Mit Embryonen im Alter von 10-16 Tagen wird wie folgt vorgegangen, jüngere oder ältere benötigen entsprechend kürzere oder längere Inkubationszeiten.

5.15.2 Einbetten der Embryonen

Nach der Fixierung folgen Waschschriffe mit PBS und 0,85%iger (w/v) Natriumchloridlösung bzw. einem Gemisch aus Natriumchlorid und Ethanol. Anschließend werden die Embryonen mittels einer Ethanolreihe (2x70%, 85%, 95%, 3x100%) jeweils bis zu einer Stunde dehydriert. Ehe die Embryonen in warmen Paraffin eingebettet werden, müssen sie noch Xylen behandelt werden.

5.15.3 TESPА-Behandlung der Objektträger

Die Objektträger müssen zuerst mit einer 10%igen Salzsäurelösung in 70%igem Ethanol von Staub befreit und danach kurz in Depc-Wasser gespült werden. Anschließend werden sie etwa 10 Sekunden in 95%igem Ethanol gewaschen, ehe sie 5 Minuten bei 150°C im Ofen gebacken werden. Nachdem die Objektträger wieder auf Raumtemperatur abgekühlt sind, werden sie zum Beschichten kurz in 2%ige TESPА-Lösung in Azeton gebracht. Anschließend werden sie kurz zweimal in Azeton und einmal in Depc-Wasser gewaschen. Zum Trocknen werden die Objektträger über Nacht bei 42°C im Ofen gebacken.

TESPA:

2% 3-Aminopropyl-trimethoxy-silan in Aceton

5.15.4 Anfertigen der Paraffinschnitte

Von dem in Paraffin eingebetteten Gewebe werden mit dem Microtom (Leica) 6 µm dicke Schnitte angefertigt, die direkt auf ein 48°C warmes Wasserbad (Depc-Wasser) überführt werden. Auf die Objektträger übertragen, müssen die Schnitte mindestens sechs Stunden oder über Nacht im Ofen bei 60°C backen. Danach können sie wasserfrei gelagert werden.

5.15.5 Radioaktive Markierung der Sonde (Riboprobe)

2µl (=0,5-1mg) DNA-Matrizenstrang werden in folgendem Ansatz inkubiert: 4µl 5x Polymerase Puffer, 2µl Nukleotidmix (rATP, rGTP, rCTP/3,3mM), 0,2µl DTT (1M), 1µl RNase-Inhibitor (30U/ml; Promega), 10µl radioaktives $\alpha^{35}\text{S}$ -UTP (10mCi/ml) und 1µl RNA-Polymerase (10U/ml).

Der Ansatz wird nun bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Danach wird der Einbau des markierten Nukleotids mittels Dünnschichtchromatographie getestet.

Um die DNA Matrize zu entfernen, werden dem Ansatz 1µl DNase I, 24µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{Depc}}$, 3µl 10x DNase I-Puffer und 1µl Hefe-tRNA (20mg/ml) hinzugefügt und weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

Anschließend wird die Nukleinsäure mit 25µl Ammoniumacetat (7,5M) und 45µl Isopropanol 30 Minuten auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation der Fällung wird der Niederschlag mit 80%igem Ethanol (in $\text{H}_2\text{O}_{\text{Depc}}$) gewaschen, mittels Vakuum-Zentrifuge getrocknet und in 100µl Depc-Wasser aufgenommen.

Die Größe der Sonde sollte 200bp betragen, größere Stränge werden entsprechend mit 0,1N NaOH auf Eis inkubiert. Die Dauer der Inkubation richtet sich nach der Länge des Fragments und wird wie folgt berechnet:

$$t = L_0 - L_f / (K \times L_0 \times L_f)$$

t = Zeit in Minuten

L_0 : Anfangslänge des Fragments in kb

L_f : benötigte Fragmentlänge in kb (normalerweise 200bp)

K : Konstante 0,1101/(kb x min)

Anschließend wird die RNA wieder mit 1µl Hefe-tRNA, 100µl 7,5M Ammoniumazetat, 750µl Ethanol und 3,3µl DTT (1M) über Nacht bei -20°C gefällt.

Der Ansatz wird dann für 30 Minuten zentrifugiert, der Niederschlag mit 600µl 80% Ethanol gewaschen, in der Vakuum-Zentrifuge (speed vac) getrocknet und in 50µl DTT (100mM) eine Stunde auf Eis gelöst. Ein Mikroliter wird daraufhin in 5 ml Scintillationsflüssigkeit im Zähler gezählt und auf die Menge (ng) der Sonde umgerechnet. Die Sonde wird dann in Hybridisierungsmix aufgenommen, so daß sich eine Konzentration von 60ng/ml ergibt.

