

**Etablierung Zell-permeabler Varianten der
Transkriptionsfaktoren Oct4 und Sox2 und die
Untersuchung ihrer Rollen in der
Pluripotenzerhaltung von murinen embryonalen
Stammzellen**

DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Manal Bosnali
aus Damaskus

Oktober 2008

Anfertigung mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Brüstle
2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Willecke

Tag der Promotion: 05.02.2009

Erscheinungsjahr: 2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung.....	10
1.1 Embryonale Stammzellen.....	10
1.2 Molekulare Basis der Pluripotenzregulation	12
1.2.1 Extrazelluläre Pluripotenzfaktoren	12
1.2.2 Intrazelluläre Pluripotenzfaktoren	13
1.2.2.1 Ebenen der Pluripotenzregulation durch Oct4, Sox2 und Nanog.....	14
1.3 Oct4, Sox2 und ihr Zusammenspiel in der Pluripotenzhaltung	16
1.4 Zellmanipulation über Proteintransduktion.....	19
1.4.1 Mechanismus der Proteintransduktion.....	21
1.4.2 Anwendungsgeschichte transduzierbarer Transkriptionsfaktoren.....	22
1.5 Zielsetzung der Arbeit	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Verwendete Chemikalien, Geräte und biologisches Material	25
2.1.1 Chemikalien.....	25
2.1.2 Geräte	25
2.1.3 Plastikware für die Zellkultur	27
2.1.4 Inhibitoren	28
2.1.5 Primer.....	28
2.1.6 Enzyme.....	28
2.1.7 Marker	29
2.1.8 Antikörper	29
2.1.9 Bakterienstämme	30
2.1.10 Zelllinien	30
2.1.10.1 Fibroblasten-Zelllinien.....	30
2.1.10.2 ES-Zelllinien.....	31
2.2 Molekularbiologische Methoden	31
2.2.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten (PCR).....	31
2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA und PCR-Produkten.....	32

2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	33
2.2.5	Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration	33
2.2.6	Enzymatische Manipulation von dsDNA.....	34
2.2.6.1	Restriktionshydrolyse.....	34
2.2.6.2	Herstellung von stumpfen DNA-Enden (<i>blunting</i>).....	34
2.2.6.3	Dephosphorylierung von freien DNA-Enden.....	34
2.2.6.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	34
2.2.7	Oligomer-Insertion.....	35
2.2.8	DNA-Sequenzierung.....	35
2.2.9	Präparation von genomischer DNA.....	36
2.2.10	Genotypisierungs-PCR.....	36
2.2.11	Southernblot-Analyse.....	37
2.2.12	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	38
2.3	Mikrobiologische Methoden.....	40
2.3.1	Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien	40
2.3.2	Bestimmung der Transformationseffizienz.....	41
2.3.3	Chemische Transformation von Bakterien.....	41
2.4	Proteinbiochemische Methoden	42
2.4.1	Proteinexpression.....	42
2.4.2	Proteinaufreinigung.....	43
2.4.2.1	Proteinaufreinigung aus der löslichen Fraktion.....	43
2.4.2.2	Proteinaufreinigung aus der unlöslichen Fraktion.....	44
2.4.3	Lagerung von Proteinen	45
2.4.4	Herstellung des Transduktionsmediums	45
2.5	Analytische biochemische Methoden	45
2.5.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	45
2.5.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.5.3	Western Blot.....	47
2.5.3.1	Semi-dry Blot	47
2.5.3.2	Wet-Blot (<i>Tank-Blot</i>).....	48
2.5.4	Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA).....	49
2.6	Zellbiologische Methoden.....	50
2.6.1	Kultivierung von murinen embryonalen Stammzellen	50

2.6.2	Kultivierung von Fibroblasten Zellen.....	51
2.6.3	Kryokonservierung von Zellen.....	51
2.6.4	RNA-Interferenz.....	51
2.6.5	Durchflusszytometrie.....	52
2.6.6	Immunzytochemie.....	53
2.6.7	Alkalische Phosphatase-Aktivität.....	53
2.6.8	Rhodamin-Markierung von Proteinen.....	53
2.6.9	Erstellung von Wachstumskurven.....	54
3	Ergebnisse.....	55
3.1	Das pSESAME Vektorsystem als Basis für die Herstellung transduzierbarer Proteine.....	55
3.1.1	Klonierung der pSESAME- <i>Pou5f1</i> Varianten.....	56
3.1.2	Klonierung der pSESAME- <i>Sox2</i> Varianten.....	57
3.2	Herstellung der Oct4 und Sox2 Fusionsproteine.....	59
3.2.1	Optimierung der Herstellung des TAT-Oct4 Fusionsproteins.....	59
3.2.1.1	Expression und Aufreinigung der N-terminal fusionierten Version von Oct4.....	59
3.2.1.2	Expression und Aufreinigung der C-terminal fusionierten Version von Oct4.....	61
3.2.2	Optimierung der Herstellung des TAT-Sox2 Fusionsproteins.....	63
3.2.2.1	Expression und Aufreinigung der N-terminal fusionierten Version von Sox2.....	63
3.2.2.2	Expression und Aufreinigung der C-terminal fusionierten Version von Sox2.....	64
3.2.3	Optimierung der Medienbedingungen für die Zellkulturapplikation von rekombinantem Oct4 und Sox2.....	66
3.2.4	Übersicht zur Proteinherstellung von TAT-Oct4 und TAT-Sox2.....	67
3.3	Oct4 und Sox2 TAT-Fusionsproteine binden spezifisch an DNA-Konsensussequenzen.....	68
3.4	Membranpermeabilität der transduzierbaren Proteine.....	69
3.4.1	Untersuchung der zellulären Aufnahme von Oct4.....	70
3.4.2	Untersuchung der zellulären Aufnahme von Sox2.....	71
3.4.3	Untersuchung der nukleären Translokation von Oct4 TH und Sox2 ^{NTH}	73
3.5	Untersuchung der intrazellulären Aktivität von Oct4TH und Sox2^{NTH} in murinen ES-Zellen.....	73
3.5.1	Oct4 TH und Sox2 ^{NTH} erhöhen den Anteil undifferenzierter Kolonien.....	74
3.5.2	SSEA-1 als Marker für pluripotente mES-Zellen.....	78

3.5.3	Transaktivierungspotential von Oct4TH und Sox2NTH in murinen ES-Zellen	79
3.5.4	Kompensation des <i>knock out</i> bzw. <i>knock down</i> von Oct4 und Sox2 durch die Transduktion der rekombinanten Faktoren.....	80
3.5.4.1	Kompensationsversuch des <i>Pou5f1 knock outs</i> durch Oct4TH Transduktion	80
3.5.4.2	Etablierung des RNAi <i>knock downs</i> von <i>Pou5f1</i> und <i>Sox2</i>	85
3.5.4.3	Kompensation des siRNA <i>k.d.</i> von <i>Pou5f1</i> und <i>Sox2</i> durch transduzierbare Proteine	88
3.6	Untersuchung der Aktivität von TAT-fusioniertem Oct4 und Sox2 in somatischen Zellen.....	91
3.6.1	Oct4TH und Sox2NTH haben einen wachstumsfördernden Effekt auf NIH 3T3 Zellen	91
3.6.2	Sox2NTH induziert Nanog Expression in Fibroblasten Zellen.....	92
4	Diskussion.....	94
4.1	Herstellung der rekombinanten Faktoren Oct4 und Sox2	94
4.2	DNA-Bindungsfähigkeit der rekombinanten Oct4 und Sox2 Proteine	96
4.3	Detektion der zellulären Translokation der TAT-fusionierten Oct4 und Sox2.....	98
4.4	Pluripotenzerhaltung von ES-Zellen durch Oct4TH und Sox2NTH Applikation ..	99
4.5	<i>Knock down</i> -Studien von Oct4 und Sox2 und die Auswirkung auf die autoregulatorischen Schleife.....	101
4.5.1	Genetische Deletion von <i>Pou5f1</i>	102
4.5.2	RNAi <i>knock down</i> von <i>Pou5f1</i> und <i>Sox2</i> und die Kompensation durch Proteintransduktion	103
4.6	Effekt von Oct4TH und Sox2NTH in somatischen Zellen.....	105
4.7	Ausblick	106
5	Zusammenfassung	108
6	Literaturverzeichnis	108
7	Eigene Publikationen	124
8	Erklärung	125

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaar
CV-1	Fibroblasten der grünen Meerkatze
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK-Zellen	Embryonale Karzinomazellen
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FKS	Fötale Kälber-Serum
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitationskonstante
h	Stunde
HEK	<i>Human epithelial Kidney</i>
HEPES	N-2 Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
hES-Zellen	Humane embryonale Stammzellen
His	<i>Histidine Tag</i>
HS-Zellen	Hämatopoetische Stammzellen
iPS-Zellen	Induzierte pluripotente Stammzellen
IZM	Innere Zellmasse
Kb	Kilobasen
k.d.	<i>Knock down</i>
kDa	Kilodalton
k.o.	<i>Knock out</i>
L	Liter
LB	Luria Bertani Medium

LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
M	Mol pro Liter
mA	Milliampere
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
mES-Zellen	Murine embryonale Stammzellen
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
ng	Nanogramm
Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i>
nm	Nanometer
NLS	Kernlokalisierungssignal
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POU	Pit Oct Unc
PTD	Proteintransduktionsdomäne
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: <i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkription
sec	Sekunde
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwerts)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
Sox	<i>sry-related HMG-box</i>
TAT	<i>Transactivator of transcription</i>
Tab	Tabelle

Abkürzungsverzeichnis

TB	<i>Terrific broth</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
w/v	<i>weight/ volume</i>
YS	<i>Yolk sac</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) stellen ein einzigartiges Modell für die Untersuchung der frühen embryonalen Entwicklung dar, und sind eine wichtige Quelle für regenerative Therapien (Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000; Pera & Tounson, 2004). Im Jahre 1981 konnten erstmals murine embryonale Stammzellen aus der inneren Zellmasse (IZM) der Blastozyste gewonnen werden (Evans & Kaufmann, 1981; Martin, 1981); 1998 gelang die Ableitung von humanen ES-Zellen (Thomson et al., 1998). Die IZM ist der Vorläufer des Epiblasts, welcher den Ursprung der drei Keimblätter darstellt, aus denen sich im weiteren Verlauf der Embryogenese der Fetus entwickelt (Abb.1.1).

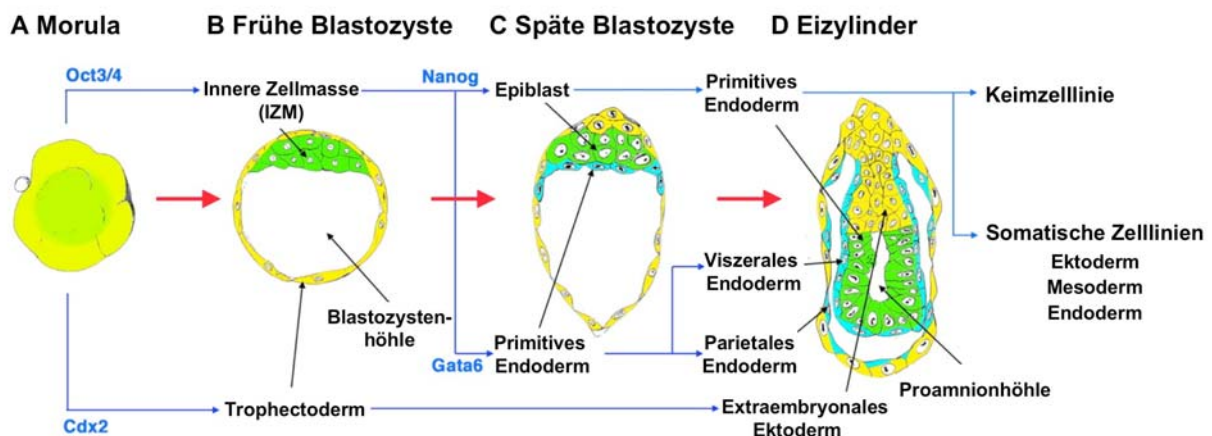


Abb.1.1. Schematische Darstellung der Prä- und Periimplantationsentwicklungsstadien des Mausembryos- Markierung der pluripotenten Linie in den ersten Entwicklungsstadien.

A. Pluripotente Zellen (grün) sind in der Morula als die inneren Zellen dargestellt, die in **B.** zur inneren Zellmasse (IZM) der Blastozyste reifen. **C.** Nachdem die IZM das primitive Endoderm an seiner Oberfläche abgibt, bilden die pluripotenten Stammzellen der IZM den Epiblast und beginnen nach der Implantation rapide zu proliferieren. **D.** Danach formen sie das primitive Ektoderm, eine einlagige Epithelschicht, welches später die Keimzelllinie und die somatischen Zelllinien des Embryos bilden wird. Bestimmte Schlüsseltranskriptionsfaktoren (blau) werden für die Differenzierung der verschiedenen embryonalen Linien benötigt (Abschnitt 1.2.2).

(Niwa et al., 2007)

ES-Zellen behalten das Entwicklungspotenzial der IZM bei und werden daher als pluripotent bezeichnet. Werden diese Zellen in eine Blastozyste injiziert, entstehen so genannte chimäre Mäuse, bei denen sich die ES-Zellen in alle Gewebe der Maus integrieren können, nicht aber in das extraembryonale Gewebe. Sie repräsentieren daher ein *in vitro* Modell der

Epiblastvorläufer in der IZM (Chazaud et al., 2006). Nur die Zygote und Blastomeren der ersten Teilungen sind in der Lage, von sich aus einen vollständigen Organismus zu entwickeln und werden daher als totipotent bezeichnet. Stammzellen, die alle Zelltypen einer Linie ausbilden können, sind hingegen multipotent. Ein prominentes Beispiel dafür sind hämatopoetische Stammzellen. Unipotente Zellen können ausschließlich in einen Zelltyp ausdifferenzieren, wie z.B. spermatogoniale Stammzellen. Eine weitere Eigenschaft der embryonalen Stammzellen ist ihre nahezu uneingeschränkte Selbsterneuerung, wodurch sie zu einer unbegrenzten Quelle an Zellmaterial werden.

Durch diese außerordentlichen Eigenschaften bieten ES-Zellen unzählige Möglichkeiten in der regenerativen Medizin. Da es bereits *in vitro* möglich ist, ES-Zellen in unterschiedliche Zelllinien der drei Keimblätter zu differenzieren, gibt es verschiedene Strategien diese ES-Zell-abgeleiteten somatischen Zellen therapeutisch zu nutzen. Zum Beispiel gelang es bei einem Infarktmodell der Ratte, durch die Implantation von humanen ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten eine partielle Wiederherstellung des betroffenen Muskelgewebes zu erreichen (Laflamme et al., 2007). Neuronale Zellen konnten ebenfalls aus ES-Zellen abgeleitet werden (Brüstle et al., 1997; Conti et al., 2005). So konnten ES-Zell-abgeleitete Oligodendrozytenvorläufer bei Transplantation in ein Rattenmodell einer humanen Myelinerkrankung mit den Wirtsneuronen interagieren und Axone in Gehirn und Rückenmark remyelinisieren (Brüstle et al., 1999). ES-Zell-abgeleitete Zellen können auch als Vehikel zum Transfer von Genen oder therapeutischen Faktoren in einen Organismus genutzt werden. So konnte in einem Epilepsiemodell in der Ratte durch die Transplantation von ES-Zell-abgeleiteten neuronalen Vorläuferzellen, die Adenosin sekretieren, ein lang anhaltender Schutz vor Anfällen erzielt werden (Li et al., 2007). Außerdem bieten ES-Zellen ein ausgezeichnetes Testsystem für die Suche nach neuen Wirkstoffen, besonders im Hinblick auf ES-Zelllinien von Krankheitsmodellen. Die Zellen bieten einen Vorteil, dass sie in den betroffenen Zelltyp differenziert werden können, der durch die Krankheit beeinflusst wird und bieten dadurch ein nahezu authentisches Zielzellen (Rubin, 2008).

Die Untersuchung der Signalwege und Netzwerke, die Pluripotenz und Selbsterneuerung regulieren, ist essentiell für das Verständnis der frühen embryonalen Entwicklung und die Verwirklichung des therapeutischen Potentials von embryonalen Stammzellen in der regenerativen Medizin.

1.2 Molekulare Basis der Pluripotenzregulation

Die besonderen Eigenschaften von embryonalen Stammzellen, sich im undifferenzierten Status zu vermehren und dabei die Fähigkeit beizubehalten, in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren, erfordert ein präzise reguliertes Netzwerk aus Signaltransduktionswegen und Transkriptionsfaktoren. Diese Faktoren kann man grob in extra- und intrazelluläre Faktoren aufteilen.

1.2.1 Extrazelluläre Pluripotenzfaktoren

Murine embryonale Stammzellen können durch die Zugabe von zwei Faktoren pluripotent in Kultur gehalten werden: *Leukaemia Inhibitory Factor* (LIF) (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988) und *Bone Morphogenic Protein* (BMP) (Ying et al., 2003).

LIF bindet an den LIF-Rezeptor (LIF-R) und den gp130-Rezeptor, was zur Dimerisierung dieser Rezeptoren führt und dadurch eine Phosphorylierung und Dimerisierung des *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) bewirkt. Aktiviertes STAT3 transloziert in den Nukleus, wirkt dort als pluripotenzerhaltender Transkriptionsfaktor und inhibiert auf diese Weise die Differenzierung in primitives Endoderm (Niwa et al., 1998; Matsuda et al., 1999). Zusätzlich werden durch den heterodimeren LIF-R-gp130-Komplex die Tyrosinkinase Janus (JAK), die Antiphosphotyrosin-Immunoreaktive-Kinase (TIK) sowie die *Extracellular Signal-Regulated Protein Kinasen* ERK1 und ERK2 aktiviert und die Aktivität der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) gesteigert (Burdon et al., 1999; Boeuf et al., 1997).

BMP ist ein Serumbestandteil und wirkt als anti-neurogener Faktor, der in der Anwesenheit von LIF SMAD4 (*similar to mothers against decapentaplegic homologue-4*) aktiviert, wodurch verschiedene ID (*Inhibitors of Differentiation*) Gene aktiviert werden und somit der Differenzierung von Stammzellen entgegen wirken (Ying et al., 2003).

Kürzlich wurde in einer Veröffentlichung von Ying et al. (2008) berichtet, dass die Inhibition der FGF4-ERK- und GSK3- (Glykogen Synthase Kinase-3) Signaltransduktionswege durch chemische Inhibitoren ausreichend für die autonome Pluripotenzerhaltung muriner ES-Zellen ist. Demnach können ES-Zellen in einer neutralen Umgebung, abgeschirmt von Differenzierungsstimuli, pluripotent gehalten werden, ohne Wachstumsfaktoren oder Zytokine zu benötigen. LIF und BMP bewirken demzufolge nicht die Selbsterneuerung, sondern verhindern die Differenzierung pluripotenter Zellen durch die Blockade des FGF4-

ERK Signalweges. Der gleiche Effekt kann durch die Gabe von chemischen Inhibitoren erreicht werden. Wachstum und Vitalität der Zellen können durch Reduktion der GSK3 Aktivität gefördert werden.

1.2.2 Intrazelluläre Pluripotenzfaktoren

Die Pluripotenz von murinen und humanen ES-Zellen wird durch ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren reguliert, in dessen Zentrum drei Faktoren stehen: Oct4, Sox2 und Nanog (Boyer et al., 2005, Loh et al., 2006). Durch Genom-Analysen konnte festgestellt werden, dass die drei Faktoren kooperativ an Promotoren von zahlreichen Genen binden, die eine zentrale Rolle in der Pluripotenz-erhaltung oder Differenzierung spielen (Abb. 1.2).