50 x Denhardts:

10	g/l	Ficoll
10	g/l	Polyvinylpyrrolidon
10	g/l	Rinderserumalbumin (BSA)

wird steril filtriert und anschließend bei -20°C gelagert

Hybridisierungsmix:

1	ml	10 x Salz
5	ml	deionisiertes Formamid
0,2	ml	50 x Denhardts
0,5	ml	Hefe tRNA (Stammlösung 20mg/ml, in H ₂ O _{Depc})
2	ml	Dextransulfat (Stammlösung 50%)
0,1	ml	DTT (Dithiothreitol, Stammlösung 1M)
<u>1,2</u>	<u>ml</u>	<u>H₂O_{Depc}</u>
10	ml	

vortexen, bei -20°C aufbewahren

5.15.6 Prehybridisierung

Um das Paraffin von den Schnitten zu entfernen, werden die Objektträger zweimal 10 Minuten Xylen ausgesetzt, danach in einer Ethanolreihe (100%, 100%, 95%, 80%, 60%, 30%, H₂O_{Depc}) rehydriert. Damit die Zellen für die Sonde aufgeschlossen werden, folgt für eine halbe Stunde bei 37°C eine Proteinase K Behandlung mit 1mg/ml Proteinase K in 100mMTris/50mM EDTA in Depc-Wasser. Das Enzym wird durch kurzes Spülen in PBS von den Schnitten entfernt, die daraufhin in 4% PFA fixiert werden. Nach der Fixierung werden die Objektträger 10 Minuten in TEA, 10 Minuten in TEA mit 875ml Essigsäureanhydrid und 10 Minuten mit 1750ml Essigsäureanhydrid gelassen, ehe sie nach kurzem Spülen in Depc-Wasser durch eine aufsteigende Ethanolreihe (30%, 60%, 85%, 90%, 100%) wieder dehydriert werden.

Auf die so behandelten Schnitte werden dann, je nach Größe des Gewebes, 5-15ml Sonde aufgetragen, die wiederum mit Parafilm abgedeckt wird.

50mM Tris/5mM EDTA:

25 ml Tris (1M Stammlösung)
 5 ml EDTA (0,5M Stammlösung)
 auf 450ml mit Depc-Wasser auffüllen
 pH 7,2 einstellen
 ad 500ml mit Depc-Wasser

10 x PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung):

Nach Dulbecco (1954), allerdings ohne zweiwertige Metallionen (Ca^{2+} , Mg^{2+})

80 g/l NaCl
 2,0 g/l KCl
 14,4 g/l Na_2HPO_4
 2,4 g/l KH_2PO_4

in 800ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{Depc}}$ lösen, pH auf 7,2 mit HCl einstellen und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Depc}}$ auf 1000ml auffüllen.

4% PFA:

250ml 1 x PBS (pH 7,2) auf ca. 60°C erhitzen, ca. 10 Tropfen 10N NaOH und danach 10 g Paraformaldehyd zugeben. Das PFA unter Schütteln lösen, die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen lassen, mit konz. HCl pH 7,2 einstellen.

TEA: 13,3 ml/l Triethanolamin

pH mit HCl auf 8-8,5 einstellen und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Depc}}$ ad 1000ml auffüllen.

5.15.7 Hybridisierung

Die Objektträger mit Gewebeschnitten und Sonde werden in einer feuchten Kammer (50% Formamid, 2x SSC) bei 58°C mindestens 12 Stunden hybridisiert.

Lösung für feuchte Hybridisierungsbox:

Vollgesaugtes Whatman (3MM)-Papier in Hybridisierungsbox legen

5 x SSC
 50% Formamid

5.15.8 Posthybridisierung

Die Objektträger werden 20 Minuten bis eine Stunde bei 58°C in 1 x Salz/50% FA/10mM DTT getaucht, um den Parafilm zu entfernen. Anschließend wird die Lösung gegen frische 1 x Salz/50% FA/10mM DTT-Lösung ausgetauscht und bei 64-68°C für eine Stunde inkubiert. Da das DTT die RNase A inhibieren würde, werden die Objektträger zunächst zweimal 15min in NTE bei 37°C gespült und daraufhin 30min bei 37°C in NTE mit 12,5mg/250ml RNase A (Stammlösung 20mg/ml) getaucht. Um die RNase A wieder vollständig zu entfernen, kommen die Schnitte erneut für 15min bei 37°C in NTE. Anschließend werden sie wieder für 1 Stunde bei 64-68°C in 1 x Salz/50% FA/10mM DTT inkubiert. Die Objektträger kommen daraufhin für 15min bei Raumtemperatur in 2 x SSC, 15min bei 50°C in 0,1 x SSC und 30min bei Raumtemperatur in 0,1 x SSC ehe sie in einminütigen Schritten in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 60%, 80%, 95%, 100%, 100%), die 0,3M Ammoniumacetat enthält, wieder dehydriert und werden.

deionisiertes Formamid:

Formamid wird mit Ionenaustauscher versetzt (deionisiert), bei -4°C gelagert und vor Gebrauch gefiltert.

10 x Salz:

3	M	NaCl
0,1	M	NaPO ₄ (pH 6,8)
0,05	M	EDTA
0,2	M	Tris (pH 6,8)

20 x SSC (standard saline-citrate):

88,2	g/l	NatriumCitrat
175,32	g/l	NaCl

1 x Salz/50% Formamid/10mM DTT:

100	ml/l	10 x Salz
500	ml/l	deionisiertes Formamid
390	ml/l	H ₂ O _{Depc}

erst kurz vor Gebrauch werden 10 ml DTT (Dithiothreitol, 1M Stammlösung) hinzugegeben.

NTE:

100	ml/l	5M NaCl
10	ml/l	1M Tris (pH 7,5)
10	ml/l	0,5M EDTA

Ethanolreihe mit 0,3M Ammoniumacetat:

4 Lösungen: 30%, 60%, 80% und 95% Ethanol (p.a.), jeweils mit 0,3M Ammoniumacetat (Stammlösung 6M)

Die Ethanolreihe kann maximal für 3 Posthybridisierungen wiederverwendet werden.

5.15.9 Autoradiographie und Auftragen der Filmemulsion

Die staubfrei getrockneten Objektträger werden über Nacht auf einen Kodak XAR Film exponiert. Die Schwärzung auf dem Film ist ein erster Hinweis auf die zu erwartende Signalintensität und ermöglicht eine Kalkulation der Expositionszeit in der Photoemulsion.

Die Objektträger werden in 42°C warme Kodak NTB2 Emulsion getaucht (1:1 mit 0,6M NH₄Acetat verdünnt), für ca. 3 Stunden in eine feuchte Kammer gestellt und dann mindestens 3 Stunden bis über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend werden sie 7-14 Tage bei 4°C inkubiert.

5.15.10 Entwickeln der Objektträger

Die Entwicklung erfolgt für 3 Minuten in Kodak D19 Entwickler (1:1 Verdünnung mit Wasser). Die Objektträger werden nach einminütigem Spülen in Leitungswasser in Kodakfix (1:5 Verdünnung mit Wasser) für 4 Minuten fixiert und zuletzt wieder in Wasser gespült. Alle Lösungen sollten eine Temperatur von 15°C haben. Die Schnitte werden dann mit Eosin/Haematoxylin angefärbt.

6. Literaturverzeichnis

- Akimaru H, Hou Dx, et al. (1997). "Drosophila CBP is required for dorsal-dependent twist gene expression." Nat Genet **17**(2): 211-4.
- Alberts As, Montminy M, et al. (1994). "Expression of a peptide inhibitor of protein phosphatase 1 increases phosphorylation and activity of CREB in NIH 3T3 fibroblasts." Mol Cell Biol **14**(7): 4398-407.
- Arany Z, Sellers Wr, et al. (1994). "E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators [letter]." Cell **77**(6): 799-800.
- Arias J, Alberts As, et al. (1994). "Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor [see comments]." Nature **370**(6486): 226-9.
- Bannister Aj and Kouzarides T (1996). "The CBP co-activator is a histone acetyltransferase." Nature **384**(6610): 641-3.
- Barton K, Muthusamy N, et al. (1996). "Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB." Nature **379**(6560): 81-5.
- Bartsch D, Ghirardi M, et al. (1995). "Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change." Cell **83**(6): 979-92.
- Beddington RSP, L. K. (1990). Clonal analysis of cell lineages. Postimplantation mammalian Embryos. A. Copp, Cockroft DL. Oxford, IRL Press: 267-292.
- Berkowitz La and Gilman Mz (1990). "Two distinct forms of active transcription factor CREB (cAMP response element binding protein)." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5258-62.

- Bito H, Deisseroth K, et al. (1996). "CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression." Cell **87**(7): 1203-14.
- Blendy Ja, Kaestner Kh, et al. (1996). "Targeting of the CREB gene leads to up-regulation of a novel CREB mRNA isoform." EMBO J **15**(5): 1098-106.
- Blendy Ja, Kaestner Kh, et al. (1996). "Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene." Nature **380**(6570): 162-5.
- Bourtchuladze R, Frenguelli B, et al. (1994). "Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein." Cell **79**(1): 59-68.
- Brindle P, Linke S, et al. (1993). "Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors." Nature **364**(6440): 821-4.
- Brown Ad, Lopez Terrada D, et al. (1995). "Promoters containing ATF-binding sites are deregulated in cells that express the EWS/ATF1 oncogene." Oncogene **10**(9): 1749-56.
- Chung Eb and Enzinger Fm (1983). "Malignant melanoma of soft parts. A reassessment of clear cell sarcoma." Am J Surg Pathol **7**(5): 405-13.
- Dash Pk, Karl Ka, et al. (1991). "cAMP response element-binding protein is activated by Ca2+/calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 5061-5.
- de Groot Rp, Ballou Lm, et al. (1994). "Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase: an alternative route to mitogen-induced gene expression." Cell **79**(1): 81-91.
- Deak M, Clifton Ad, et al. (1998). "Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB." EMBO J **17**(15): 4426-41.