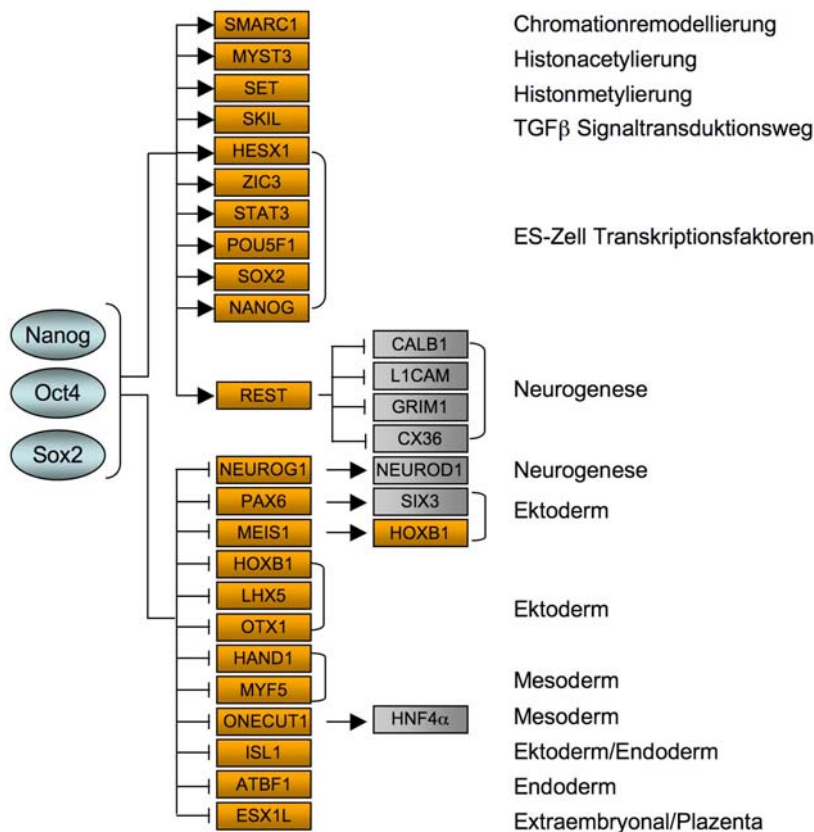


Abb.1.2. Kern des regulatorischen Netzwerks von ES-Zellen

Die Transkriptionsfaktoren Nanog, Oct4 und Sox2 (blaue Ovale) binden gemeinsam an die Promotoren von Genen, die für Transkriptionsfaktoren und Chromatinregulatoren kodieren (orangefarbene Rechtecke) und Pluripotenz und Differenzierung regulieren. Diese Zielgene werden aktiviert oder reprimiert. Graue Rechtecke stellen potentielle Zielgene dar. (Adaptiert aus Boyer et al., 2005).

Diese Gene werden durch die Bindung von Oct4, Sox2 und Nanog entweder aktiviert oder reprimiert. Die drei Faktoren binden ebenfalls an ihre eigenen Promotoren und bilden dadurch

eine autoregulatorische Schleife. Funktionelle Studien bestätigten, dass ein autoregulatorisches Netzwerk zwischen Oct4, Sox2 und Nanog besteht (Okumura-Nakanishi et al., 2005; Tomioka et al., 2002; Kuroda et al., 2005; Rodda et al., 2005, Pan et al., 2006, Masui et al., 2007). Autoregulation ist eine allgemeine Eigenschaft von Hauptregulatoren des Zellstatus, so auch im Fall der sechs Hauptregulatoren der humanen Heptozytenentwicklung und -funktion (HNF1 α , HNF4 α , FOXA2/HNF3 β , HNF6/ONECUT1, CREB1, und USF1). Sie bilden ein intern gekoppeltes Netzwerk und sorgen dadurch für die Stabilität der Genexpression und die Erhaltung des Zellsatus (Odom et al., 2006; Alon, 2007).

1.2.2.1 Ebenen der Pluripotenzregulation durch Oct4, Sox2 und Nanog

Epigenetische Regulatoren

Die Regulation der Pluripotenz findet auf unterschiedlichen Ebenen statt. Dabei spielen auch epigenetische Mechanismen zur Regulation der Genexpression eine Rolle. In ES-Zellen wurde eine spezielle Art von Chromatin entdeckt, die als „bivalent“ bezeichnet wird. Diese Domänen zeichnen sich durch lange inaktive Abschnitte aus (H3K27me₃), die kurze aktive Strecken (H3K4me) enthalten (Bernstein et al., 2006). In diesen Regionen kommt es zur Initiation der Transkription, in Anwesenheit von Polycomb Gruppen Proteinen (PcG) kann diese jedoch nicht fortgesetzt werden (Guenther et al., 2007). Bivalente Chromatinregionen überlappen häufig mit Promotorregionen von Genen, die von Oct4, Sox2 und Nanog reprimiert werden. Hierbei handelt es sich meist um Gene, die für Entwicklungsregulatoren kodieren und bei Differenzierung stark exprimiert werden (Boyer et al., 2005; Bernstein et al., 2006).

Auch weitere Beispiele zeigen, dass besonders Oct4 und Nanog eine große Rolle in der epigenetischen Regulation der Transkription spielen. Loh et al. (2007) identifizierten die zwei Histondemethylasen (HDMase) Jmjd1a und Jmjd2c als Zielgene von Oct4; gleichzeitig demethylieren Jmjd1a und Jmjd2c Zielgene von Oct4 und erlauben dadurch deren Aktivierung durch Oct4. Außerdem scheinen Oct4 und Nanog in der Lage zu sein, Komponenten des NuRD (*Nucleosome Remodelling and Deacetylase Complex*) zu rekrutieren und dadurch spezifisch Gene zu reprimieren (Liang et al., 2008).

Regulatorische microRNA (miRNA)

Eine weitere Ebene der Regulation von Pluripotenz und der frühen embryonalen Entwicklung sind regulatorische miRNAs. Dabei handelt es sich um eine Familie nicht-kodierender RNA bestehend aus ca. 22 Nukleotiden. Sie regulieren die Genexpression über mindestens zwei Mechanismen: Degradation der Ziel-mRNA oder Inhibition der mRNA Translation (Kloosterman et al., 2006). ES-Zelllinien, in denen miRNA-prozessierende Enzyme wie Droscha und Dicer fehlen, weisen Defekte in der Differenzierung und Selbsterneuerung auf (Kanellopoulou et al., 2005; Murchison et al., 2005; Wang et al., 2007). Bisher ist nur wenig über die Kontrollmechanismen der miRNA bezüglich des Entwicklungspotentials von ES-Zellen bekannt. Eine Reihe von miRNA-Gruppen werden bevorzugt in ES-Zellen und embryonalen Geweben exprimiert (Houbaviy et al., 2003; Mineno et al., 2006; Suh et al., 2004), andere spielen eine Rolle in der Differenzierung und werden in ES-Zellen aktiv reprimiert. Zum Beispiel inhibiert LIN28 die Prozessierung von Let-7 miRNA in ES-Zellen (Viswanathan et al., 2008; Piskounova et al., 2008). Let-7 miRNA spielt eine Rolle als Tumorsuppressor durch die Unterdrückung der Expression der Onkogene HMga2, Ras und Myc (Mayr et al., 2007; Lee et al., 2007; Johanson et al., 2005; Sampson et al., 2007). Kürzlich wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor REST die Transkription der miR-21 in ES-Zellen reduziert (Singh et al., 2008). miR-21 reprimiert spezifisch die Selbsterneuerung von Maus ES-Zellen durch den korrespondierenden Verlust von Oct4, Sox2, Nanog und c-Myc. Interessanterweise wird REST ebenfalls durch Oct4, Sox2 und Nanog aktiviert (Boyer et al., 2005; Abb. 1.2).

Induktion von Pluripotenz in differenzierten Zellen

Ein großer Durchbruch in der Stammzellforschung war die kürzlich publiziert erfolgreiche Reprogrammierung von murinen Fibroblasten zu so genannten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) (Takahashi & Yamanaka, 2006; Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007). Die virale Transduktion von nur vier Faktoren – Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc – war ausreichend, um Pluripotenz in somatischen Zellen zu etablieren. Mit der gleichen Kombination an Faktoren konnten auch humane somatische Zellen zu iPS-Zellen reprogrammiert werden (Takahashi et al., 2007; Lowry et al., 2008). Später konnte gezeigt werden, dass c-Myc nicht zwingend für die Reprogrammierung erforderlich ist, sondern lediglich die Effizienz steigert (Nakagawa et al., 2007; Wernig et al., 2008). Yu et al. (2007) demonstrierten, dass die Reprogrammierung von humanen ES-Zellen auch mit einer anderen

Kombination an Faktoren möglich ist – Oct4, Sox2, Nanog und Lin28 – wobei Oct4 und Sox2 unerlässlich sind.

Da Oct4 und Sox2 eine wichtige Rolle auf den verschiedenen Ebenen der Pluripotenzerhaltung und -etablierung spielen, werden sie als Schlüsselfaktoren in der Regulation und Induktion von Pluripotenz bezeichnet.

1.3 Oct4, Sox2 und ihr Zusammenspiel in der Pluripotenzerhaltung

Oct4

Oct4 (kodiert von *Pou5f1*) gehört zu der Familie der POU-Transkriptionsfaktoren (Pit, Oct und Unc) (Schöler et al., 1990a; Okamoto et al., 1990; Rosner et al., 1990). Diese Familie zeichnet sich durch die so genannte POU-Domäne aus, eine zweiteilige DNA-Bindedomäne. Sie besteht aus einer POU-spezifischen Domäne (POU_S) und einer POU-Homeodomäne (POU_H), die durch einen flexiblen Linker verbunden sind. Diese räumliche Kombination von zwei DNA-bindenden Domänen verleiht einem POU-Protein die Spezifität bei der DNA-Bindung und die Möglichkeit gleichzeitig mit anderen Proteinen zu interagieren, z.B. Koaktivatoren. Oct-Proteine bilden eine Subfamilie, die an eine octamere Konsensussequenz binden (Herr & Cleary, 1995). Die Mitglieder der Oct-Protein-Familie (Oct1, Oct2, Oct4 und Oct6) weisen große Sequenzhomologien auf, besonders in den Segmenten, die in die DNA-Bindung und Pou-Pou Interaktion involviert sind und können verschiedene Homo- und Heterodimere bilden (Tomilin et al., 2000). Sie unterscheiden sich allerdings in den N- und C-terminalen Domänen, die wahrscheinlich die Interaktion mit unterschiedlichen Gruppen an Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren vermitteln (Reményi et al., 2004). Die N- und C-terminalen Domänen von Oct4 fungieren als Transaktivator-Domänen, deren Funktionen weitestgehend überlappen (Niwa et al., 2002).

In den frühen embryonalen Entwicklungsstadien der Maus liegt Oct4 in totipotenten und pluripotenten Zellen vor (Rosner et al., 1990; Schöler et al., 1990; Palmieri et al., 1994; Yeom et al., 1996; Nichols et al., 1998). So ist Oct4 in den Nuclei eines 8-Zell-Embryos bis hin zur Morula nachweisbar. In der pluripotenten IZM der Blastozyste bleibt es weiterhin exprimiert, wird aber im Trophektoderm herunterreguliert. Nach der Implantation wird Oct4 im Epiblast exprimiert und erst während der Gastrulation wird die Expression abgeschwächt. In späteren Entwicklungsstadien ist die Oct4 Expression auf die Keimzellvorläufer beschränkt. *In vitro* wird Oct4 außer in ES-Zellen auch in embryonalen Karzinom- und Keimzelllinien exprimiert und bei Initiation der Differenzierung durch Retinsäure oder LIF-Entzug herunterreguliert

(Okamoto et al., 1990; Palmieri et al., 1994). Das klar definierte Expressionsmuster von Oct4, welches *in vivo* und *in vitro* auf toti- und pluripotente Zellen beschränkt ist, deutet auf die außerordentlich wichtige Rolle von Oct4 für die Erhaltung dieses Status hin.

Oct4 *knock out* Embryonen entwickeln sich bis zur Blastozyste, bilden aber keine normale IZM (Nichols et al., 1998). In Vorläuferkeimzellen führte die konditionale Deletion von Oct4 zur Apoptose (Kehler et al., 2004). Ähnliche Resultate wurden durch einen RNA-Interferenz (RNAi) *knock down* von Oct4 in ES-Zellen erreicht. Hier kam es zu einer trophektodermalen Differenzierung der Zellen (Hay et al., 2004, Hough et al., 2006). Niwa et al (2000) zeigten, dass ein ganz bestimmtes Oct4-Expressionsniveau notwendig ist, um die Pluripotenz von ES-Zellen zu erhalten. So führt eine nur 50%-ige Reduktion der Oct4 Expression zur Differenzierung in Trophektoderm, eine 2-fache Hochregulation führt zur Differenzierung in primitives Endoderm und Mesoderm.

Eine Onkogenaktivität von Oct4 wurde mehrfach in Keimzelltumoren nachgewiesen (Gideckel et al., 2003, Looijenga et al., 2003a). Die ektope Expression von Oct4 in adultem Haut- und Darmgewebe der Maus führt zu einer Hyperplasie der Vorläuferzellen und zur Bildung von invasiven Tumoren (Hochedlinger et al., 2005).

Sox2

Sox2 gehört zu der Familie der HMG (*High Mobility Group*) DNA-bindenden Proteinen und zur Untergruppe der SoxB1 (*sry-related HMG-box*) Gene (Uchikawa et al., 1999). HMG-Domänen haben die Eigenschaft, an die kleine Furche der DNA-Helix zu binden, wodurch in dem DNA-Molekül eine starke Krümmung induziert wird (Wegner 1999; Grosschedl et al., 1994). HMG-Domänen der Sox-Proteine haben sehr ähnliche Eigenschaften und erkennen eine 6-7 Basenpaare lange DNA-Sequenz. Zusätzlich enthalten Sox-Proteine eine Aktivierungs-/Repressions-Domäne, die meist am C-Terminus lokalisiert ist sowie eine Interaktionsdomäne, über die sie mit einem Partner interagieren. Da die Stabilität der Sox-DNA-Komplexe relativ niedrig ist, wird postuliert, dass die stabile Bindung der Sox-Proteine an die DNA erst durch die Präsenz eines Partners zustande kommt, der mit dem Sox-Protein interagiert und gleichzeitig die DNA an einer benachbarten Sequenz bindet (Kamachi et al., 2000).

Die Expression von Sox2 beginnt in der IZM des murinen Embryos und wird in dem davon abstammenden Epiblast fortgesetzt (Alvilion et al., 2003). Im Gegensatz zu Oct4 spielt Sox2 auch eine Rolle in späteren Stadien der embryonalen Entwicklung und in adulten Stammzellen. Mit Beginn der Neurogenese wird Sox2 ausschließlich in der Neuralplatte

exprimiert (Zappone et al., 2000; Alvilion et al., 2003; Uwanogho et al., 1995; Wood et al., 1999), während der Embryogenese bis hin zum adulten Organismus wird Sox2 in neuronalen Stammzellen der Ventrikularzone des entstehenden Neuralrohrs und in den davon abstammenden Zellen exprimiert (Zappone et al., 2000; Graham et al., 2003; Ferri et al., 2004).

Die wichtige Rolle von Sox2 in der embryonalen Entwicklung wird durch die frühe embryonale Lethalität von Sox2-Deletionsmutanten verdeutlicht. Murine Embryonen mit homozygot deletiertem Sox2 entwickeln keinen Epiblast, die ES-Zellen verlieren die Eigenschaft der Proliferation und Selbsterneuerung und differenzieren stattdessen zu Trophektoderm (Alvilion et al., 2003). Auch in ES-Zellen konnte durch RNAi und konditionale Ablations-Studien gezeigt werden, dass ein Funktionsverlust von Sox2 zur trophektodermalen Differenzierung führt (Ivanova et al., 2006; Li et al., 2007; Masui et al., 2007; Fong et al., 2008). Dabei zeigten Masui et al. (2007), dass Sox2 über verschiedene Wege (direkt und indirekt) für die Aktivierung von Oct4 verantwortlich zu sein scheint, aber auch durch die ektope Expression von Oct4 ersetzt werden kann. Möglicherweise können andere Sox-Proteine, die in ES-Zellen exprimiert werden, wie Sox4, Sox11 und Sox15, die Funktion von Sox2 in der Koaktivierung von Oct-Sox Elementen ersetzen.

Wie bei Oct4 scheint auch bei Sox2 das genaue Expressionsniveau eine Rolle in der Pluripotenzerhaltung zu spielen. So führt eine 2-fache Überexpression von Sox2 zur Inhibition der Expression verschiedener Sox2-Zielgene und dadurch zur Differenzierung von ES-Zellen in Neuroektoderm, Mesoderm und Trophektoderm, nicht aber in Endoderm (Kopp et al., 2008).

Interaktion zwischen Oct4 und Sox2

POU-Proteine sind häufige Interaktionspartner von Sox-Faktoren. Gemeinsam regulieren sie fundamentale Entwicklungsprozesse (Dailey & Basilico, 2001), so spielt beispielsweise der Komplex zwischen dem Sox2 homologen Protein fish hook / Dichaete aus *Drosophila* mit dem POU-Protein Dfr eine Rolle in der Entwicklung der Mittellinien-Glia bei *Drosophila* (Soriano & Russel 1998; Ma et al., 2000). Die Interaktion zwischen Oct4 und Sox2 ist eines der am besten charakterisierten Beispiele für die Interaktion eines POU-Proteins mit einem Sox-Faktor (Ambrosetti et al., 1997). Die beiden Faktoren binden an Kombinationen von Octamer-Sox Bindesequenzen in den Promotorregionen der Hauptregulatoren der Pluripotenz und aktivieren dadurch deren Expression (Abb. 1.3.A). Dazu gehört die Regulation der Expression ihrer eigenen Gene (Tomioka et al., 2002; Chew et al., 2005; Okumura-Nakanashi

et al., 2005) sowie der von *Fgf4*, *Utf1*, *Fbx15* und *Nanog* (Yuan et al., 1995; Nishimoto et al., 1999; Tokuzawa et al., 2003; Kuroda et al., 2005; Rodda et al., 2005). Außerdem aktivieren sie gemeinsam mit Klf4 die Expression von *Lefty1* (Nakatake et al., 2006).

Oct- und Sox- Faktoren zeigen unterschiedliche Stufen der Kooperativität je nach Zielgen, (Reményi et al., 2003). Diese Stufen resultieren möglicherweise in einer graduell unterschiedlichen Transkription, je nach Menge des anwesenden Oct- und Sox- Proteins in der Zelle. Auch der Abstand zwischen der Octamer- und Sox-Bindesequenz spielt eine Rolle für Affinität und Konformation der Bindung. So enthält der *Fgf4*-Enhancer drei Basenpaare Abstand, der *Utf1* und *Hoxb1*-Enhancer keines (Abb.1.3.B).

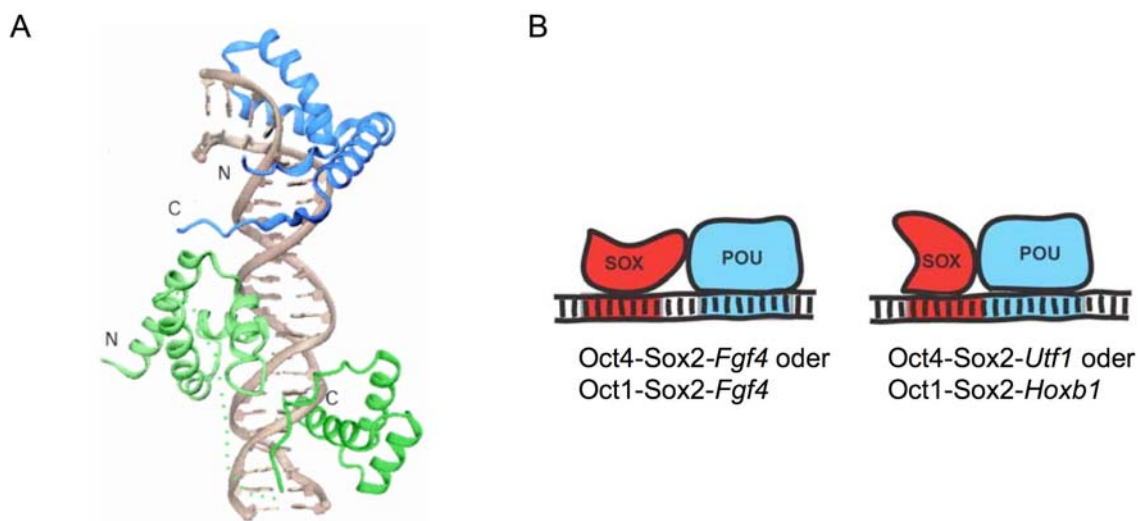


Abb.1.3. POU-SOX Interaktion

A. Kristallstruktur eines POU/SOX/DNA-Komplexes. Die POU-Domäne von Oct1 (POU_S in hellgrün, POU_H in dunkelgrün) und die HMG-Domäne von Sox2 (blau) binden an die Promotorregion von *Fgf4*. (Reményi et al., 2003).

B. Oct- und Sox-Faktoren nehmen je nach Abstand zwischen den Bindesequenzen unterschiedliche Konformationen ein (3 bzw. 0 Basenpaare Abstand zwischen POU- und Sox-Bindesequenzen) (Reményi et al., 2004)

1.4 Zellmanipulation über Proteintransduktion

Um die Konzentration eines bestimmten Faktors in einer Zellpopulation zu modulieren, können verschiedene Ansätze verfolgt werden. Dabei bieten sich insbesondere genetische Methoden an. Zum einen die direkte DNA-Transfektion, wobei die DNA über Detergenzien, Lipide oder Elektroporation in die Zellen eingebracht wird, zum anderen die virale Transduktion. Hierbei wird die Zielsequenz über einen viralen Vektor in die Zelle eingeführt. Beide Methoden sind jedoch mit Risiken behaftet. Neben der Zytotoxizität der Transfektionsmethoden kann es zu einer insertionalen Mutagenese kommen, wodurch

endogene Loci künstlich aktiviert oder reprimiert werden können. Dies kann zur Verfälschung der Ergebnisse führen oder gar zur Tumorinduktion (Glover et al., 2005; Okita et al., 2007). Außerdem ist die Überexpression schwierig zu kontrollieren oder abzuschalten.

Eine Methode, mit der man diese nachteiligen Nebeneffekte umgehen kann, ist die Proteintransduktion. Dort werden biologisch aktive Proteine direkt in die Zelle geschleust. Um die Zellmembran zu überwinden, werden die Proteine genetisch mit einer so genannten Proteintransduktionsdomäne (PTD) fusioniert (Green & Loewenstein, 1988; Frankel & Pabo, 1988). Dabei handelt es sich meist um hoch basische, 10-40 Aminosäuren lange Peptidsequenzen wie z.B. Penetratin aus dem Antennapedia-Protein (Derossi et al., 1994), oder VP22 des Herpes Simplex Virus (Elliott & O'Hare, 1997). Besonders bewährt hat sich das TAT Protein (*transactivator of transcription*) aus HIV-1 (Humanes Immundefizienz Virus Typ I) (Green & Loewenstein, 1988; Frankel & Pabo, 1988). TAT ist der Hauptregulator der HIV-Replikation und vermittelt die Pathogenität des Virus (Hwang et al., 2003). Weitere Analysen zeigten, dass eine Sequenz von 11 Aminosäuren (Die Reste 47-57 des TAT Proteins) ausreichend ist, um die zelluläre Aufnahme eines da ran fusionierten Proteins zu ermöglichen (Nagahara et al., 1998).

Seit der Etablierung dieser Methode wurde sie schon für diverse Applikationen angewandt (Snyder & Dowdy, 2005; Joliot & Prochiantz, 2004). Die transduzierbare Cre-Rekombinase beispielsweise, wurde mit TAT fusioniert ist und zeigt über 90 %-ige Rekombinationseffizienz in Fibroblasten und murinen ES-Zellen (Peitz et al., 2002; Peitz et al., 2007), in humanen ES-Zellen (Nolden et al., 2006), sowie in neuronalen Vorläuferzellen und postmitotischen Neuronen (Haupt et al., 2007). Des Weiteren wurden vielfältige, biologisch aktive Stoffe, wie Transkriptionsfaktoren (Landry et al., 2008), Tumorwachstum-inhibierende Zink Finger Proteine (Yun et al., 2008), Peptide (Dostmann et al., 2000), Antisense-Oligonukleotide (Astria-Fisher et al., 2002), und Liposomen (Torchilin et al., 2001) über die Fusion mit PTDs in Zellen eingeführt (Tab. 1.1).

1.4.1 Mechanismus der Proteintransduktion

Der Aufnahmemechanismus von zellpermeablen Proteinen kann in drei Schritte unterteilt werden (Abb.1.4):

Elektrostatistische Interaktion

Der initiale Schritt zur Proteininternalisierung ist die Bindung der kationischen PTD an die negativ geladenen, extrazellulären Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) (Narita et al., 1995; Belting et al., 1999). Bei TAT Fusionsproteinen scheinen zusätzlich zu den HSPG Komponenten der Lipoproteinrezeptorfamilie niedriger Dichte ebenfalls eine Rolle in der Bindung zu spielen (Liu et al., 2000).

Zelluläre Aufnahme

Für die Internalisierung der PTD-Fusionsproteine werden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen. Wadia et al. (2004) stellten durch Kolokalisations- und Inhibitor-Studien das Modell der Lipid-Raft-vermittelten Makropinozytose auf. Fittipaldi et al. (2003) hingegen gelangten durch ähnliche Methoden zu dem Mechanismus der Caveolin-abhängigen Endozytose. In beiden Fällen handelt es sich um einen Rezeptor-unabhängigen, Energie-abhängigen, endozytotischen Mechanismus. Da es weder gelang, durch den Einsatz von selektiven Inhibitoren die Aufnahme der PTD-Fusionsproteine komplett zu inhibieren, noch eine vollständige Kolokalisation mit spezifischen Kompartimentenmarkern zu erzielen, scheint die Aufnahme durch eine Kombination von verschiedenen Mechanismen zu erfolgen, die je nach Größe und biochemischen Eigenschaften des zu transportierenden Moleküls variieren können (Tünnemann et al., 2006; Patsch & Edenhofer, 2007).

Endosomale Freigabe

Nach der Aufnahme bilden die Endosomen einen Kranz unterhalb der Zellmembran und wandern mit der Zeit in Richtung Zellkern, wo sie akkumulieren. Der genaue Mechanismus der zytosolischen Freigabe ist nicht bekannt, gilt aber als limitierende Schlüsselstelle der Methode (Caron et al., 2004; Wadia et al., 2004). Ein weiterer Weg könnte der retrograde Transport durch den Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum (ER) sein, bevor die Proteine ins Zytosol transloziert werden (Lord & Roberts, 1998; Sandvig & van Deurs, 2002). Nur die Moleküle, die in das Zytosol freigesetzt werden, können in den Zellkern aufgenommen werden.

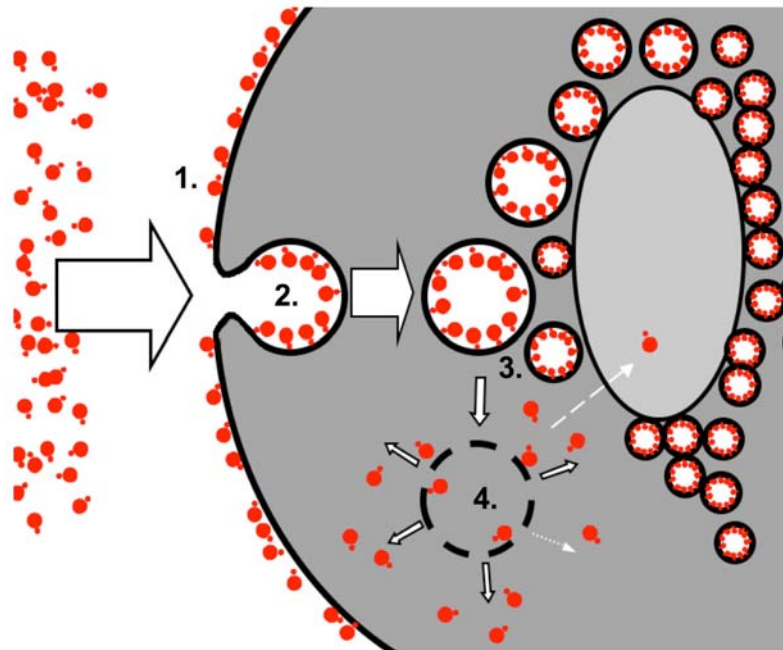


Abb.1.4. Schematische Darstellung der verschiedenen Schritte der Proteintransduktion
1. Elektrostatistische Anlagerung der PTD-Fusionsproteine mit der Zellmembran. 2. Zelluläre Aufnahme der Moleküle über Endozytose. 3. Die Endosomen wandern durch die Zelle und akkumulieren um den Zellkern. 4. Zytosolische Freigabe aus den Endosomen und Aufnahme in den Nukleus.
(Patsch & Edenhofer, 2007)

1.4.2 Anwendungsgeschichte transduzierbarer Transkriptionsfaktoren

In den letzten Jahren fand die Methodik der Proteintransduktion mehrfach Anwendung bei Transkriptionsfaktoren. Besonders im Hinblick auf therapeutische Anwendungen ist es wünschenswert eine genetische Veränderung der Zellen zu umgehen. Zum Teil konnten die Transkriptionsfaktoren mit einer der viralen Transduktion vergleichbaren Effizienz eingesetzt werden, wie z.B. im Fall des transduzierbaren HoxB4, einem Schlüsselfaktor in der Selbsterneuerung hämatopoetischer Stammzellen (HS-Zellen). Die Behandlung dieser Zellen mit 10-50 nM TAT-fusioniertem HoxB4 erhöhte die Proliferation dieser Zellen *in vitro* 8-20 mal gegenüber der Kontrolle, wobei die Zellen ihre Differenzierungskapazität *in vivo* beibehielten (Krosch et al., 2003). Transduzierbare Transkriptionsfaktoren wurden auch bereits in humanen ES-Zellen (hES) eingesetzt. Durch die Transduktion von PDX1, eines wichtigen Transkriptionsfaktors für die Entwicklung des Pankreas, konnte die Produktion von Insulin in hES-Zellen induziert werden (Kwon et al., 2005). Aber auch für die Identifikation von Zielgenen konnte ein transduzierbarer Transkriptionsfaktor eingesetzt werden. SCL, ein wichtiger Faktor in der regulatorischen Kaskade von HS-Zellen, wurde über

Proteintransduktion in eine *Scl*-defiziente *Yolk-Sac*-Zelllinie (YS-Zelllinie) eingebracht. Über globale Expressionsstudien konnten neue Zielgene von SCL identifiziert werden (Landry et al., 2008).

Tab. 1.1. Zusammenfassung bisher hergestellter transduzierbarer Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktor	Referenz	Zielzellen	PTD	Funktion
HoxB4	Krosi et al., 2003	HS-Zellen	TAT-HIV-1	Beschleunigte Expansion on HSCs <i>in vitro</i> . Zellen behalten ihr Differenzierungspotential <i>in vivo</i> bei.
Pdx1	Kwon et al., 2005	hES-Zellen	TAT-HIV-1	Aktivierung von Zielgenen, und Induktion von Insulinproduktion in hES-Zellen.
Artifizielle Zinkfinger Proteine	Tachikawa et al., 2005	HEK 293	TAT-HIV-1/ PTD4/ 9-mer Argenin	Regulation der Expression von VEGF-A.
	Yun et al., 2008	HEK 293, HM7	TAT-HIV-1	Inhibition von VEGF-A Expression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> , dadurch Inhibition von Tumorwachstum.
SCL	Landry et al., 2008	<i>Yolk-Sac</i> -Zelllinie	TAT-HIV-1	Identifikation von Zielgenen durch Kompensation des <i>Scl knock outs</i> .

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war, einen tieferen Einblick in die regulatorischen Mechanismen der Pluripotenzerhaltung und Selbsterneuerung zu gewinnen und eine mögliche Hierarchie der Pluripotenzfaktoren Oct4 und Sox2 untereinander zu analysieren. Dafür sollten verschiedene Ansätze zur Modulation der Stammzeleigenschaften angewandt werden.

Um die Modulation von Stammzeleigenschaften ohne genetische Manipulation durchführen zu können, war eines der Ziele dieser Arbeit die Schlüsselfaktoren der Pluripotenzerhaltung und -etablierung – Oct4 und Sox2 – als transduzierbare Proteine herzustellen und durch deren zelluläre Applikation einen Funktionsgewinn (*gain of function*) zu erreichen.

Für die Herstellung der transduzierbaren Proteine sollte ein Vektorsystem entwickelt werden, welches das Ermitteln des geeigneten Aufbaus eines transduzierbaren Proteins erleichtert. Anhand dieses Vektorsystems sollten Varianten von Oct4 und Sox2 hergestellt werden, mit optimierten biochemischen Eigenschaften, sowie der Einsatz dieser Faktoren unter physiologischen Bedingungen in Zellkulturen etabliert werden.

Als nächster Schritt sollte die Transduzierbarkeit und biologische Aktivität dieser Proteine charakterisiert werden, sowie die Kapazität diese Proteine die endogenen Faktoren zu ersetzen.

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung des regulatorischen Netzwerks der Pluripotenz waren *knock out* bzw. *knock down* Studien, in denen der Einfluss des Verlusts von Oct4 und Sox2 auf die Pluripotenzerhaltung und die Expression anderer Netzwerkkomponenten untersucht werden sollte.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien, Geräte und biologisches Material

2.1.1 Chemikalien

Alle benutzten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (München), Fluka (Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore (Eschborn) angesetzt. Zur Sterilisation wurden die Lösungen nach dem Ansetzen durch eine 0,2 µm Membran filtriert oder autoklaviert.

2.1.2 Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Bakterienschüttler	
innova 44	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
innova 4300	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
EB KS-15	Johanna Otto GmbH (Hechingen)
Inkubationshaube TH 15	Johanna Otto GmbH (Hechingen)
Chemielumineszenzdetektion	
ChemiDocXRS	BioRad (München)
Durchflusszytometrie	
LSRII analytisches Durchflusszytometer	BD Biosciences (Heidelberg)
Elektrophorese	
Standard Power Pack P25	Biometra (Göttingen)
Powerpack 200	BioRad (München)
Agagel Mini	Biometra (Göttingen)
Agagel Midi-Wide	Biometra (Göttingen)
Agagel Maxi	Biometra (Göttingen)
Protean III Mini Gel System	BioRad (München)

Hybridisierungsöfen

BFD53 Binder GmbH (Tuttlingen)

Inkubator

Heracell Heraeus (Hanau)

Mikroskope

Axiovert 25 Zeiss (Göttingen)

Axiovert 40C Zeiss (Göttingen)

Axiovert 200M Zeiss (Göttingen)

Axioskop2 Zeiss (Göttingen)

PCR-Geräte

Thermocycler Biometra (Göttingen)

i-Cycler BioRad (München)

pH-Meter

CG840 Schott (Mainz)

Photometer

BioPhotometer Eppendorf (Hamburg)

NanoDrop Peqlab (Erlangen)

Schüttler

ROTO-SHAKE Genie Scientific Industries (New York, USA)

VORTEX-2 Genie Scientific Industries (New York, USA)

Sonikator

SONOPLUS HD 2070 BANDELIN electronic (Berlin)

Sterile Werkbänke

Herasafe Heraeus (Hanau)

Hera guard HPH 12/95 Heraeus (Hanau)

UV-Transilluminatoren

GelVue GVM20	SYNGENE (Cambridge, GB)
Gel Doc EQ	BioRad (München)

Waagen

LA310S	Sartorius (Göttingen)
BL610	Sartorius (Göttingen)

Zentrifugen

5416 R	Eppendorf (Hamburg)
5415 D	Eppendorf (Hamburg)
Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Megafuge 1.0R	Heraeus (Hanau)
RC5B plus	Thermo (Waltham, USA)
RC26 plus	Thermo (Waltham, USA)

2.1.3 Plastikware für die Zellkultur

Zellkulturschalen 15 cm	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturschalen 10 cm	BD Falcon (Bedford, USA)
Zellkulturschalen 6 cm	BD Falcon (Bedford, USA)
Zellkulturschalen 3,5 cm	BD Falcon (Bedford, USA)
6-Well-Zellkulturplatten	Nunc (Roskilde, Dänemark)
12-Well-Zellkulturplatten	Nunc (Roskilde, Dänemark)
24-Well-Zellkulturplatten	Costar (Corning, USA)
96-Well-Zellkulturplatten	Costar (Corning, USA)
Petrischalen 10 cm	BD Falcon (Bedford, USA)
Petrischalen 6cm	BD Falcon (Bedford, USA)
15 ml Plastikröhrchen	Greiner Bio (Frickenhausen)
50 ml Plastikröhrchen	Greiner Bio (Frickenhausen)
Kryotubes	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Zellsieb (40 µm)	BD Falcon (Bedford, USA)
Zellschaber	Costar (Corning, USA)
Plastikpipetten (1 ml – 25 ml)	Costar (Corning, USA)

Sterilfilter (0,2 µm)

Whatman (Dassel)

2.1.4 Inhibitoren

LIF-Inhibitor

Vernallis et al., 1997

(im Labor von Michael Peitz hergestellt)

2.1.5 Primer

Die Primer wurden von der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) bezogen und für Klonierung bzw. Sequenzierung der verschiedenen pSESAME-Varianten benutzt.