- Delegeane Am, Ferland Lh, et al. (1987). "Tissue-specific enhancer of the human glycoprotein hormone alpha-subunit gene: dependence on cyclic AMP-inducible elements." Mol Cell Biol **7**(11): 3994-4002.
- Deleu L, Fuks F, et al. (1998). "Opposite transcriptional effects of cyclic AMP-responsive elements in confluent or p27KIP-overexpressing cells versus serum-starved or growing cells." Mol Cell Biol **18**(1): 409-19.
- Delmas V, Laoide Bm, et al. (1992). "Alternative usage of initiation codons in mRNA encoding the cAMP-responsive-element modulator generates regulators with opposite functions." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4226-30.
- Deutsch Pj, Hoeffler Jp, et al. (1988). "Structural determinants for transcriptional activation by cAMP-responsive DNA elements." J Biol Chem **263**(34): 18466-72.
- Ducibella T and Anderson E (1975). "Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst." Dev Biol **47**(1): 45-58.
- Dziadek M (1978). "Modulation of alphafetoprotein synthesis in the early postimplantation mouse embryo." J Embryol Exp Morphol **46**: 135-46.
- Eckner R, Ewen Me, et al. (1994). "Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor." Genes Dev **8**(8): 869-84.
- Epstein Al, Martin Ao, et al. (1984). "Use of a newly established human cell line (SU-CCS-1) to demonstrate the relationship of clear cell sarcoma to malignant melanoma." Cancer Res **44**(3): 1265-74.
- Fentzke Rc, Korcarz Ce, et al. (1998). "Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart." J Clin Invest **101**(11): 2415-26.

- Feuerstein N, Huang D, et al. (1995). "Regulation of cAMP-responsive enhancer binding proteins during cell cycle progression in T lymphocytes stimulated by IL-2." J Immunol **154**(1): 68-79.
- Feuerstein N, Huang D, et al. (1995). "Rapamycin selectively blocks interleukin-2-induced proliferating cell nuclear antigen gene expression in T lymphocyte. Evidence for inhibition of CREB/ATF binding activities." J Biol Chem **270**(16): 9454-8.
- Finkbeiner S, Tavazoie Sf, et al. (1997). "CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses." Neuron **19**(5): 1031-47.
- Flint Kj and Jones Nc (1991). "Differential regulation of three members of the ATF/CREB family of DNA-binding proteins." Oncogene **6**(11): 2019-26.
- Foulkes Ns, Borrelli E, et al. (1991). "CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription." Cell **64**(4): 739-49.
- Foulkes Ns, Laoide Bm, et al. (1991). "Transcriptional antagonist cAMP-responsive element modulator (CREM) down-regulates c-fos cAMP-induced expression." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(12): 5448-52.
- Foulkes Ns, Mellstrom B, et al. (1992). "Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator." Nature **355**(6355): 80-4.
- Foulkes Ns and Sassone Corsi P (1992). "More is better: activators and repressors from the same gene." Cell **68**(3): 411-4.
- Foulkes Ns, Schlotter F, et al. (1993). "Pituitary hormone FSH directs the CREM functional switch during spermatogenesis." Nature **362**(6417): 264-7.
- Galliot B, Welschof M, et al. (1995). "The cAMP response element binding protein is involved in hydra regeneration." Development **121**(4): 1205-16.

- Gamow Ei and Prescott Dm (1970). "The cell life cycle during early embryogenesis of the mouse." Exp Cell Res **59**(1): 117-23.
- Ghosh A and Greenberg Me (1995). "Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences." Science **268**(5208): 239-47.
- Ghosh A and Greenberg Me (1995). "Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis [see comments]." Neuron **15**(1): 89-103.
- Ginty Dd, Bonni A, et al. (1994). "Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB." Cell **77**(5): 713-25.
- Ginty Dd, Kornhauser Jm, et al. (1993). "Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock." Science **260**(5105): 238-41.
- Girard F, Strausfeld U, et al. (1991). "Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts." Cell **67**(6): 1169-79.
- Gonzalez Ga and Montminy Mr (1989). "Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133." Cell **59**(4): 675-80.
- Griswold Md (1995). "Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis." Biol Reprod **52**(2): 211-6.
- Grunstein M (1997). "Histone acetylation in chromatin structure and transcription." Nature **389**(6649): 349-52.
- Gu H, Marth Jd, et al. (1994). "Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting [see comments]." Science **265**(5168): 103-6.
- Hagiwara M, Alberts A, et al. (1992). "Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB." Cell **70**(1): 105-13.