Tab. 2.1. Primer-Sequenzen, die für Klonierung und Sequenzierung der verschiedenen pSESAME-Varianten benutzt wurden

Name	Sequenz
5'-SpeI_HTNOct4	TGTGTACT AGT GGG AAT TCT AAG AAG AAG AGG AAG GTG AAT TCT CCT AGG GCT GGA CAC CTG GCT TC
3'-XhoI_HTNOct4	CATG CTC GAG TCA GCT AGC GTT TGA ATG CAT GGG AGA G
5'-AvrII_Sox2	GCC TAG GAT GTA TAA CAT GAT GGA GAC GGA GC
3'-NheI_Sox2	TGC TAG CCA TGT GCG ACA GGG GCA GTG TGC
pSESAME- Sequenzierungsprimer_forw	TAA TCC GGG ACC TTT AAT TC
pSesame- Sequenzierungsprimer_rev	GC TCA AGG GGC TTC ATG ATG

2.1.6 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

NEB (Ipswich, USA)

GoTaq Polymerase

Promega (Mannheim)

High Fidelity PCR Master Mix
(für Klonierungsarbeiten)

Roche (Basel, Schweiz)

iScript Reverse Transcriptase

BioRad (München)

Benzonase

Novagen (Darmstadt)

Lysozyme

Sigma (München)

T4 DNA Ligase	NEB (Ipswich, USA)
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	Roche (Basel, Schweiz)
RQ1 RNase freie DNase	Promega (Mannheim)

2.1.7 Marker

DNA

100 bp DNA Ladder	NEB (Ipswich, USA)
1 kb DNA Ladder	NEB (Ipswich, USA)

Protein

Prestained Protein Marker, Broad Range	NEB (Ipswich, USA)
6 x His Protein Ladder	Qiagen (Hilden)

2.1.8 Antikörper

Für Immunhistochemie / Durchflusszytometrie:

Primäre Antikörper

- Anti-Oct4 (Maus IgG, 1:400, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA)
- Anti-SSEA-1 (Maus IgM, 1:80, Hybridoma Bank, Iowa, USA)
- Anti-Sox2 (Kaninchen IgG, 1:200, Abcam, Cambridge, UK)

Sekundäre Antikörper

- Alexa Fluor 488 (anti-Kaninchen IgG, 1:800, Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Alexa Fluor 488 (anti-Maus IgM, 1:500, Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Cy3 (anti-Maus IgG, 1:500, Jackson Immuno Research, West Grove, USA)

Für Western Blots:

Primäre Antikörper

- Anti-Oct4 (Maus IgG, 1:400, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA)
- Anti-Sox2 (Kaninchen IgG; 1:1000, Abcam, Cambridge, UK)
- Anti-STAT-3 (1:1000, Cell Signalling Technology, Danvers, USA)
- Anti-His Antikörper HRP gekoppelt (Qiagen, Hilden)

Sekundäre Antikörper

anti-Kaninchen HRP (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, USA)

anti-Maus HRP (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, USA)

2.1.9 Bakterienstämme

DH5 α (Gibco BRL, Karlsruhe)

Bakterienstamm für Klonierungen

BL21 (DE3) GOLD (Stratagene, La Jolla, USA)

lon- und *ompT*-Proteasen defizienter BL21-Stamm mit T7 RNA-Polymerase, welcher durch eingefügte Mutationen eine ca. 100-fach höhere Transformierbarkeit aufweist. Dieser Stamm wurde für die Expression von Oct4-TAT und Sox2-TAT benutzt.

2.1.10 Zelllinien

2.1.10.1 Fibroblasten-Zelllinien

NIH 3T3

Immortalisierte Fibroblasten Zellen der Maus (*swiss mouse embryo*), die durch uneingeschränkte Proliferation und strikte Kontakt-Inhibition charakterisiert sind.

MEF Oct4-GIP

Heterozygote embryonale Fibroblasten Zellen, die durch Verpaarung und anschließende Präparation der Föten von Oct4-GIP Mäusen (Yeom et al., 1996) mit Black6 Mäusen (Stamm-Name: C57BL/6J, *The Jackson Laboratory*, Main, USA) gewonnen wurden.

CV-1

Eine Zelllinie aus Fibroblasten der grünen Meerkatze (Kellendonk et al., 1996).

2.1.10.2 ES-Zelllinien

Oct4-GiP (Ying et al., 2002; Yeom et al., 1996)

Transgene, hybride ES-Zelllinie (129 × MF1). Regulatorische Sequenzen des murinen Oct4 Gens kontrollieren in dieser Linie die Expression von *gfp* und *pac^r* (Gen, das Puromycin-Resistenz vermittelt). Nur pluripotente Zellen und Zellen der Keimbahn sind daher positiv für GFP und resistent gegen Puromycin.

E14

Wildtyp mES-Zellen, freundlicherweise von A. Tomillin zur Verfügung gestellt (Kehler et al., 2004). Ein Supklon wurde generiert, der in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde.

Oct4 flox/flox (Kehler et al., 2004)

Transgene mES-Zelllinie mit einem E14 Hintergrund. Zellen enthalten zwei *loxP*-modifizierte *Pou5f1* Allele.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten *in vitro* (Mullis et al., 1987; Saiki et al., 1988). Dies geschieht über zyklisches Wiederholen von DNA-Denaturierung, Annealing der Primer (synthetische Oligonukleotide, welche das zu amplifizierende DNA-Fragment einrahmen, Sequenzen in Tab. 2.1) und DNA-Synthese (Extension). Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgt exponentiell. Die Reaktion wurde standardmäßig in 50 µl Volumen in einem Thermocycler (Deckeltemperatur 110 °C) durchgeführt. Die Primermenge betrug jeweils 50-100 pmol, die Menge der DNA-Matrize betrug 1-15 ng, die dNTP-Konzentration betrug 1 mM, 0,5 µl Polymerase und die entsprechende Menge an MgCl₂-haltigem 10 x Puffer wurde ebenfalls addiert.

Das PCR-Programm setzte sich folgendermaßen zusammen:

1. Denaturierung 95 °C 2 min
 2. Denaturierung 95 °C 30 sec
 3. Annealing (Temperatur variabel je nach Primerpaar) 30 sec
 4. Extension 72 °C 1 min
- Die Schritte 2-4 wurden 30 Mal wiederholt.

5. Finale Extension 72 °C 5 min Danach wurde der PCR-Block auf 4 °C gekühlt.

2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Folgende *Kits* (Reagenziensätze) wurden zur Herstellung und Aufreinigung von Plasmiden nach Herstellerprotokoll benutzt:

Für geringe Mengen DNA (3 bis 9 µg):

Mini-Kit (Peqlab, Erlangen)

Mini-Kit (Amersham, Little Chalfont, UK)

Mini-Kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)

Für größere Mengen DNA (100 bis 600 µg):

Maxi-Kit (Qiagen, Hilden)

Maxi-Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Folgendes *Kit* wurde zur Aufreinigung von Plasmiden und PCR Produkten verwendet:

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau und PCR sowie zu präparativen Zwecken verwendet. Das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA verhält sich in einem elektrischen Feld so, dass es sich mit einer Geschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichtes im Gel in Richtung Anode bewegt. Zur Herstellung der Gele wurde eine 1- oder 2 %-ige Agaroselösung (je nach Größe des zu analysierenden Fragments) in 1 x TAE Puffer durch Aufkochen hergestellt. Nach Abkühlung auf etwa 50 °C wurde 1 µg/ml des Fluoreszenz-Farbstoffes Ethidium-Bromid zugesetzt und die Agarose-Lösung in Gelkammern gegossen. Durch weitere Abkühlung entsteht ein ausgehärtetes Gel mit netzartiger Struktur, in dem durch Anlegung einer Spannung die DNA nach ihrer Größe aufgetrennt wird. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen überführt. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 15-30 min bei ca. 60-120 V, je nach Größe des Gels. Durch Bestrahlung mit UV-Licht (Sharp et al., 1973) werden die DNA-Fragmente durch die Interkalation des Ethidium-Bromids sichtbar. Die Dokumentation erfolgte über den UV-Transilluminator der BioRAD Geldoc Anlage. Die Größe der Fragmente wurde durch den

Vergleich mit einem Größenmarker festgestellt, der gleichzeitig aufgetragen wurde (Abschnitt 2.1.7).

1 x TAE : 10 mM Tris pH 8,0
 1 mM EDTA

10 x Probenpuffer: 100 mM Tris pH 8,0
 30 % Glycerin
 Spatelspitze Bromphenolblau (dunkelblau)
 Spatelspitze Xylenyanol (hellblau)

2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aus dem Gelstückchen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Hersteller-Protokoll isoliert und gereinigt.

2.2.5 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mittels der Absorption bei 260 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht mit und einer A_{260} von 1 entspricht die Konzentration von dsDNA (doppelsträngige DNA) 50 $\mu\text{g/ml}$ (40 $\mu\text{g/ml}$ RNA oder 33 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA), so dass die Konzentration sich folgendermaßen errechnet:

$$C \text{ dsDNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (A_{260} \cdot 50 \cdot f) / 1000$$

C = Konzentration

f = Verdünnungsfaktor

Außerdem wurde durch zusätzliche Messung der A_{280} die Reinheit der Probe festgestellt. Dabei sollte der Quotient A_{260}/A_{280} mehr als 1,8 betragen, ein geringerer Quotient deutet auf eine Kontamination durch Protein hin.

2.2.6 Enzymatische Manipulation von dsDNA

2.2.6.1 Restriktionshydrolyse

Für das spezifische Schneiden von dsDNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, die palindromische DNA-Erkennungssequenzen besitzen und einzelsträngige DNA-Überhänge (kohäsive Enden, „*sticky ends*“) erzeugen. Die Enzyme wurden nach den Vorschriften des Herstellers mit dem entsprechenden Puffer und der empfohlenen Reaktionstemperatur eingesetzt, in der Regel für 2 h. Da Restriktionsenzyme in glycerinhaltigen Lösungen gelagert werden, sollte ihr Anteil im Reaktionsansatz nicht mehr als 10 % betragen. Die Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.6.2 Herstellung von stumpfen DNA-Enden (*blunting*)

Um nicht-komplementäre DNA-Enden zu ligieren, müssen die DNA-Überhänge aufgefüllt werden. Dafür wurde die T4 Polymerase (NEB, Ipswich, USA) benutzt. Diese füllt die Überhänge vom 3`-Ende ausgehend bis zum 5`-Ende auf. Dafür wurden 0,5-1 µl Enzym/µg DNA eingesetzt, 100 µM dNTP's und die entsprechende Menge des dazugehörigen Reaktionspuffers. Der Ansatz wurde 12 min bei 12 °C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde der Ansatz mit 10 mM EDTA versetzt und 20 min bei 75 °C inkubiert.

2.2.6.3 Dephosphorylierung von freien DNA-Enden

Die unerwünschte Religation zweier Enden eines Plasmids kann durch die Dephosphorylierung der Enden verhindert werden. Dafür wurde die Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) benutzt. Es wurden 2 U des Enzyms pro 1 µg Plasmid DNA eingesetzt und die entsprechende Menge an Reaktionspuffer. Der Ansatz wurde 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden wurde der Ansatz 15 min bei 65 °C inkubiert.

2.2.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Für den Ligationsansatz wurde ein drei- bis fünffacher molarer Überschuss des Insert-Fragments zum Vektor-Fragment mit 1 µl T4-DNA-Ligase im entsprechenden Puffer in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl zusammengegeben. Der Ansatz wurde im Fall von kohäsiven DNA-Enden 1 h bei RT oder 16 h bei 16 °C inkubiert und 2 h bei RT im Fall von

stumpfen DNA-Enden. Danach konnte die Hälfte des Ansatzes für eine chemische Transformation eingesetzt werden.

2.2.7 Oligomer-Insertion

Dieser Schritt wurde für die Klonierung des pSESAME-C benutzt (siehe Ergebnisse 3.1.1). Für die Hybridisierung der beiden komplementären Stränge des synthetischen Oligomers (welches für TAT, NLS und die entsprechenden Schnittstellen kodiert) wurden diese in gleichen molaren Verhältnissen gemischt, auf 94 °C im Wasserbad erhitzt und langsam auf RT heruntergekühlt. Die Sequenzen der Einzelstränge des Oligomers wurden so gewählt, dass nach der Hybridisierung entsprechende DNA-Überhänge für die Ligation mit dem Vektor vorhanden waren. Der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *XhoI* behandelt. Nach der Ligation mit dem Oligomer wurde der Ansatz erneut mit *XhoI* behandelt, um eventuell gebildete Konkatomere abzutrennen. Der Restriktionsansatz wurde über ein Agarosegel aufgetrennt und der Vektor aus dem Gel aufgereinigt. Danach wurde erneut eine Ligation durchgeführt.

Oligomer-Sequenz:

5'NLS-TAT: CT AGC ACT AGT AAG AAG AAG AGG AAG GTG ACT AGT GCG GCC
GCG GGT CGC AAG AAA CGT CGC CAA CGT CGC CGT CCG CCT GCG GCC GCG C

3'NLS-TAT: TC GAG CGC GGC CGC AGG CGG ACG GCG ACG TTG GCG ACG TTT
CTT GCG ACC CGC GGC CGC ACT AGT CAC CTT CCT CTT CTT CTT ACT AGT G

2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Verifizierung von Nukleotidsequenzen klonierter Gene erfolgte über Auftragssequenzierung im Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin an der Universität zu Köln. Dazu wurden 0,3-0,5 µg Plasmid-DNA mit 10 pmol eines Sequenzierungsprimers in einem Volumen von 6 µl abgegeben. Die Sequenzanalyse wurde nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977) durchgeführt und das Ergebnis auf einem ABI Prism 377 DNA Sequencer der Firma Applied Biosystems mit BigDye Farbstoffen durchgeführt. Die weitere Analyse der im ABI-Format erhaltenen Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software Gene Inspector.

2.2.9 Präparation von genomischer DNA

Um die genomische DNA einer Zellpopulation für weitere Typisierung zu isolieren, wurden die Zellen mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst, über Zentrifugation pelletiert, in 1 ml PBS (Invitrogen) resuspendiert und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 500 µl Zellyse-Puffer aufgenommen. Der Ansatz wurde auf dem Vortex-Gerät gut gemischt und danach bei 50 °C für 2-24 h unter Schütteln inkubiert. Die DNA wurde durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation bei 13000 U/min für 30 min bei RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch die vorsichtige Zugabe von 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (15 min bei 13000 U/min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet kurz an der Luft getrocknet und danach in 40-200 µl 10 mM Tris pH 8,5 aufgenommen. Zum Lösen des Pellets wurde der Ansatz über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die genomische DNA wurde bei 4 °C gelagert.

Zellyse-Puffer: 100 mM Tris Cl, pH 8,5
 200 mM NaCl
 5 mM EDTA
 0,2 % SDS
 200 µg/ml Proteinase K (wurde frisch dazugegeben)

2.2.10 Genotypisierungs-PCR

Eine Genotypisierungs-PCR wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Rekombination in loxP-modifizierten ES-Zellen stattgefunden hat. Die genomische DNA wurde wie in Abschnitt (2.2.9) beschrieben präpariert. Es wurde eine PCR durchgeführt in einem Gesamtvolumen von 25 µl, mit 1 µl der genomischen DNA, 2,5 mM MgCl₂, 0,24 mM dNTP, 2 µM je Primer, 0,5 µl Go Taq Polymerase (Promega).

Folgendes Programm wurde benutzt:

1. Denaturierung 95 °C 5 min
 2. Denaturierung 95 °C 30 sec
 3. Annealing 58 °C 30 sec
 4. Extension 72 °C 30 sec
 5. Finale Extension 72 °C 10 min
- Die Schritte 2-4 wurden 35 Mal wiederholt.

Danach wurde der PCR-Block auf 4 °C gekühlt.

Verwendete Primer (Kehler et al., 2004):

Paar B: GOF-D1: 5'-ttgttactgaagaggttgggtgtgactgg-3'

GOF-R1: 5'-ggggactcctgctacaacaatcgetaag-3'

Paar C: GOF-AatII: 5'-aactggtttgtgaggtgtccg-3'

GOF-ApaL1: 5'-gtatccactcgcaccttggtc-3'

2.2.11 Southernblot-Analyse

Mit dieser Methode können Nukleotidsequenzen bzw. Modifikationen von DNA-Abschnitten spezifisch in der genomischen DNA nachgewiesen werden (Southern et al., 1975). In dieser Arbeit wurde die Methode eingesetzt, um das Rekombinationsereignis nach Behandlung der *Pou5f1 flox/flox* Zellen mit der transduzierbaren HTNCRE Rekombinase zu quantifizieren. Die Effekte verschiedener Konzentrationen von HTNCRE wurden verglichen.

Auftrennen und Übertragen (blotten) der genomischen DNA

Die genomische DNA, die zuvor aus jeweils $5 \cdot 10^5$ Zellen/Ansatz isoliert worden war, wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze über ein 0,8 %-iges Agarosegel über Nacht bei 10 V aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein 1 Kb DNA Marker als Größenreferenz aufgetragen. Um die Größen der resultierenden Fragmente später nachvollziehen zu können, wurde das Gel nach dem Lauf zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal unter UV-Licht fotografiert. Um die DNA zu denaturieren, wurde das Gel 20 min in 2,5 % HCl gewaschen, danach 10 min in 0,4 M NaOH. Das Übertragen der DNA von dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) erfolgte über Kapillarkräfte. Das Gel wurde auf einem Whatmanpapier abgelegt, welches in NaOH getränkt war und mit beiden Enden in einer Wanne mit 0,4 M NaOH hing. Auf das Gel wurde die Nylonmembran blasenfrei abgelegt und mit einem weiteren Whatmanpapier bedeckt. Zum Stabilisieren wurde der Aufbau mit einer dicken Schicht Apurapapier, einer Glasplatte und einem Gewicht von ca. 500 g beschwert. Das untere Whatmanpapier wurde von dem Apurapapier durch eine Schicht Frischhaltefolie getrennt, um einen Puffertransfer an der Membran vorbei zu verhindern.

Nach 15-20 h Inkubation wurde der Blott abgebaut und die Membran 2 Mal für 2 min in 2 x SSC Puffer gewaschen. Um die DNA kovalent mit der Membran zu verbinden, wurde diese zwischen zwei Whatmanpapieren für 2 h bei 80 °C gebacken.

Radioaktive Markierung

Die getrocknete Membran wurde in einer Hybridisierungsröhre mit 6 x SSC angefeuchtet. Danach wurden 20 ml einer auf 65 °C vorgewärmten Prähybridisierungslösung (ExpressHyp, BD Biosciences) zugegeben und für mindestens 1 h unter Rotieren inkubiert.

Das Templat für die Sonde ist ein DNA Fragment von 1,2 Kb, es wurde aus dem pLIT Plasmid (Kehler et al., 2004) über eine *NcoI* Hydrolysereaktion ausgeschnitten und über ein Agarosegel aufgereinigt. Die radioaktive Sonde wurde in einer PCR hergestellt, in der 25 ng DNA-Templat, 15 µl der Random Primers Buffer Mixture, je 2 µl dATP, dGTP und dTTP, 5 µl (ca. 50 µCi) α -³²P markiertes CTP (GE Healthcare) und 1 µl Klenow-Fragment in einem Gesamtvolumen von 50 µl gemischt wurden.

Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei RT inkubiert und durch Zugabe von 5 µl Stopp-Reagenz (EDTA) beendet. Der Ansatz wurde über eine Zentrifugationssäule mit Sepharosematrix (Probe Quant G50 Micro Columns, GE Healthcare) aufgereinigt und von den überschüssigen dNTPs getrennt. Die radioaktive Sonde wurde durch 5-minütige Inkubation in einem kochenden Wasserbad denaturiert und unverzüglich 5 min auf Eis gekühlt, um das Renaturieren der Einzelstränge zu verhindern. Danach wurde die radioaktive Sonde zu der Membran in den Prähybridisierungspuffer gegeben und über Nacht inkubiert.

Detektion der radioaktiven Signale

Die Membran wurde 2 Mal mit 2 x SSC + 0,1 % (w/v) SDS für je 20 min gewaschen. Danach wurde die Membran in eine Folie eingeschweißt, auf einen Biomax MS Film (Kodak) aufgelegt und in einer Kassette 2 Tage bei -80°C inkubiert.

20 x SSC (Sodium Chloride/Sodium Citrate):
3 M NaCl
0,3 M NaB₃Citrat
pH 7

2.2.12 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die reverse Transkription der mRNA einer Zellpopulation ermöglicht die Messung der Expression bestimmter Gene in dieser Population. Die Isolierung der Gesamt-RNA der Zellen erfolgte über das RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) oder PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, Carlsbad, USA). Um Kontaminationen durch genomische DNA auszuschließen, wurde die gesamte RNA mit der RQ1 RNase-freien DNase nach den Angaben des Herstellers behandelt. Danach wurde die RNA mit iScript reverse Transcriptase

(BioRad, München), nach den Vorschriften des Herstellers, in cDNA umgeschrieben. Um die Expression bestimmter Gene zu detektieren, wurden analytische PCR-Reaktionen mit folgender Zusammensetzung durchgeführt: 500 ng cDNA Templat/Ansatz, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 5 % DMSO, 0,2 mM je Primer, 0,125 µl Go Taq Polymerase (Promega, Mannheim) und die entsprechende Menge an Reaktionspuffer, in einem Gesamtvolumen von 25 µl.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

1. Denaturierung 95 °C 2 min
 2. Denaturierung 95 °C 30 sec
 3. Annealing (Temperatur je nach Primer) 30 sec
 4. Extension 72 °C 50 sec
 5. Finale Extension 72 °C 10 min
- Die Schritte 2-4 wurden 30-35 Mal wiederholt.