- Hai T and Curran T (1991). "Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3720-4.
- Harootunian At, Adams Sr, et al. (1993). "Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion." Mol Biol Cell **4**(10): 993-1002.
- Henery, C. C., J. B. Bard, et al. (1992). "Tetraploidy in mice, embryonic cell number, and the grain of the developmental map." Dev Biol **152**(2): 233-41.
- Herber B, Truss M, et al. (1994). "Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter." Oncogene **9**(7): 2105-7.
- Herber B, Truss M, et al. (1994). "Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter [published erratum appears in Oncogene 1994 Jul;9(7):2105-7]." Oncogene **9**(4): 1295-304.
- Hsueh Yp and Lai Mz (1995). "Overexpression of activation transcriptional factor 1 in lymphomas and in activated lymphocytes." J Immunol **154**(11): 5675-83.
- Huang D, Shipman Appasamy Pm, et al. (1994). "Promoter activity of the proliferating-cell nuclear antigen gene is associated with inducible CRE-binding proteins in interleukin 2-stimulated T lymphocytes." Mol Cell Biol **14**(6): 4233-43.
- Hummler E, Cole Tj, et al. (1994). "Targeted mutation of the CREB gene: compensation within the CREB/ATF family of transcription factors." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(12): 5647-51.
- Hurst Hc, Masson N, et al. (1990). "The cellular transcription factor CREB corresponds to activating transcription factor 47 (ATF-47) and forms complexes with a group of polypeptides related to ATF-43." Mol Cell Biol **10**(12): 6192-203.

- Hurst Hc, Totty Nf, et al. (1991). "Identification and functional characterisation of the cellular activating transcription factor 43 (ATF-43) protein." Nucleic Acids Res **19**(17): 4601-9.
- Iordanov M, Bender K, et al. (1997). "CREB is activated by UVC through a p38/HOG-1-dependent protein kinase." EMBO J **16**(5): 1009-22.
- Jameson JI, Jaffe Rc, et al. (1986). "Transcriptional regulation of chorionic gonadotropin alpha- and beta-subunit gene expression by 8-bromo-adenosine 3',5'-monophosphate." Endocrinology **119**(6): 2560-7.
- Janknecht R and Hunter T (1996). "Versatile molecular glue. Transcriptional control." Curr Biol **6**(8): 951-4.
- Jean D, Harbison M, et al. (1998). "CREB and its associated proteins act as survival factors for human melanoma cells." J Biol Chem **273**(38): 24884-90.
- Johansson, B. M. and M. V. Wiles (1995). "Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development." Mol Cell Biol **15**(1): 141-51.
- Kanatsu, M. and S. I. Nishikawa (1996). "In vitro analysis of epiblast tissue potency for hematopoietic cell differentiation." Development **122**(3): 823-30.
- Kee BI, Arias J, et al. (1996). "Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator." J Biol Chem **271**(5): 2373-5.
- Kwok Rp, Lundblad Jr, et al. (1994). "Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB [see comments]." Nature **370**(6486): 223-6.
- Lawson, K. A., J. J. Meneses, et al. (1991). "Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo." Development **113**(3): 891-911.
- Lawson, K. A. and R. A. Pedersen (1992). "Clonal analysis of cell fate during gastrulation and early neurulation in the mouse." Ciba Found Symp **165**: 3-21; discussion 21-6.