Danach wurde der PCR-Block auf 4 °C gekühlt.

Bei semi-quantitativer PCR wurden die PCR-Produkte auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen, als Ladekontrolle wurde eine vergleichbare Reaktion mit β -Actin Primern aufgetragen. Die Sequenzen der Primer sind in (Tab. 2.2) aufgeführt. Die Reaktionen wurden im Duplikat durchgeführt.

Bei quantitativer (q)RT-PCR wurde zu jedem Ansatz Sybr green und Fluorescein dazugegeben, und die Quantifizierung des PCR-Produkts über die Messung der Fluoreszenz durchgeführt. Auch hier wurde eine vergleichbare Reaktion mit β -Actin als Kontrolle benutzt. Die Reaktion wurde im Triplikat durchgeführt.

Tab. 2.2. Primer Sequenzen, die für RT-PCR benutzt wurden

Name	Sequenz	Annealing Temperatur (°C)	Produktgröße (Bp)
<i>b-Actin_forw</i>	5'-CTGGCTCCTAGCACCATGAA-3'	55-65	160
<i>b-Actin_rev</i>	5'-GCCGGACTCATCGTACTCCT-3'		
<i>Pou5f1_for</i>	5'-CCCTGCAGAAGGAGCTAGAAC-3'	60	160
<i>Pou5f1_rev</i>	5'-CTTAAGGCTGAGCTGCAAGG-3'		
<i>Sox2_forw</i>	5'-CCCCTTTTATTTTCCGTAGTTGTAT-3'	55	160
<i>Sox2_rev</i>	5'-TCAAACCTGTGCATAATGGAGTAAAA-3'		
<i>Nanog_for</i>	5'-AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG-3'	64	363
<i>Nanog_rev</i>	5'-CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG-3'		
<i>Klf4_forw</i>	5'-CTGCAGCTTCAGCTACCC-3'	59	160

<i>Klf4_rev</i>	5'-AATGTACACTGGGTCCAACCTC-3'		
<i>c-Myc_forw</i>	5'-TGACCTAACTCGAGGAGGAGCTGGA ATC-3'	56	160
<i>c-Myc_rev</i>	5'-AAGTTTGAGGCAGTTAAAATTATGGCTGAAGC-3'		
<i>Oct6_forw</i>	5'-AAGAACATGTGCAAGCTCAA-3'	56	173
<i>Oct6_rev</i>	5'-GCACTTGAGAAAGTGGCTCT-3'		

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien

Hochkompetente Zellen (Inoue et al., 1990)

Bakterienzellen, die mit dieser Methode kompetent gemacht wurden, weisen eine sehr hohe Transformationseffizienz auf ($1 \cdot 10^8$ Kolonien/ μg pUC 19 Kontrollplasmid) und wurden ausschließlich für Klonierungsarbeiten eingesetzt.

DH5 α Bakterienzellen wurden auf 250 ml LB-Medium (+ 50 mM MgCl₂) angeimpft und bei 24 °C inokuliert bis eine OD₆₀₀ von 0,45-0,6 erreicht wurde. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis abgekühlt und danach für 8 min bei 4500 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut, wie oben beschrieben, abzentrifugiert und in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. DMSO (RT) wurde unter leichtem Schwenken bis zu einem Gehalt von 7 % dazugegeben und der Ansatz für weitere 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, in einem Ethanol-Trockeneisbad schockgefroren und danach bei -80 °C gelagert.

TB-Puffer:

- 10 mM Pipes
- 55 mM MnCl₂
- 15 mM CaCl₂
- 250 mM KCl

Zellen mittlerer Effizienz (Chung et al., 1998)

Dieses Protokoll wurde angewendet, um kompetente Bakterien für die Proteinexpression oder Retransformationen von Plasmiden herzustellen.

Es wurde eine Übernachtskultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Bakterienstamm hergestellt. Am Folgetag wurden 200-400 ml LB-Medium mit der Übernachtskultur 1:100

angeimpft und bis eine OD₆₀₀ von 0,4-0,45 erreicht war bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Danach wurde die Kultur 5 min auf Eis gekühlt und bei 4 °C und 4000 U/min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in eisgekühltem TSS-Puffer vorsichtig resuspendiert (1/10 des Kulturvolumens) und in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Ansätze wurden in einem Ethanol/ Trockeneisbad schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

TSS-Puffer: LB-Medium
 10 % Polyethylenglycol (PEG) 4000
 5 % DMSO
 50 mM MgCl₂
 pH 6,5, sterilfiltriert

2.3.2 Bestimmung der Transformationseffizienz

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde ein Aliquot der Zellen, wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, mit 100 ng pUC19 Plasmid-DNA transformiert. Danach wurden jeweils 100 µl einer Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) auf Selektiv-Agar ausgestrichen. Aus der Anzahl gewachsener Kolonien wurde nach der unten genannten Formel die Transformations-Effizienz ermittelt:

$$\frac{\text{Kolonien auf der Platte} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\mu\text{g zugegebener DNA}} = \text{Transformationseffizienz}$$

2.3.3 Chemische Transformation von Bakterien

Zur Transformation chemisch kompetenter DH5α Zellen für Klonierungsschritte, wurde ein Aliquot der Zellen auf Eis aufgetaut und 50 µl der kompetenten Bakterien mit etwa 100 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für 40 sec einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 450 µl SOC-Medium zugegeben. Zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenz wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert. 100 µl des Ansatzes wurden unverdünnt auf Selektiv-Agar ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert, der Rest wurde pelletiert, in 100 µl Medium aufgenommen und in konzentrierter Form ausplattiert.

Für Proteinexpressionen wurde der BL21 (DE3) GOLD Stamm benutzt. Es hat sich gezeigt, dass eine Hitzeschocktemperatur von 30 °C zu besseren Ausbeuten an löslichem

rekombinantem Protein führt. Nach der Zugabe des SOC-Mediums wurde der Transformationsansatz 1 h ebenfalls bei 30 °C inkubiert und für eine Übernachtskultur in LB-Medium angeimpft und bei 30 °C über Nacht inkubiert.

SOC-Medium:

- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 2 % Trypton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄
- 20 mM Glucose

LB-Medium (Luria Bertani):

- 0,5% (w/v) Hefe-Extract
- 1% (w/v) Trypton
- 1% (w/v) NaCl

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinexpression

Als Protein-Expressionsstamm wurde der BL21 (DE3) GOLD genutzt. Die chemisch kompetenten Zellen wurden, wie im Abschnitt 2.3.3 beschrieben, transformiert und in LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenecillin angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht im Schüttler bei 140 U/min und 30 °C inkubiert.

Für die Expression wurde TB-Medium verwendet, versetzt mit 0,5 % Glukose und 100 µg/ml Ampicillin. Die Expressionskultur wurde 1:20 mit der Übernachtskultur angeimpft. Je 2 L Expressionsmedium wurden in einem 5 L Schikanekolben im Schüttler bei 110 U/min und 37 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀=1,5 wurde die Expression mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid) induziert, welches in einer Endkonzentration von 0,5 mM dazugegeben wurde. Nach einer Stunde wurde die Inkubation beendet, die Kolben bei 4 °C gekühlt und nacheinander bei 4 °C und 6000 g für 10 min in einer Megafuge 1.0R abzentrifugiert. Die Pellets wurden bei -20 °C gelagert.

TB -Medium (Terrific Broth):

- 2,4 % (w/v) Hefeextract
- 1,2 % (w/v) Trypton

9,4 % (w/v) K_2HPO_4

0,22 % (w/v) KH_2PO_4

0,8 % (v/v) Glycerin

2.4.2 Proteinaufreinigung

Alle Schritte der Aufreinigung der rekombinanten Oct4 und Sox2 Proteine aus den Expressionskulturen erfolgten bei 4 °C. Die Pellets wurden in Lysepuffer (Tab. 2.3) unter Rühren resuspendiert (1/50 des Kulturvolumens). Die Lyse der Bakterien erfolgte in einem ersten Schritt chemisch über Lysozyme (Sigma), welches in einer Endkonzentration von 1 mg/ml eingesetzt wurde. Nach 10-15 min Inkubation auf dem Magnetrührer nimmt der Ansatz eine viskose Konsistenz an. Um die Nukleinsäuren aufzulösen, wurde zu diesem Zeitpunkt 10-15 U/ml Benzonase zugegeben und der Ansatz 10-15 min unter Rühren inkubiert. Nachdem der Ansatz durch die Hydrolyse der Nukleinsäuren wieder eine flüssige Konsistenz angenommen hatte, wurde ein mechanischer Lyseschritt durch Ultraschall durchgeführt. Der Ansatz wurde 2-3 min mit dem Sonicator SONOPLUS HD 2070 in 5 msec Pulsen mit 45 % Stärke behandelt. Danach wurde der Ansatz bei 17200 g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Da beide Proteine jeweils in der löslichen und unlöslichen Fraktion des Zellysats vorhanden sind, wurden beide Fraktionen weiter bearbeitet.

2.4.2.1 Proteinaufreinigung aus der löslichen Fraktion

Die Aufreinigung der löslichen Fraktion wurde standardmäßig für rekombinantes Oct4 und Sox2 angewendet. Die Aufreinigung erfolgte über Ni(II)-Affinitätschromatographie. Dafür wurde der Überstand des Zellysats mit Ni-NTA Agarose (Invitrogen oder Qiagen) 1:20 versetzt und 1 h bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Danach wurde der Ansatz über eine Econo-Pac Chromatographiesäule (BioRad) gegeben, in der sich die Säulen Matrix absetzt. Das Bettvolumen der abgesetzten Matrix entspricht der Hälfte des zugegebenen Ni-NTA Volumens. Der Waschschrift erfolgte mit einem 8-fachen Bettvolumen an Waschpuffer (Tab. 2.3), wobei der Imidazolgehalt des Waschpuffers für jedes Protein optimiert wurde. Für die Elution wurde das 3-fache Bettvolumen an Elutionspuffer (Tab. 2.3) über die Säule gegeben und aufgefangen. Die Reinheit des Eluats wurde über ein PAA-SDS-Gel analysiert und mit Hilfe der Image J Software (NIH, Bethesda, USA) quantifiziert.

Tab. 2.3. Zusammensetzung der verwendeten Puffer für Ni(II)-Affinitätschromatographie

	Lysepuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
10 x PTP	10 %	10 %	10 %
NaCl (5M)	500 mM	500 mM	500 mM
Imidazol (1M)	10 mM	90 mM für Oct4 80 mM für Sox2	250 mM

10 x Phosphat-Tris-Puffer (PTP):
 500 mM Na₂HPO₄
 50 mM Tris
 pH 7,8

2.4.2.2 Proteinaufreinigung aus der unlöslichen Fraktion

Um das Protein aus der unlöslichen Fraktion des Zelllysats aufzureinigen, sollten die Einschlusskörper (*Inclusion bodies*) mehrfach gewaschen werden. Das Pellet des Zelllysats wurde in einer Waschlösung (0,5 % Triton X100, 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 0,1 % Natriumazid) resuspendiert (15 ml/ 1L Kulturvolumen) und danach bei 25000 g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde 4-5 Mal wiederholt. Die gereinigten Einschlusskörper wurden gelöst in 6 M Guanidinium HCl (GuaCl), 50 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA und 10 nM DTT. Der Ansatz wurde über Nacht unter Rotieren bei 4 °C inkubiert, um die Einschlusskörper vollständig zu lösen. Danach wurde der Ansatz für 20 min bei 25000 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Um den besten Rückfaltungspuffer zu ermitteln, wurden 15 verschiedene Rückfaltungsbedingungen getestet (Protein Refolding Kit, Athena Enzyme System Group). 950 µl der resolvierten Einschlusskörper wurden mit je 50 µl der Rückfaltungspuffer vorsichtig gemischt und bei RT für 1 h unter Rotieren inkubiert. Der für Oct4 am besten geeignete Rückfaltungspuffer hatte folgende Zusammensetzung: 50 mM 2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure (MES) pH 6, 240 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,4 M Sacherose, 0,75 GuaCl, 1 mM DTT.

Aus diesem Ansatz wurde Oct4 über Ni(II)-Affinitätschromatographie, wie im Absatz 2.4.2.1 beschrieben, aufgereinigt.

2.4.3 Lagerung von Proteinen

Die Proteine konnten kurzfristig (1-2 Tage) ohne Aktivitätsverlust im Elutionspuffer gelagert werden. Für langfristige Lagerung wurden die Eluate gegen einen Glycerolpuffer (50 % Glycerin, 1 M NaCl, 1 M EDTA, 1 M DTT) dialysiert. Die Dialyse erfolgte 2 Mal gegen den 100-fachen Überschuss, unter Rühren, bei 4 °C für mindestens 15 h insgesamt. Es wurden Dialyseschläuche mit einer molekularen Ausschlussgröße von 10 kDa eingesetzt. Danach wurden die Ansätze steril filtriert. Die so gewonnenen Proteine konnten für mindestens 3 Monate bei -20 °C gelagert werden.

2.4.4 Herstellung des Transduktionsmediums

Zellkulturmedien für die Proteintransduktion wurden hergestellt, indem die Glycerolstocks von Oct4TH und Sox2NTH mindestens 1:20 in das Zellkulturmedium verdünnt wurden. Um die Serumbedingungen möglichst niedrig zu halten, wurde *Advanced* DMEM (Invitrogen) benutzt, das mit 5 % FKS (Gibco), 0,5 % Albumax II (Gibco), 0,5 % Insulin-Transferin-Selinit (ITS) (Gibco), 0,5 mM Natriumpyruvat (Gibco), 0,05 mM nicht-essentiellen Aminosäuren (Gibco), 2 mM Glutamin (Gibco) und 100 µM β-Mercaptoethanol (Sigma) supplementiert worden war. Für die Kultivierung von ES-Zellen wurden 1000 U/ml LIF (Millipore, Billerica, USA) dazugegeben. Die Mischung wurde 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, um den größten Anteil des instabilen Proteins zu präzipitieren, und dann 5 min bei 2500 g abzentrifugiert und steril filtriert. Die Proteinkonzentration im Medium wurde über Western Blot analysiert.

2.5 Analytische biochemische Methoden

2.5.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Der Bradfordtest dient der Bestimmung des Gesamtproteingehalts in wässrigen Lösungen. Er beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie Brilliant Blue Lösung bei Bindung des Farbstoffes an Proteine von 465 auf 595 nm verschiebt (Bradford, 1976). Es handelt sich um eine unspezifische Bindung des Farbstoffes vorwiegend an kationische, nicht-polare und hydrophobe Seitenketten. Die Intensitätszunahme der Farbreaktion ist über einen Bereich von 0,2-1,4 mg Protein/ml Lösung annähernd linear. Es

wurde der Bradford Reagent (Sigma) verwendet. Dabei wurden 750 µl des Coomassie Reagenz' mit 25 µl der Proteinlösung vermischt und nach ca. 5 min die Absorption der Lösung bei 595 nm gemessen. Als Referenz wurde eine Kalibrierungskurve mit bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt. Es ist zu beachten, dass die Reaktion durch SDS (> 0,1 %) und starke Basen beeinflusst werden kann. Das Ergebnis ist jedoch auch abhängig von der Aminosäurezusammensetzung des Proteins, so dass die aus der BSA-Kalibrierungskurve abgeleiteten Proteinkonzentrationen immer nur einen Anhaltspunkt darstellen.

2.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vor der Elektrophorese wurden die Proteinproben mit SDS-Probenpuffer versetzt. Dieser enthält das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) um die Proteine zu denaturieren und negativ zu laden, sowie β -Mercaptoethanol um die Reduktion der Disulfidbrücken zu bewirken. Dabei bindet SDS an das Protein gewöhnlich in einem Verhältnis von einem Molekül SDS pro 1,4 Aminosäureresten. Die Eigenladung des Proteins kann neben der Negativladung des mit SDS komplexierten Proteins vernachlässigt werden, so dass SDS-beladene Proteine identische Ladungs-Masse-Verhältnisse zeigen. In SDS-haltigen Polyacrylamidgelen (PAA-Gelen) wandern Proteine mit Geschwindigkeiten, die dem Logarithmus ihrer Masse umgekehrt proportional sind (Laemmli, 1970). Die Auftrennung beruht daher allein auf dem Siebeffekt. Die Proben wurden 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 100 °C inkubiert und kurz abzentrifugiert. Von der Probe wurden 5 µl aufgetragen. Es wurden standardmäßig 10 %-ige SDS-PAA-Gele benutzt (Zusammensetzung, siehe Tab. 2.4). Zusätzlich bestehen die Gele aus einem ca. 1,5 cm langen, 5 %-igem Sammelgel, in dem sich die Taschen befinden. Es sorgt durch seine niedrigere Prozentigkeit für ein Sammeln der Proben, bevor sie über das 10 %-ige Trenngel aufgetrennt werden. Die Elektrophorese wurde mit einer Mini-PROTEAN III Zelle (BioRad) durchgeführt. Die Gele wurden 50 min einer elektrischen Spannung von 200 V ausgesetzt. Nach dem Lauf wurden die Gele 3 x 5 min mit Wasser gewaschen, um das SDS zu entfernen und dann für mindestens 1 h in Coomassie Färbelösung (Gel Code Blue Stain Reagent, Pierce) angefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen. Um das Gel zu entfärben, wurde es anschließend mindestens 1 h in destilliertem Wasser gewaschen. Mit dem Gel Dry System (Invitrogen) wurde das Gel getrocknet.

Tab. 2.4: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen eines SDS-PAA Gels

	Sammelgel (5%)	Trenngel (10%)
30% Acrylamidlösung	0,33 ml	1,6 ml
Sammel-/Trenngelpuffer	0,25 ml	1,3 ml
10 % APS	0,02 ml	0,05 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml
H ₂ O	1,4 ml	1,7 ml

Sammelgelpuffer (pH 6,8):

0,5 M Tris

0,4% SDS

10 x Laemmli-Puffer:

Trenngelpuffer (pH 8,8):

1,5 M Tris

0,4% SDS

25 mM Tris

192 mM Glycin

1 % SDS

2 x SDS-Probenpuffer:

20 % Glycerin

6 % SDS

0,02 % Bromphenol blau

6 % β -Mercaptoethanol

2.5.3 Western Blot

Um ein Protein spezifisch in den Fraktionen einer Aufreinigung oder einer Zellpopulation nachzuweisen, werden diese Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und dann durch das Anlegen eines elektrischen Feldes von dem Gel auf eine Membran übertragen. Danach kann das Protein mittels spezifischer Antikörper detektiert werden. Die Übertragung erfolgte über zwei unterschiedliche Methoden:

2.5.3.1 Semi-dry Blot

Diese Methode wurde bei der Analyse von Proteinaufreinigungen angewandt. Dabei wurde das SDS-PAA-Gel nach dem Lauf, die Nitrocellulose Membran (Roth) und 8 Whatmanpapiere, die etwas größer als das Gel zurechtgeschnitten wurden, für 2-5 min in Western-Transfer-Puffer (*semi-dry*) eingeweicht. Der Blot wurde auf der Anode der Blotting-Apparatur (Biometra) aufgebaut, indem zuerst 4 Lagen Whatmanpapier aufeinander geschichtet wurden, danach die Membran und dann das Gel aufgelegt wurden. Das Gel wurde

0,5 % Milchpulver/TBS-T verdünnt und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert (Antikörper-Verdünnungen sind im Abschnitt 2.1.8 aufgeführt). Danach wurde der Blot 3 Mal 5 min mit 25 ml TBS-T gewaschen. Der entsprechende sekundäre Antikörper, Horse-Redish-Peroxidase (HRP) gekoppelt, wurde in 3 ml TBS-T verdünnt und 1 h bei RT mit dem Blot inkubiert. Danach wurde der Blot 3 Mal 5 min mit TBS-T gewaschen.