- Lee Ka, Fink Js, et al. (1989). "Distinguishable promoter elements are involved in transcriptional activation by E1a and cyclic AMP." Mol Cell Biol **9**(10): 4390-7.
- Lee Ka, Hai Ty, et al. (1987). "A cellular protein, activating transcription factor, activates transcription of multiple E1A-inducible adenovirus early promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(23): 8355-9.
- Lee Ka and Masson N (1993). "Transcriptional regulation by CREB and its relatives." Biochim Biophys Acta **1174**(3): 221-33.
- Lin Ys and Green Mr (1988). "Interaction of a common cellular transcription factor, ATF, with regulatory elements in both E1a- and cyclic AMP-inducible promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(10): 3396-400.
- Liu F, Thompson Ma, et al. (1993). "Activating transcription factor-1 can mediate Ca(2+)- and cAMP-inducible transcriptional activation." J Biol Chem **268**(9): 6714-20.
- Mac Auley, A., Z. Werb, et al. (1993). "Characterization of the unusually rapid cell cycles during rat gastrulation." Development **117**(3): 873-83.
- Maldonado R, Blendy Ja, et al. (1996). "Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB [see comments]." Science **273**(5275): 657-9.
- Masson N, Ellis M, et al. (1992). "Cyclic AMP response element-binding protein and the catalytic subunit of protein kinase A are present in F9 embryonal carcinoma cells but are unable to activate the somatostatin promoter." Mol Cell Biol **12**(3): 1096-106.
- Masson N, Hurst Hc, et al. (1993). "Identification of proteins that interact with CREB during differentiation of F9 embryonal carcinoma cells [corrected and republished with original paging, article originally printed in Nucleic Acids Res 1993 Mar 11;21(5):1163-9]." Nucleic Acids Res **21**(11): 1163-9.
- Masson N, John J, et al. (1993). "In vitro phosphorylation studies of a conserved region of the transcription factor ATF1." Nucleic Acids Res **21**(18): 4166-73.

- McLaren A and Smith R (1977). "Functional test of tight junctions in the mouse blastocyst." Nature **267**(5609): 351-3.
- Means Ar and Huckins C "Coupled events in the early biochemical actions of FSH on the Sertoli cells of the testis. pp. 145-65." .
- Means Ar and Huckins C (1974). "Coupled events in the early biochemical actions of FSH on the Sertoli cells of the testis." Curr Top Mol Endocrinol **1**: 145-65.
- Moley Kh and Schreiber Jr (1995). "Ovarian follicular growth, ovulation and atresia. Endocrine, paracrine and autocrine regulation." Adv Exp Med Biol **377**: 103-19.
- Molina Ca, Foulkes Ns, et al. (1993). "Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor." Cell **75**(5): 875-86.
- Monaghan, A. P., K. H. Kaestner, et al. (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**(3): 567-78.
- Montminy M (1997). "Transcriptional regulation by cyclic AMP." Annu Rev Biochem **66**: 807-22.
- Montminy Mr, Sevarino Ka, et al. (1986). "Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(18): 6682-6.
- Moore Ks, Sullivan K, et al. (1987). "Proliferating cell nuclear antigen/cyclin is an interleukin 2-responsive gene." J Biol Chem **262**(18): 8447-50.
- Mukherjee A, Park Sarge Ok, et al. (1996). "Gonadotropins induce rapid phosphorylation of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in ovarian granulosa cells." Endocrinology **137**(8): 3234-45.

- Mukherjee A, Urban J, et al. (1998). "Gonadotropins regulate inducible cyclic adenosine 3',5'-monophosphate early repressor in the rat ovary: implications for inhibin alpha subunit gene expression." Mol Endocrinol **12**(6): 785-800.
- Mukherjee Ab (1976). "Cell cycle analysis and X-chromosome inactivation in the developing mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(5): 1608-11.
- Murphy M, Stinnakre Mg, et al. (1997). "Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene." Nat Genet **15**(1): 83-6.
- Muthusamy N and Leiden Jm (1998). "A protein kinase C-, Ras-, and RSK2-dependent signal transduction pathway activates the cAMP-responsive element-binding protein transcription factor following T cell receptor engagement." J Biol Chem **273**(35): 22841-7.
- Nakajima T, Uchida C, et al. (1997). "RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II." Cell **90**(6): 1107-12.
- Nakajima T, Uchida C, et al. (1997). "Analysis of a cAMP-responsive activator reveals a two-component mechanism for transcriptional induction via signal-dependent factors." Genes Dev **11**(6): 738-47.
- Nakamura T, Okuyama S, et al. (1995). "Down-regulation of the cyclin A promoter in differentiating human embryonal carcinoma cells is mediated by depletion of ATF-1 and ATF-2 in the complex at the ATF/CRE site." Exp Cell Res **216**(2): 422-30.
- Nantel F, Monaco L, et al. (1996). "Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice." Nature **380**(6570): 159-62.
- Nichols M, Weih F, et al. (1992). "Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription." EMBO J **11**(9): 3337-46.