Wenn der Anti-His-HRP Antikörper (Qiagen) eingesetzt wurde, wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

Die Peroxidase-Aktivität des sekundären Antikörpers wurde durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Dazu wurde das SuperSignal West Pico Chemilumineszenz Substrat (Pierce) nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei schwachen Signalen wurde zur Verstärkung das Substrat in der „femto“-Variante benutzt. Die Signale wurden mit der CCD-Kamera eines ChemiDoc XRS Systems (BioRad) eingefangen und vom Programm QuantityOne (Version 4.5.2; BioRad) als TIF-Dateien gespeichert.

TBS-T:	150 mM NaCl
	0,05 % (v/v) Tween 20
	20 mM Tris-Cl
	pH 7,5

2.5.4 Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)

Mit Hilfe dieser Methode kann die DNA-Bindungsfähigkeit eines Proteins an eine DNA-Zielsequenz getestet werden. Eine DNA-Zielsequenz wird als synthetisches, doppelsträngiges DNA-Oligonukleotid biotinyliert und mit dem Protein inkubiert. Wenn das Protein an die Zielsequenz bindet, verändert sich das Laufverhalten der DNA-Probe in einem nativen PAA-Gel und es entsteht eine zusätzliche Bande. Für die Durchführung und Entwicklung des EMSA wurde das LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (Pierce) benutzt. Die biotinylierte Zielsequenz (Invitrogen) wurde zusammen mit dem Protein in folgendem Ansatz inkubiert:

2 µl 10 x Binding Buffer
1 µl Poly (dI.dC)
2 µl biotinylierte DNA-Probe (Endkonzentraion 2 fmol)
1 µl Proteinextrakt (Glycerol Stock)

Der Ansatz wurde mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt.

In einigen Ansätzen wurde zusätzlich ein spezifischer Antikörper eingesetzt, um das Protein zu identifizieren und damit einen sogenannten *Supershift* zu erzeugen. Von dem Oct4 Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) wurden 4 µl eingesetzt, von dem Sox2 Antikörper (Abcam) 8 µl.

Die Ansätze wurden 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden 5 µl Ladebuffer hinzugegeben und 20 µl auf ein natives PAA-Gel aufgetragen. Das Gel wurde vor dem Beladen in 0,5 x TBE für 1 h einer Stromspannung von 100 V ausgesetzt. Nach Auftrag der Proben wurde das Gel 45 min bei 100 V angeschlossen.

Die Proben wurden danach in der Blotting-Apparatur (Biometra) von dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) übertragen (bei 150 mA für 25 min). Die DNA wurde durch 45 min UV-Bestrahlung auf dem UV-Tisch mit der Membran kovalent verbunden. Der Blot wurde nach Herstellerprotokoll entwickelt.

DNA-Probe (Rodda et al., 2005):

5`-CTTACAGCTTCTTTTGCATTACAATGTCCATGGTGGA-3`

Natives PAA-Gel :	8 ml Acrylamid (30 % Arylamid)
(für 40 ml 6 %iges natives Acrylamidgel)	4 ml 5 x TBE-Laufpuffer
	2 ml Glycerol
	26 ml H ₂ O
	300 µl APS (10 %)
	30 µl TEMED
5 x TBE-Laufpuffer, pH 8,13-8,23:	0,4 M Tris-base
	0,4 M Borsäure
	0,01 M EDTA

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Kultivierung von murinen embryonalen Stammzellen

Murine ES-Zellen wurden auf wachstumshinhibierten embryonalen Fibroblasten oder gelatinierten Platten kultiviert. Dafür wurde der Plattenboden mit 0,1 % Gelatine (Sigma) bedeckt und mindestens 20 min inkubiert. Das Kulturmedium setzt sich folgendermaßen

zusammen: DMEM (*high-glucose*) (Invitrogen), 15 % FKS, 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 100 µM β-Mercaptoethanol und 1000 U/ml LIF. Das Medium wurde täglich gewechselt.

Die Zellen wurden alle 2-3 Tage mit Trypsin (Gibco) abgelöst, vereinzelt und auf neuen Kulturschalen in niedriger Dichte ausgesät.

2.6.2 Kultivierung von Fibroblasten Zellen

CV-1 Fibroblasten, NIH 3T3 Zellen und murine, embryonale Fibroblasten (MEFs) wurden standardmäßig in folgendem Medium kultiviert: DMEM (*high glucose*) mit 10 % FKS, 0,1 % nicht-essentiellen Aminosäuren, 1mM Natrium-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin. Die Zellen wurden alle 3-7 Tage passagiert und das Medium alle 2 Tage gewechselt.

2.6.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen ebenfalls mit Trypsin vereinzelt, in DMEM aufgenommen, mit der äquivalenten Menge an 2 x Einfriermedium gemischt, $1,2 \cdot 10^6$ Zellen/Kryoröhrchen bei -80 °C langsam eingefroren und bei -180 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2 x Einfriermedium:	60 % DMEM
	20 % DMSO
	20 % FKS

2.6.4 RNA-Interferenz

Durch das Einführen von dsRNA-Sequenzen (19-21 Bp) aus einem Zielgen kann das endogene Expressionsniveau dieses Gens reduziert werden, indem die mRNA posttranskriptional abgebaut wird (Tuschl et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde diese Methode angewandt, um die Expression von *Pou5f1* und *Sox2* zu reduzieren. Dafür wurde die Methode der direkten Transfektion der dsRNA-Oligonukleotide gewählt, auch *short interfering RNA* (siRNA) genannt. Die RNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen. Für die Transfektion wurde das Reagenz Lipofectamine 2000 (Invitrogen) benutzt. Bei dem *Pou5f1 knock down (k.d.)* wurde eine

Endkonzentration von 80 nM siRNA und 8 µl Lipofectamine eingesetzt. Die beiden Komponenten wurden jeweils mit 250 µl Opti-MEM Medium (Invitrogen) versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden beide Ansätze gemischt und weitere 15 min bei RT inkubiert. Für den Sox2 *k.d.* wurde eine Endkonzentration von 130 nM siRNA und 16 µl Lipofectamine eingesetzt, die jeweils in 500 µl Opti-MEM gelöst wurden. Als Negativ-Kontrolle wurde die AllStars Negative Control siRNA (Qiagen) benutzt, die parallel zu jedem Ansatz unter den gleichen Bedingungen eingesetzt wurde. Während der Inkubationszeit wurden $2 \cdot 10^5$ ES-Zellen/6-Well-Vertiefung in 2 ml K.O. DMEM Medium (Invitrogen) ausgesät. Danach wurden die Transfektionsansätze in je ein Well überführt und bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

RNA-Oligonukleotid-Sequenzen:

Pou5f1 siRNA (Hey et al., 2004): GGA UGU GGU UCG AGU AUG G

Sox2 siRNA (Ivanova et al., 2006): GGU UGA UAU CGU UGG UAA U

2.6.5 Durchflusszytometrie

Die SSEA-1 Expression an der Oberfläche von mES-Zellen wurde über Durchflusszytometrie untersucht. Dafür wurden $3 \cdot 10^5$ E14 ES-Zellen/Vertiefung einer 12-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden 2 Tage, wie im Abschnitt 2.4.4 beschrieben, mit Proteintransduktionsmedien behandelt. Danach wurden die Zellen mit Triple-Express (Invitrogen) abgelöst, durch Pipettieren vereinzelt und bei 4 °C und 1200 U/min für 3 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl PBS/5 % FKS resuspendiert, der SSEA-1Antikörper (Hybridoma Bank) in einer Verdünnung 1:80 dazugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 2 ml PBS zugefügt, die Zellen abzentrifugiert und das Zellpellet in 500 µl PBS/ 5 % FKS resuspendiert. Der sekundäre anti-Maus-IgM Antikörper Alexa 488 gekoppelt (Invitrogen) wurde in einer Verdünnung von 1:500 dazugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 500 µl PBS/5 % FKS resuspendiert. Vor der Analyse wurde der Ansatz mit 1 µl Hoechst 33258 (Molecular Probes) versetzt, um die toten Zellen von lebendn zu unterscheiden. Die Exitation und Messung der Fluoreszenz wurde an einem drei-Laser LSRII analytischem Durchflusszytometer (BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt. Die Daten wurden mit der Flowjo Software (Tree Star, Inc., OR, USA) analysiert.

2.6.6 Immunzytochemie

Die Zellen wurden 2 Mal mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) 10 min bei RT inkubiert, um sie zu fixieren. Danach wurden sie 2 mal mit PBS gewaschen und zum Blockieren 30 min bei RT mit Blockierungslösung inkubiert. Danach wurde der primäre Antikörper in Blockierungslösung verdünnt auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert (Antikörperverdünnungen, siehe Abschnitt 2.1.8). Nach 3 Waschschritten mit PBS (je 5 min) wurde der sekundäre Antikörper dazugegeben, der ebenfalls in der Blockierungslösung verdünnt wurde, und 2 h bei RT abgedunkelt inkubiert. Anschließend folgte ein 5 minütiger Waschschrift in PBS. Um die Zellkerne anzufärben, wurde eine 4,6-di-Amino-2-Phenylindole (DAPI) Färbung durchgeführt. Dafür wurde DAPI 1:1000 in 10 mM HEPES verdünnt und 5 min mit den Zellen inkubiert. Danach wurde 3 Mal 5 min mit PBS gewaschen, 40 µl Moviol in das Well gegeben und die Zellen mit einem entsprechenden Deckelglas bedeckt.

Blockierungslösung:	PBS
	5 % FKS
	0,1 % Triton X100

2.6.7 Alkalische Phosphatase-Aktivität

Alkalische Phosphatase-Aktivität gilt als Charakteristikum von undifferenzierten ES-Zellen (Pease et al., 1990). Zum Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität wurden Zellen, wie in Abschnitt 2.6.6 beschrieben, fixiert und anschließend mit dem *Alkaline Phosphatase Substrate Kit III* (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) behandelt (erzeugt ein blaues Reaktionsprodukt). Das *Kit* wurde nach Herstellerangaben benutzt.

2.6.8 Rhodamin-Markierung von Proteinen

Der fluoreszierende Farbstoff Rhodamin bildet eine stabile kovalente Amid-Bindung mit primären Aminogruppen und eignet sich daher sehr gut, um Proteine zu markieren. In dieser Arbeit wurden die rekombinant hergestellten Proteine Oct4 und Sox2 mit Rhodamin markiert, um die zelluläre Aufnahme zu visualisieren. Hierzu wurden die Proteine, wie im Abschnitt 2.4.2.1 beschrieben, aufgereinigt. Die Eluate mussten vor der Markierung von Imidazol

befreit werden, da dieses ebenfalls primäre Aminogruppen enthält. Dafür wurden die Proteine aus dem Elutionspuffer in einen vorgekühlten Imidazol-freien Puffer (500 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4) über eine PD-10 Entsalzungssäule (GE Healthcare) umpuffert. Danach wurde das Protein mit einem 5-fachen molaren Überschuss an Rhodamin (Pierce) 2 h auf Eis inkubiert. Ungebundenes Rhodamin wurde über einen weiteren Umpufferungsschritt über eine PD-10 Säule entfernt. Das Protein wurde in *Advancend* DMEM (Invitrogen) eluiert und mit 5 % FKS (Gibco) und 0,5% Albumax II (Gibco) supplementiert. Um instabiles Protein vor der Inkubation mit Zellen zu entfernen, wurde das proteinhaltige Medium 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und bei 2500 g abzentrifugiert. Zuvor wurden CV-1 Zellen für die Proteinbehandlung vorbereitet. $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden auf einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Frühestens 4 h nach der Aussaat wurde eine Hoechst-Färbung (Molecular Probes, Carlsbad, USA) durchgeführt (1 μ M, 15 min), um die Zellkerne anzufärben. Danach wurden die Zellen 30 min mit dem proteinhaltigen Medium behandelt. Um nicht-internalisiertes Protein zu entfernen, wurden die Zellen 3 Mal mit Heparin (Sigma) gewaschen (0,5 mg/ml in PBS).

2.6.9 Erstellung von Wachstumskurven

NIH 3T3 Zellen wurden in einer 12-Well-Platte ausgesät ($5 \cdot 10^4$ pro Vertiefung). Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben mit Transduktionsmedium behandelt. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen mit Triple-Express abgelöst, durch Pipettieren vereinzelt, gezählt und $5 \cdot 10^4$ Zellen/Well replattiert. Das Experiment wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Das pSESAME Vektorsystem als Basis für die Herstellung transduzierbarer Proteine

Zur Herstellung von rekombinanten transduzierbaren Proteinen müssen diese mit funktionalen Peptiden versehen werden, welche eine Aufreinigung ermöglichen, sowie Membranpermeabilität und Kernlokalisierung der Proteine vermitteln. Dies kann über Fusion auf genetische Ebene oder durch chemische Kopplung erreicht werden. Die Orientierung und Anordnung dieser funktionalen Peptide haben einen großen Einfluss auf die Faltung und Stabilität der Fusionsproteine (Braun et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde ein genetischer Fusionsansatz mit den entsprechenden Sequenzen gewählt, um die spezifische Translokation des Zielproteins zu erreichen. Da es bisher kein rationales Design für transduzierbare Proteine gibt (Patsch & Edenhofer 2007), sondern die Ermittlung der besten Anordnung der funktionalen Peptide auf empirischen Studien basiert, sollte ein Vektorsystem hergestellt werden, das ausgehend von einem Basisvektor mit wenigen Klonierungsschritten ermöglicht, die verschiedenen Kombinationen an Sequenzen der funktionalen Peptide an das Zielgen anzuhängen. Dieser als pSESAME bezeichnete Vektor entstand auf der Basis eines bereits erfolgreich verwendeten Vektors für die Herstellung der transduzierbaren HTNCre-Rekombinase (Peitz et al., 2002). Es wurden zwei Varianten des Vektors hergestellt, pSESAME-N und pSESAME-C, in denen die funktionalen Peptide entweder N- oder C-terminal mit dem Protein fusioniert wurden (Abb. 3.1). Die Vektoren enthalten die kodierende Sequenz für einen Histidin-Tag (*His-Tag*), welcher zur Aufreinigung der Proteine dient, ein Kernlokalisierungssignal (NLS) und die TAT-Domäne als Proteintransduktionsdomäne (PTD). Die DNA-Sequenzen des NLS und der TAT-Domäne sind von Restriktionsschnittstellen jeweils eines Restriktionsenzym flankiert, so dass sie durch einen einzigen Restriktionshydrolyseschritt entfernt werden können. Außerdem können Sequenzen von anderen funktionalen Peptiden über zusätzliche Schnittstellen hinzugefügt werden. Das Übertragen des Gens von einer Vektorvariante zur anderen ist durch eine Restriktionshydrolyse mit *AvrII* und *NheI* und der Ligation der kompatiblen Enden möglich. Im folgenden Text wird der *His-Tag* als (H), das NLS als (N) und die TAT-Domäne als (T) bezeichnet.

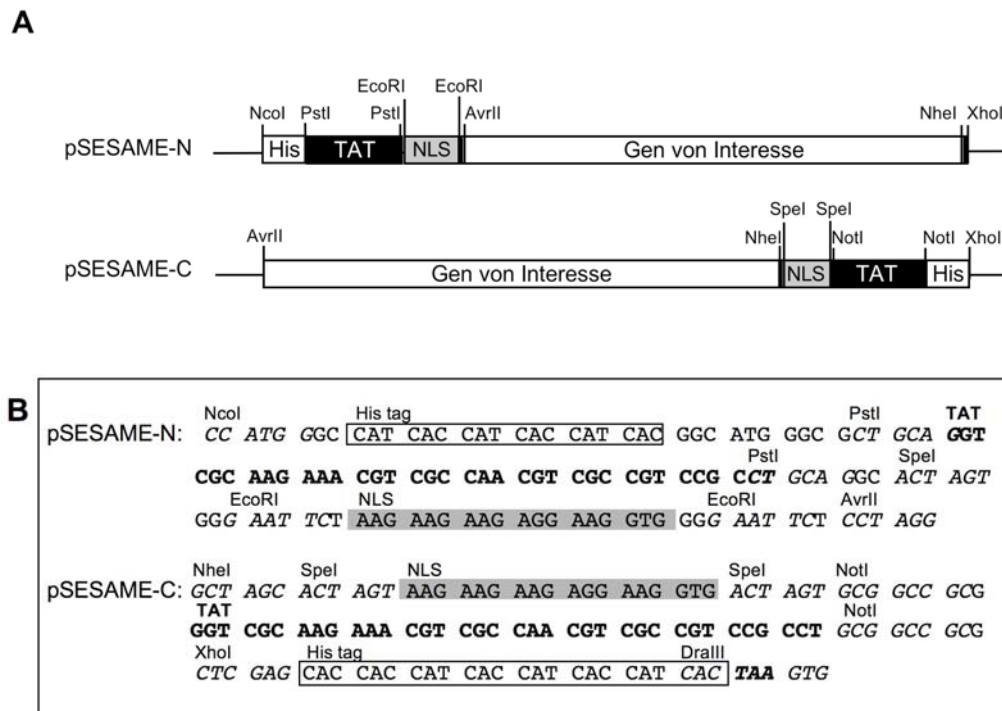


Abb. 3.1. Das pSESAME Vektorsystem erleichtert die Herstellung verschiedener Varianten transduzierbarer Proteine

A. Schematische Darstellung des pSESAME Vektorsystems. In pSESAME-N werden die funktionalen Domänen N-terminal, in pSESAME-C C-terminal mit dem Zielprotein fusioniert. Beide Vektorvarianten enthalten die kodierenden Sequenzen für einen *His-Tag*, ein Kernlokalisierungssignal (NLS) und für TAT-Domäne. Restriktionsschnittstellen, welche diese Sequenzen flankieren, ermöglichen bei Bedarf die Deletion einzelner Sequenzbereiche.

B. Sequenzen der funktionalen Peptide der pSESAME Vektoren. Der *His-Tag* ist eingerahmt, die TAT-Domäne fettgedruckt, das NLS grau unterlegt und die Schnittstellen kursiv dargestellt.

3.1.1 Klonierung der pSESAME-*Pou5f1* Varianten

Das pTriEx-*HTNCre* Plasmid wurde als Basis für die Klonierung des pSESAME Vektorsystems genutzt (Peitz et al., 2002). Das *NLS-Cre* kodierende Fragment wurde durch eine Restriktionshydrolyse mit *SpeI* und *XhoI* entfernt. *NLS-Pou5f1* (kodiert für NLS-Oct4) wurde durch PCR generiert, über *SpeI* und *XhoI* Schnittstellen mit pTriEx-HT ligiert und somit pSESAME-N-*Pou5f1* (pSESAME-*HTNPou5f1*) generiert (Abb. 3.2).

Um pSESAME-C-*Pou5f1* herzustellen, wurden die N-terminal fusionierten Sequenzen aus pSESAME-N-*Pou5f1* durch eine Restriktionshydrolyse mit *NcoI* und *EcoRI* entfernt. Die kohäsiven Enden wurden durch eine T4 Polymerase zu stumpfen Enden aufgefüllt und ligiert. Die C-terminalen kodierenden Sequenzen (*NLS-TAT*), flankiert von den entsprechenden Restriktionsschnittstellen, wurden als synthetisches Oligonukleotid über *NheI* und *XhoI* Restriktionsschnittstellen mit pSESAME-*Pou5f1* ligiert, resultierend in pSESAME-C-*Pou5f1*

(pSESAME-*Pou5f1*NTH). Ein C-terminaler *His-Tag* ist bereits im Vektor vorhanden (Abb. 3.3).

3.1.2 Klonierung der pSESAME-*Sox2* Varianten

Parallel zu der Herstellung von N-terminal fusioniertem *Pou5f1* wurde die N-terminal fusionierte Variante von *Sox2* hergestellt. Die cDNA von *Sox2* wurde über PCR amplifiziert und mit den Restriktionsschnittstellen für *AvrII* und *NheI* versehen. Danach wurde das Fragment über die genannten Schnittstellen mit pSESAME-N ligiert, das Produkt wird als pSESAME-N-*Sox2* (pSESAME-HTN*Sox2*) bezeichnet (Abb. 3.2). Durch das Übertragen von *AvrII-Sox2-NheI* in pSESAME-N über einen einfachen Klonierungsschritt entstand pSESAME-C-*Sox2* (pSESAME-*Sox2*NTH) (Abb. 3.3).

Die NLS- und TAT-losen Derivate von pSESAME-*Pou5f1*NTH und pSESAME-*Sox2*NTH konnten durch einzelne Restriktionshydrolyse-Schritte und anschließende Ligation generiert werden. Eine Übersicht aller hergestellten Konstrukte ist in Tab. 3.1 dargestellt.

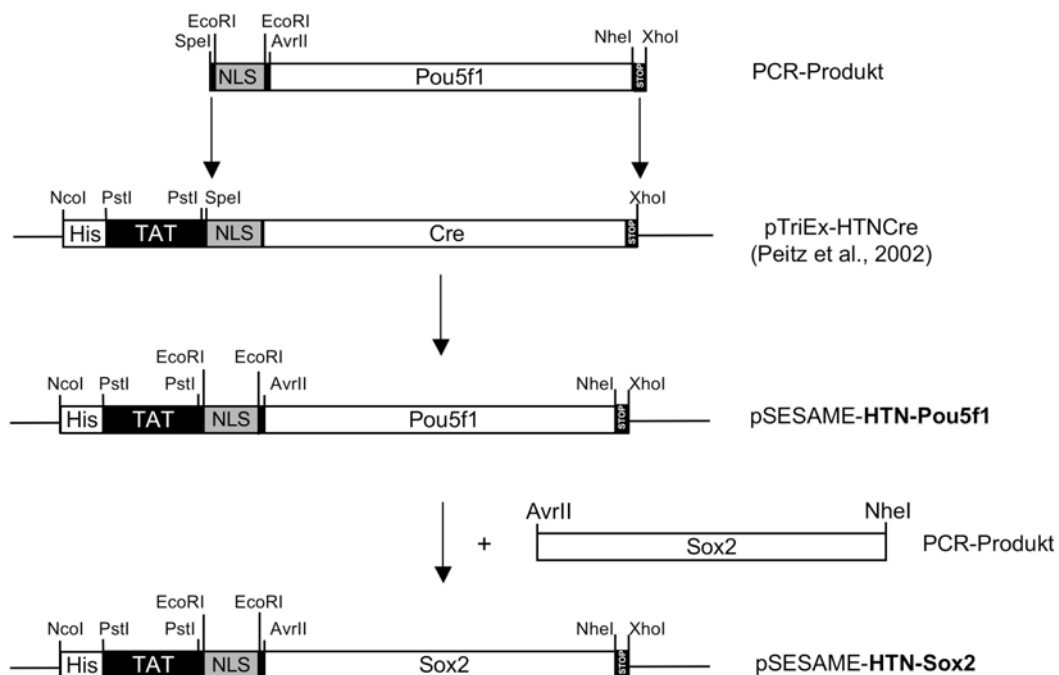


Abb 3.2. Klonierungsschema von pSESAME-N-Pou5f1 und pSESAME-N-Sox2

Die cDNA von *Pou5f1* wurde über PCR amplifiziert und mit den entsprechenden Schnittstellen und der NLS-Sequenz gekoppelt und danach über die Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *XhoI* mit dem Ausgangsvektor pTriEx-HTN-Cre ligiert. Ebenfalls über PCR wurde die cDNA von *Sox2* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *AvrII* und *NheI* mit pSESAME-HTN ligiert.

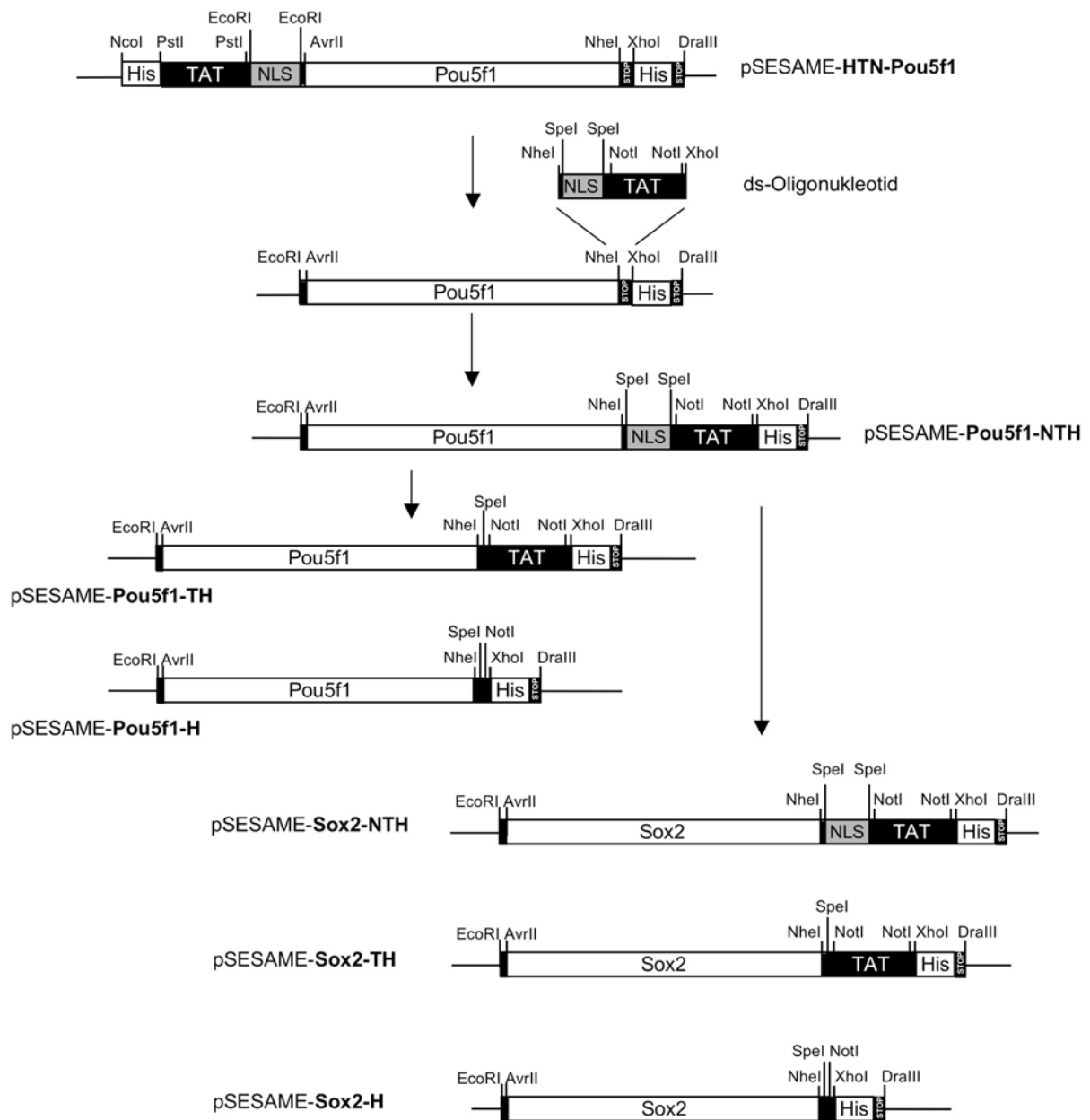


Abb.3.3. Klonierungsschema von pSESAME-C-Pou5f1 und pSESAME-C-Sox2

pSESAME-C wurde generiert, in dem die kodierenden Sequenzen der N-terminalen funktionalen Peptide zwischen den Schnittstellen *NcoI* und *EcoRI* über Restriktionshydrolyse entfernt und die Enden über eine Stumpfendligation wieder verbunden wurden. Die Sequenz der C-terminalen *NLS* und *TAT*-Domänen wurden über eine Oligonukleotid-Klonierung zwischen die Schnittstellen *NheI* und *XhoI* mit dem Vektor ligiert. Eine bereits im Vektor vorhandene Sequenz für einen C-terminalen *His-Tag* wurde durch das Entfernen des Stopcodons aktiviert, das sich in 5'-Orientierung davor befand. Auch hier wurde die Sequenz von *Sox2* über die Schnittstellen *AvrII* und *NheI* in pSESAME-C eingebracht. Die *NLS*- und *TAT*-losen Derivate von pSESAME-Pou5f1NTH und pSESAME-Sox2NTH wurden durch einzelne Restriktionshydrolyse-Schritte und darauf folgende Ligation generiert.

Tabb. 3.1. Übersicht der hergestellten Expressionskonstrukte

Insert	pSESAME-N	pSESAME-C
<i>Pou5f1</i>	pSESAME-NTH <i>Pou5f1</i>	pSESAME- <i>Pou5f1</i> NTH
<i>Pou5f1</i>	pSESAME-TH <i>Pou5f1</i>	pSESAME- <i>Pou5f1</i> TH
<i>Pou5f1</i>	pSESAME-HP <i>Pou5f1</i>	pSESAME- <i>Pou5f1</i> H
<i>Sox2</i>	pSESAME-NTH <i>Sox2</i>	pSESAME- <i>Sox2</i> NTH
<i>Sox2</i>	pSESAME-TH <i>Sox2</i>	pSESAME- <i>Sox2</i> TH
<i>Sox2</i>	pSESAME-H <i>Sox2</i>	pSESAME- <i>Sox2</i> H

3.2 Herstellung der Oct4 und Sox2 Fusionsproteine

3.2.1 Optimierung der Herstellung des TAT-Oct4 Fusionsproteins

Um das optimale Expressionskonstrukt für transduzierbares Oct4 zu ermitteln, sollte die Expression der verschiedenen Varianten des pSESAME-*Pou5f1*, sowie die Aufreinigung der entsprechenden Proteine, verglichen werden.

3.2.1.1 Expression und Aufreinigung der N-terminal fusionierten Version von Oct4

pSESAME-HTN-*Pou5f1* wurde rekombinant in *E.coli* Bakterien transformiert und die Expression des HTNOct4 Fusionsproteins über SDS-PAGE analysiert (Abb.3.4.A). Dabei zeigte sich, dass nur ein geringer Teil des exprimierten HTNOct4 löslich war, der größere Teil war unlöslich und befindet sich als Einschlusskörper (*Inclusion Bodies*) in der Pellet-Fraktion des Zelllysats (Abb. 3.4.A, Spuren Ü, P). Das Protein wurde aus dem Überstand des Zelllysats über Ni(II)-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Durch die schwache Löslichkeit des rekombinant exprimierten Proteins konnte nur eine geringe Ausbeute im Eluat erzielt werden (Abb. 3.4.A, Spur E). Das Protein hat ein errechnetes Molekulargewicht von ca. 43 kDa. Tatsächlich wird HTNOct4 von einem Anti-His Antikörper im Western Blot auf einer Höhe von ca. 48 kDa detektiert (Abb. 3.4.B). Um das rekombinante Oct4 unter Zellkulturbedingungen einsetzen zu können, wurde es gegen PBS dialysiert. Dabei präzipitierte HTNOct4 stark, so dass lösliches Protein im Überstand der Dialyse weder durch SDS-PAGE noch durch Western Blot detektiert werden konnte (Abb. 3.4. A und B, Spur DÜ).

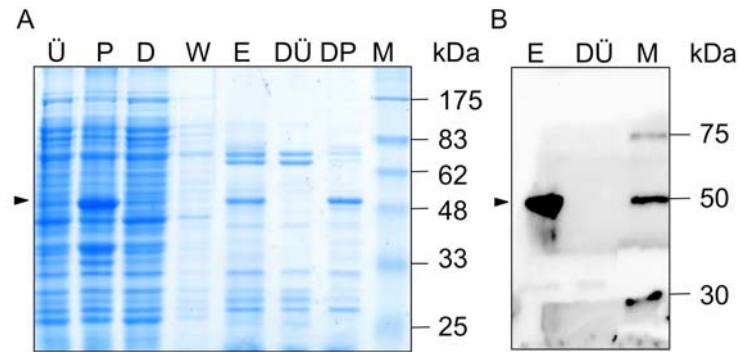


Abb. 3.4. Aufreinigung von HTNOct4 über Ni(II)-Affinitätschromatographie aus der löslichen Fraktion des Zellysats

A. HTNOct4 wurde rekombinant in *E. coli* Bakterien exprimiert und über Ni(II)-Affinitätschromatographie aus der löslichen Fraktion des Zellysats aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde über SDS-PAGE analysiert. Ü: Überstand des Zellysats, P: Pellet des Zellysats, D: Säulendurchfluss, W: Waschschrift mit 20 mM Imidazol, E: Eluat, DÜ: Überstand der Dialyse gegen PBS, DP: Pellet der Dialyse, M: Prestained Protein Marker. Pfeilspitzen zeigen die Laufhöhe von HTNOct4 an.

B. Die Western Blot Analyse des Eluats (E) und des Überstands der Dialyse (DÜ) von HTNOct4 zeigt, dass nach der Dialyse gegen PBS kein lösliches HTNOct4 im Dialysat vorhanden ist. Anti-His Antikörper, M: 6 x His Protein Marker.

Um zu untersuchen, ob das NLS einen destabilisierenden Einfluss auf das rekombinante Oct4 hat, wurde das extrinsische NLS durch eine Restriktionshydrolyse entfernt, dadurch entstand pSESAME-*HTPou5f1*. Da Oct4 auch ein endogenes NLS enthält (Pan et al., 2004), sollte die nukleäre Translokation weiterhin gewährleistet sein. Auch im Fall von HTOct4 lag der größere Teil des rekombinanten Proteins in Form von Einschlusskörpern im Pellet des Bakterienlysats vor. Die Aufreinigung des löslichen Teils aus dem Überstand des Zellysats über Ni(II)-Affinitätschromatographie führte im Vergleich zu HTNOct4 zu einer verbesserten Ausbeute im Eluat, wenn auch mit einer geringeren Reinheit (Vergleich Spur E in Abb. 3.4.A und 3.5.A). Nach der Dialyse gegen PBS war eine deutliche Bande auf der entsprechenden Höhe erkennbar (Abb.3.5.A, Spur DÜ). Um das Protein unter Zellkulturbedingungen einsetzen zu können, wurde es im Verhältnis 1:2 (v/v) mit ES-Medium verdünnt. Die Stabilität von HTOct4 in diesem Medium bei 37 °C wurde mittels Western Blot analysiert. Die Konzentration von HTOct4 hatte über 24 h unter diesen Bedingungen kaum abgenommen (Abb. 3.5.B). Beim Einsatz in der Zellkultur wurden Präzipitate beobachtet, welche von den Verunreinigungen im Dialysat herrühren könnten und einen negativen Effekt auf das Zellwachstum hatten (Abb. 3.5. A, Spur DÜ).

Eine wesentlich höhere Reinheit des HTOct4 konnte durch die Aufreinigung der denaturierten Fraktion erzielt werden (Abb. 3.5.C). Die Einschlusskörper wurden isoliert, rückgefaltet und das renaturierte HTOct4 durch Ni(II)-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Nach der Dialyse gegen PBS war kaum noch lösliches Protein vorhanden (Abb. 3.5.C, Spur DÜ).

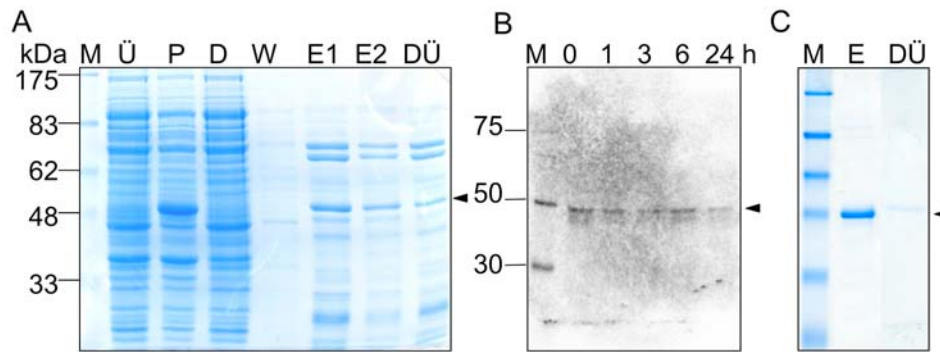


Abb. 3.5. Aufreinigung von HTOct4 über Ni(II)-Affinitätschromatographie aus der löslichen und unlöslichen Fraktion des Zelllysats

Die Expression von HTOct4 erfolgte in BL21 DE3 *E. coli* Bakterienzellen.

A. SDS-PAGE Analyse der nativen Aufreinigung von HTOct4. M: Prestained Protein Marker, Ü: Überstand des Zelllysats, P: Pellet des Zelllysats, D: Säulendurchfluss, W: Waschschrift mit 20 mM Imidazol, E: Eluat, DÜ: Überstand der Dialyse gegen PBS. Pfeilspitzen zeigen die Laufhöhe von HTOct4 an.

B. Western Blot Analyse zur Stabilität von HTOct4 unter Zellkulturbedingungen. Das Dialysat wurde 1:2 mit ES-Medium verdünnt und bei 37 °C inkubiert. Zu den angezeigten Zeitpunkten nach Beginn der Inkubation wurden Proben entnommen. Antikörper: Anti His-HRP. M: 6 x His Protein Marker.

C. SDS-PAGE Analyse der denaturierenden Aufreinigung von HTOct4. Die Einschlusskörper im Pellet des Zelllysats wurden mit einer Detergenz-haltigen Lösung mehrfach gewaschen und danach in 6 M Guanidinium Chlorid denaturiert und gelöst. Die Rückfaltung erfolgte durch die Inkubation mit einem Morpholinoethanolsulfat-haltigen Rückfaltungspuffer (Einzelheiten siehe Material & Methoden); danach erfolgte die Aufreinigung über Ni(II)-Chromatographie. M: Prestained Protein Marker, E: Eluat, DÜ: Überstand der Dialyse gegen PBS.