- Ogryzko Vv, Schiltz Rl, et al. (1996). "The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases." Cell **87**(5): 953-9.
- Pagano M, Pepperkok R, et al. (1992). "Cyclin A is required at two points in the human cell cycle." EMBO J **11**(3): 961-71.
- Pan S, Ming Ky, et al. (1998). "The EWS/ATF1 fusion protein contains a dispersed activation domain that functions directly." Oncogene **16**(12): 1625-31.
- Parker D, Ferreri K, et al. (1996). "Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism." Mol Cell Biol **16**(2): 694-703.
- Pei L, Dodson R, et al. (1991). "Regulation of the alpha inhibin gene by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate after transfection into rat granulosa cells." Mol Endocrinol **5**(4): 521-34.
- Pende M, Fisher Tl, et al. (1997). "Neurotransmitter- and growth factor-induced cAMP response element binding protein phosphorylation in glial cell progenitors: role of calcium ions, protein kinase C, and mitogen-activated protein kinase/ribosomal S6 kinase pathway." J Neurosci **17**(4): 1291-301.
- Peunova N and Enikolopov G (1993). "Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells [published erratum appears in Nature 1993 Sep 30;365(6445):468]." Nature **364**(6436): 450-3.
- Poelmann, R. E. (1980). "Differential mitosis and degeneration patterns in relation to the alterations in the shape of the embryonic ectoderm of early post-implantation mouse embryos." J Embryol Exp Morphol **55**: 33-51.
- Poelmann, R. E. (1981). "The formation of the embryonic mesoderm in the early post-implantation mouse embryo." Anat Embryol Berl **162**(1): 29-40.

- Quinn Pg (1993). "Distinct activation domains within cAMP response element-binding protein (CREB) mediate basal and cAMP-stimulated transcription." J Biol Chem **268**(23): 16999-7009.
- Rehfuss Rp, Walton Km, et al. (1991). "The cAMP-regulated enhancer-binding protein ATF-1 activates transcription in response to cAMP-dependent protein kinase A." J Biol Chem **266**(28): 18431-4.
- Rudolph D, Tafuri A, et al. (1998). "Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4481-6.
- Ruppert S, Cole Tj, et al. (1992). "Multiple mRNA isoforms of the transcription activator protein CREB: generation by alternative splicing and specific expression in primary spermatocytes." EMBO J **11**(4): 1503-12.
- Sasaki, H. and B. L. Hogan (1993). "Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo." Development **118**(1): 47-59.
- Sellens Mh, Stein S, et al. (1981). "Protein and free amino acid content in preimplantation mouse embryos and in blastocysts under various culture conditions." J Reprod Fertil **61**(2): 307-15.
- Shawlot, W. and R. R. Behringer (1995). "Requirement for Lim1 in head-organizer function [see comments]." Nature **374**(6521): 425-30.
- Sheng M, Thompson Ma, et al. (1991). "CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases." Science **252**(5011): 1427-30.
- Shimomura A, Okamoto Y, et al. (1998). "Dominant negative ATF1 blocks cyclic AMP-induced neurite outgrowth in PC12D cells." J Neurochem **70**(3): 1029-34.

- Shipman Appasamy P, Cohen Ks, et al. (1990). "Interleukin 2-induced expression of proliferating cell nuclear antigen is regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms." J Biol Chem **265**(31): 19180-4.
- Smith Ka (1988). "The interleukin 2 receptor." Adv Immunol **42**: 165-79.
- Smith Ka (1988). "Interleukin-2: inception, impact, and implications." Science **240**(4856): 1169-76.
- Smith R and McLaren A (1977). "Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoele." J Embryol Exp Morphol **41**: 79-92.
- Snow, M. H. (1981). "Autonomous development of parts isolated from primitive-streak-stage mouse embryos. Is development clonal?" J Embryol Exp Morphol **65 Suppl**: 269-87.
- Snow, M. H. L. (1976). Embryo growth during immediate postimplantation period. Embryogenesis in mammals. C. F. Symp. Amsterdam, Elsevier. **40**: 53-70.
- Snow, M. H. L. (1977). "Gastrulation in the mouse: growth and regionalisation of the epiblast." J. Embryol. Exp. Morph. **42**: 293-303.
- Stehle Jh, Foulkes Ns, et al. (1993). "Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland [see comments]." Nature **365**(6444): 314-20.
- Struthers Rs, Vale Ww, et al. (1991). "Somatotroph hypoplasia and dwarfism in transgenic mice expressing a non-phosphorylatable CREB mutant." Nature **350**(6319): 622-4.
- Sun P, Enslen H, et al. (1994). "Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity." Genes Dev **8**(21): 2527-39.
- Sweeney C, Murphy M, et al. (1996). "A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse." Development **122**(1): 53-64.

- Tam, P. P. and S. X. Zhou (1996). "The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo." Dev Biol **178**(1): 124-32.
- Tan Y, Rouse J, et al. (1996). "FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2." EMBO J **15**(17): 4629-42.
- Van Eynde A, Wera S, et al. (1995). "Molecular cloning of NIPP-1, a nuclear inhibitor of protein phosphatase-1, reveals homology with polypeptides involved in RNA processing." J Biol Chem **270**(47): 28068-74.
- Wade Pa, Pruss D, et al. (1997). "Histone acetylation: chromatin in action." Trends Biochem Sci **22**(4): 128-32.
- Wadzinski Be, Wheat Wh, et al. (1993). "Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation." Mol Cell Biol **13**(5): 2822-34.
- Waeber G and Habener Jf (1992). "Novel testis germ cell-specific transcript of the CREB gene contains an alternatively spliced exon with multiple in-frame stop codons." Endocrinology **131**(4): 2010-5.
- Waeber G, Meyer Te, et al. (1991). "Developmental stage-specific expression of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein CREB during spermatogenesis involves alternative exon splicing [published erratum appears in Mol Endocrinol 1993 Nov;7(11):1501]." Mol Endocrinol **5**(10): 1418-30.
- Waeber G, Meyer Te, et al. (1993). "Developmental stage-specific expression of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein CREB during spermatogenesis involves alternative exon splicing." Mol Endocrinol **7**(11): 1501.
- Walker Wh, Fucci L, et al. (1995). "Expression of the gene encoding transcription factor cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response element-binding protein

- (CREB): regulation by follicle-stimulating hormone-induced cAMP signaling in primary rat Sertoli cells." Endocrinology **136**(8): 3534-45.
- Xie S, Price Je, et al. (1997). "Dominant-negative CREB inhibits tumor growth and metastasis of human melanoma cells." Oncogene **15**(17): 2069-75.
- Xing J, Ginty Dd, et al. (1996). "Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase." Science **273**(5277): 959-63.
- Yamamoto Kk, Gonzalez Ga, et al. (1988). "Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB." Nature **334**(6182): 494-8.
- Yang M, Hosokawa Y, et al. (1996). "Structure and characterization of rat cyclin D3 promoter." Gene **181**(1-2): 153-9.
- Yang Ym, Dolan Lr, et al. (1996). "Expression of dominant negative CREB reduces resistance to radiation of human melanoma cells." Oncogene **12**(10): 2223-33.
- Yoshizumi M, Hsieh Cm, et al. (1995). "The ATF site mediates downregulation of the cyclin A gene during contact inhibition in vascular endothelial cells." Mol Cell Biol **15**(6): 3266-72.
- Yun Y, Hoeffler Jp, et al. (1994). "Cyclic AMP-responsive transcriptional activation domain of CREB-327 involves interdependent phosphorylated subdomains [retraction of Lee CQ, Yun YD, Hoeffler JP, Habener JF. In: EMBO J 1990 Dec;9(13):4455-65]." EMBO J **13**(11): 2736.
- Ziff Eb (1990). "Transcription factors: a new family gathers at the cAMP response site." Trends Genet **6**(3): 69-72.
- Zucman J, Delattre O, et al. (1993). "EWS and ATF-1 gene fusion induced by t(12;22) translocation in malignant melanoma of soft parts." Nat Genet **4**(4): 341-5.

7. Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CIP	calf intestinal phosphatase Phosphatase aus Kälberdarm
cm	Zentimeter
cpm	counts per minutes
CTP	Cytidintriphosphat
d	2'-desoxy-
Depc	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
H ₂ O	destilliertes Wasser
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser, autoklaviert
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter
lacZ	Gen für β-Galaktosidase
M	Molar
m	Milli (10 ⁻³)
min	Minuten
mol	Mol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm

μ	Mikro (10 ⁻⁶)
μF	Miko-Farad
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
³² P	Phosphat 32
p.c.	post coitum
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	-log(H ⁺)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
³⁵ S	Schwefel 35
SDS	Natriumlaurylsulfat
sek	Sekunden
TEMED	N.N.N'N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TTP	Thymidintriphosphat
U	Einheiten
UTP	Uraciltriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-Galactopyranosid
Z	Zellen

8. Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Professor Dr. Günther Schütz für die Überlassung des Themas sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Bei Herrn Professor Dr. Werner Müller bedanke ich mich für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Desweiteren möchte ich mich bei Dr. Wolfgang Schmid, Dr. Erich Greiner und Julia für das Korrekturlesen und die konstruktive Kritik bedanken. Ein besonderer Dank gilt Dr. A. Paula Monaghan für die vielen Anregungen und „jahrelange“ Unterstützung fachlicher und moralischer Art. Weiterhin möchte ich mich bei Dorothea Rudolph und Dagmar Bock für die gute Zusammenarbeit bedanken. Allen anderen Laborkollegen sei für die kollegiale Arbeitsatmosphäre gedankt, insbesondere auch Emilio, Erich und Thomas für die exquisiten „semi-spontaneous cooking sessions“, die hoffentlich fortgeführt werden.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und Harald bedanken, die nicht nur einmal Geduld mit mir aufbringen mussten.

9. Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Dissertation wurde in dieser oder ähnlicher Form noch keiner anderen Fakultät oder sonstiger Prüfungsbehörde vorgelegt.

Heidelberg, den 31.01.99