3.2.1.2 Expression und Aufreinigung der C-terminal fusionierten Version von Oct4

Da pSESAME-N-*Pou5f1* kein geeignetes Expressionskonstrukt darstellte, wegen zu geringer Stabilität bzw. Reinheit der resultierenden N-Terminal fusionierten Oct4-Varianten, sollte die entsprechende C-terminale Variante getestet werden. Dazu wurde pSESAME-C-*Pou5f1* hergestellt. Auf Grund der Ergebnisse der pSESAME-N-*Pou5f1* Expression und Aufreinigung wurde eine NLS-lose Variante hergestellt und aufgereinigt. Obwohl die Überexpression von Oct4TH nicht sehr stark war, ließ es sich mit relativ guter Ausbeute aus dem Überstand des Zelllysats über Ni(II)-Affinitätschromatographie anreichern (Abb. 3.6.A, Spur E). Die Reinheit des Eluats wurde durch die Anwendung eines Imidazol-Gradienten optimiert, wodurch Waschbedingungen ermittelt werden konnten, unter welchen die meisten Verunreinigungen beseitigt wurden, und gleichzeitig das Zielprotein an der Säule gebunden blieb (Abb. 3.6).

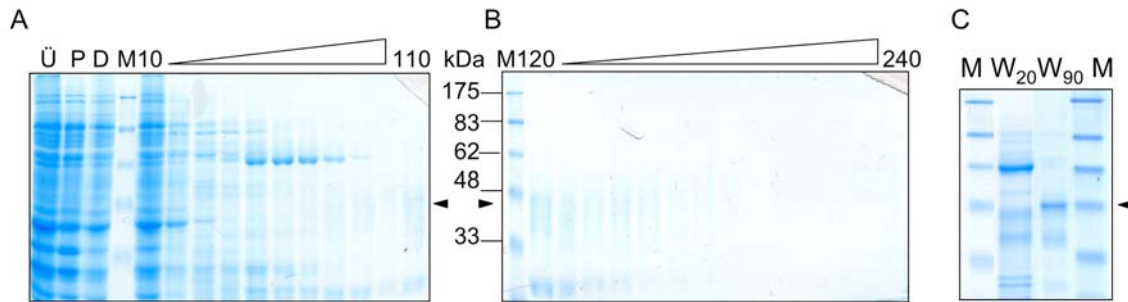


Abb. 3.6. SDS-PAGE Analyse zur Optimierung der Aufreinigung von Oct4TH

A, B. Oct4TH wurde in BL21 DE3 *E. coli* Bakterienzellen exprimiert und aus dem Überstand des Zellysats über Ni(II)-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Um die Konzentration von Imidazol im Waschpuffer zu optimieren, wurde der Waschschrift in mehreren Fraktionen durchgeführt, die einen aufsteigenden Imidazol-Gradienten zwischen 10 und 240 mM enthielten. Die Imidazol-Konzentration wurde in jeder Fraktion um 10 mM erhöht. Ü: Überstand des Zellysats, P: Pellet des Zellysats, D: Säulendurchfluss, 10-240: Imidazol-Konzentration in den Waschfraktionen. Pfeilspitzen zeigen die Laufhöhe von Oct4TH an.

C. Vergleich der Elutionsfraktionen vor und nach der Optimierung der Imidazol-Konzentration im Waschpuffer. Für den optimierten Waschschrift wurde eine Konzentration von 90 mM Imidazol gewählt, da bei dieser Konzentration die meisten Verunreinigungen eluiert wurden, aber der Großteil des Oct4TH an der Matrix gebunden blieb. M: Prestained Protein Marker. W₂₀: Eluat bei einer Imidazol-Konzentration von 20 mM im Waschpuffer, W₉₀: Eluat bei einer Imidazol-Konzentration von 90 mM im Waschpuffer.

Um die Lagerung des Eluats über einen längeren Zeitraum zu ermöglichen, wurde das Eluat gegen einen Glycerin-Puffer dialysiert. Dadurch konnte das Protein aufkonzentriert und bei -20 °C gelagert werden (Abb. 3.7). Die Konzentration von Oct4TH im Glycerin-Puffer betrug 2-3 µM.

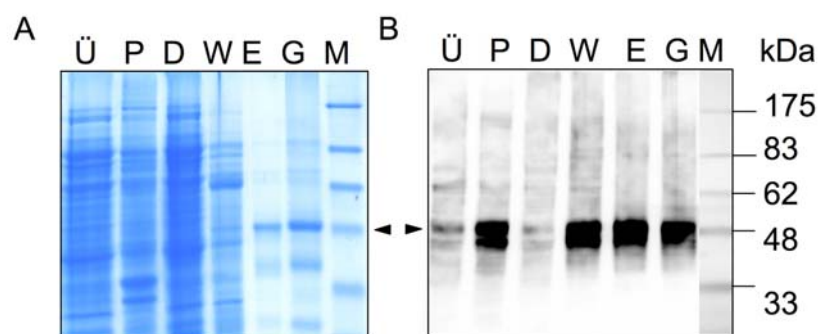


Abb. 3.7. Optimierte Aufreinigung von Oct4TH

A. SDS-PAGE Analyse der Aufreinigung über Ni(II)-Affinitätschromatographie nach Optimierung der Waschbedingungen und Aufkonzentration des Proteins im Glycerolstock (G). Ü: Überstand des Zellysats, P: Pellet des Zellysats, D: Säulendurchfluss, W: Waschschrift mit 90 mM Imidazol, E: Eluat, G: Glycerolstock. Pfeilspitzen zeigen die Laufhöhe von Oct4TH an.

B. Western Blot Analyse der Aufreinigung von Oct4TH. Anti-Oct4 Antikörper. M: Prestained Protein Marker.

3.2.2 Optimierung der Herstellung des TAT-Sox2 Fusionsproteins

In Analogie zu Oct4 sollte auch für Sox2 das optimale Expressionskonstrukt ermittelt werden.

3.2.2.1 Expression und Aufreinigung der N-terminal fusionierten Version von Sox2

pSESAME-HTN-Sox2 wurde in kompetenten *E. coli* Bakterien exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte über Ni(II)-Affinitätschromatographie aus dem löslichen Überstand des Zellysats. Der Großteil des exprimierten Proteins war in der unlöslichen Fraktion zu finden (Abb.3.8, Spur Ü und P). Das Zielprotein wird von einem Anti-His Antikörper auf einer Höhe von ca. 40 kDa erkannt, was dem kalkulierten Molekulargewicht entspricht (Abb. 3.8.B). Die Elutionsfraktion wies im Western Blot zusätzliche Banden auf, die kleiner als 40 kDa waren. Diese Banden deuten auf translationale Abbrüche oder proteolytische Abbauprodukte hin. Der Einsatz von Protease Inhibitor Kombinationen sowie die Über-Nacht-Kultur bei 30 °C konnten die Bildung dieser Kontaminationen nicht verhindern. Da diese unvollständigen Expressionsprodukte von HTNSox2 von einem Anti-His Antikörper erkannt werden, sind die N-terminal fusionierten Peptide offensichtlich erhalten und somit auch die TAT-Sequenz. Die Transduktion dieser unvollständigen Moleküle könnte somit zur kompetitiven Inhibition des vollständig translatierten HTNSox2 führen.

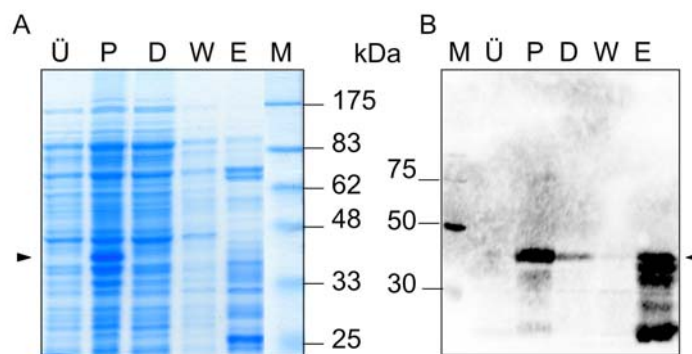


Abb. 3.8. Aufreinigung von HTNSox2 über Ni(II)-Affinitätschromatographie

Die Expression erfolgte in kompetenten BL2 DE3 *E. coli* Bakterien. Aufgereinigt wurde die lösliche Fraktion aus dem Überstand des Zellysats.

A. SDS-PAGE Analyse der Aufreinigung. Ü: Überstand des Zellysats, P: Pellet des Zellysats, D: Säulendurchfluss, W: Waschschrift 20 mM Imidazol, E: Eluat, M: Prestained Protein Marker. Pfeilspitzen zeigen die Laufhöhe von HTNSox2 an.

B. Western Blot Analyse der Aufreinigung. Im Eluat werden kleinere Banden von dem Antikörper erkannt, welche auf translationale Abbrüche oder proteolytische Abbauprodukte schließen lassen. Antikörper: Anti-His, M: 6 x His Protein Marker.

3.2.2.2 Expression und Aufreinigung der C-terminal fusionierten Version von Sox2

Um die Aufreinigung der translationalen Abbrüche zu verhindern, sollte der C-terminale His-Tag eingesetzt werden, so dass ausschließlich vollständige Expressionsprodukte von Sox2NTH aufgereinigt werden.

Sox2NTH wurde ebenfalls in *E. coli* Bakterienzellen exprimiert und über Ni(II)-Affinitätschromatographie aus der löslichen Fraktion des Bakterienlysats aufgereinigt. Obwohl auch in diesem Fall der größere Anteil des exprimierten Proteins unlöslich war, konnte Sox2NTH mit einer Ausbeute von ca. 0,2 mg/Liter Expressionskultur aus der löslichen Fraktion aufgereinigt werden (Abb. 3.9.). Die Reinheit konnte durch einen Imidazol-Gradienten erheblich verbessert werden (Abb. 3.9.C).

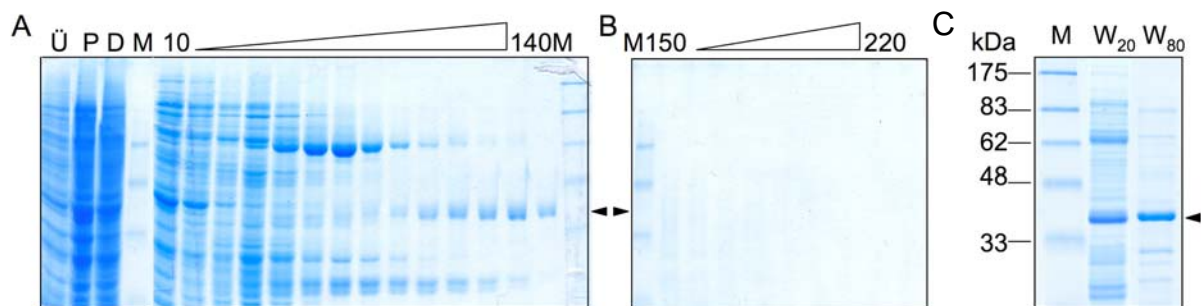


Abb. 3.9. SDS-PAGE-Analyse der Optimierung der Aufreinigung von Sox2NTH

A, B. Sox2NTH wurde in *E. coli* Bakterien exprimiert und über Ni(II)-Affinitätschromatographie aus dem Überstand des Zellysats aufgereinigt. Der Waschschrift wurde in mehreren Fraktionen mit aufsteigenden Imidazol-Konzentrationen zwischen 10 und 220 mM durchgeführt, um die optimalen Waschbedingungen zu ermitteln. Bei einer Konzentration von 80 mM Imidazol konnten die meisten Verunreinigungen eluiert werden und Sox2NTH blieb weiterhin an der Säule gebunden. Ü: Überstand des Zellysats, P: Pellet, D: Säulendurchfluss, M: Prestained Protein Marker. Pfeilspitzen zeigen die Laufhöhe von HTNSox2 an.

C. Vergleich zwischen den Eluaten von Sox2NTH vor und nach der Optimierung der Waschkonditionen. M: Prestained Protein Marker, W₂₀: Eluat bei einem Waschschrift mit 20 mM Imidazol, W₈₀: Eluat bei einem Waschschrift von 80 mM Imidazol.

Der Unterschied zwischen den Elutionsfraktionen von Sox2NTH und HTNSox2 war erheblich. Im Western Blot wurde deutlich, dass die bei HTNSox2-Eluat vorhandenen unvollständigen Fragmente des Proteins in dem Eluat der C-terminal fusionierten Version von Sox2 nicht mehr vorhanden waren, sondern ausschließlich eine Bande bei der erwarteten Laufhöhe von 40 kDa nachweisbar war (Abb. 3.10).

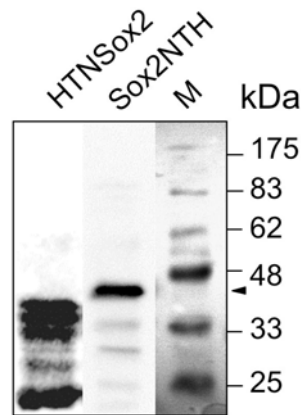


Abb. 3.10. Vergleich der Elutionsfraktionen von HTNSox2 und Sox2NTH

Im Gegensatz zu HTNSox2 sind bei Sox2NTH keine Proteinfragmente vorhanden. Antikörper: Anti-His. M: Prestained Protein Marker. Pfeilspitze zeigt die Laufhöhe von Sox2NTH an.

In Abb. 3.11 ist die Aufreinigung von Sox2NTH dokumentiert. Für Sox2NTH konnte ebenfalls ein Glycerolstock hergestellt und bei -20 °C gelagert werden. Die Konzentration von Sox2NTH im Stock betrug 3-6 µM.

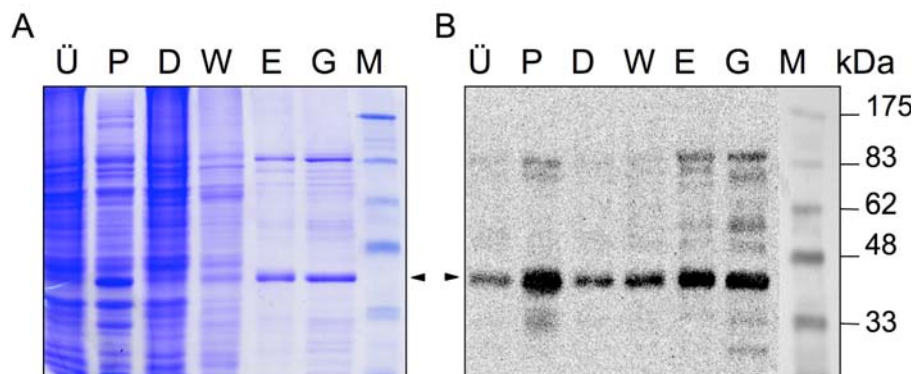


Abb. 3.11. Aufreinigung von Sox2NTH

A. SDS-PAGE Analyse der optimierten Aufreinigung von Sox2NTH. Das Protein konnte in einem Glycerolstock aufkonzentriert werden. Ü: Überstand des Zelllysats, P: Pellet des Zelllysats, D: Säulendurchfluss, W: Waschschrift, E: Eluat, G: Glycerolstock, M: Prestained Protein Marker. Pfeilspitzen zeigen die Laufhöhe von Sox2NTH an.

B. Western Blot Analyse der Aufreinigung von Sox2NTH. Antikörper: Anti-Sox2, M: Prestained Protein Marker.

3.2.3 Optimierung der Medienbedingungen für die Zellkulturapplikation von rekombinatem Oct4 und Sox2

Der hergestellte Glycerolstock von Oct4TH und Sox2NTH konnte bis zu einer Verdünnung von 1:20 mit ES Medium verdünnt werden. Diese Konzentration des Glycerol und den anderen Komponenten des Puffers wurden von ES-Zellen toleriert. Ein höherer Pufferanteil führte zu verminderter Koloniebildung. Allerdings inhibiert der hohe FKS-Gehalt (15% im ES-Medium) die Transduktion der Proteine (Peitz, 2007). Daher wurde der FKS-Gehalt des Transduktionsmediums auf 5 % gesenkt. Um dies zu kompensieren, wurde *Advanced* DMEM Medium eingesetzt, welches durch den Zusatz von einigen Serumbestandteilen die Haltung von Zellen unter niedrigen Serumbedingungen ermöglicht. Auch unter diesen Bedingungen nahm die Konzentration von Oct4TH und Sox2NTH unter Zellkulturbedingungen stark ab, da Serum auch einen stabilisierenden Effekt auf das rekombinante Protein hat. Es stellte sich heraus, dass der Zusatz von Albumax eine stabilisierende Wirkung auf die Proteine hat (Abb. 3.12). Die Zugabe von 0,5 % Albumax war ausreichend, um Oct4TH und Sox2NTH deutlich zu stabilisieren. Die Konzentration von Oct4TH im Zellkulturmedium betrug ca. 100 nM und von Sox2NTH ca. 150 nM.

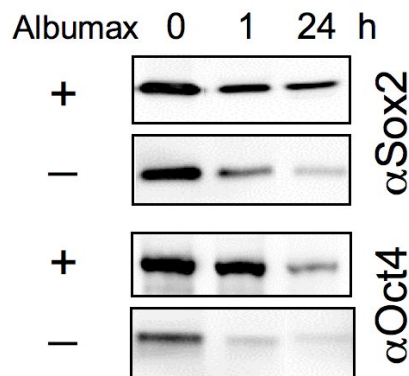


Abb. 3.12. Stabilisierung der rekombinanten Proteine durch Albumax

Der Glycerolstock von Oct4TH und Sox2NTH wurde jeweils 1:20 mit ES-Medium (5 % FKS) verdünnt. Zur Untersuchung des Einflusses von Albumax auf die Stabilität der Proteine unter Zellkulturbedingungen wurde ein Teil der Proben mit 0,5 % Albumax supplementiert. Die Proben wurden für 24 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert und zu den angezeigten Zeitpunkten Proben entnommen. Die Western Blot Analyse der Proben zeigt, dass 0,5 % Albumax ausreichend ist, um Oct4TH und Sox2NTH bei 37 °C über einen Zeitraum von 24 h zu stabilisieren.

3.2.4 Übersicht zur Proteinherstellung von TAT-Oct4 und TAT-Sox2

Bei einem Vergleich der Expressions- und Aufreinigungsmuster der hergestellten Versionen von rekombinantem Oct4 und Sox2 wird der Einfluss der Anwesenheit und Anordnung der fusionierten funktionalen Peptide deutlich. Bei Oct4 führte das Entfernen des exogenen NLS zu einer verbesserten Ausbeute. Die C-terminale Fusion mit funktionalen Peptiden war notwendig, um die Kontamination mit unvollständigen Sox2-Versionen zu umgehen. Im Fall beider Faktoren, Oct4 und Sox2, erwiesen sich die C-terminal fusionierten funktionalen Peptide im Gegensatz zu den N-terminalen als geeigneter für eine höhere die Ausbeute im Eluat.

Die Ergebnisse zur Optimierung der Aufreinigung und der Löslichkeit unter Zellkulturbedingungen sind in den Tabellen 3.2 und 3.3 zusammengefasst.

Tab. 3.2. Zusammenfassung der biochemischen Eigenschaften der verschiedenen Oct4 Konstrukte

Konstrukt	Induktion	Löslichkeit im Zellysat	Löslichkeit im Eluat	Reinheit des Eluats	Löslichkeit unter Zellkultur Bedingungen
HTNOct4	+	+	+	++	-
HTOct4	++	++	++	+	+
Oct4TH	+	+	++	++	++

(-) nicht messbar, (+) niedrig, (++) mittel, (+++) hoch, in grau unterlegt ist das Konstrukt, welches für die Durchführung der folgenden Versuche verwendet wurde.

Tab. 3.3. Zusammenfassung der biochemischen Eigenschaften der verschiedenen Sox2 Konstrukte

Konstrukt	Induktion	Löslichkeit im Zellysat	Löslichkeit im Eluat	Reinheit des Eluats	Löslichkeit unter Zellkultur-Bedingungen
HTNSox2	++	+	Abbrüche	+	n.b.
Sox2NTH	++	++	+++	+++	+++

(+) niedrig, (++) mittel, (+++) hoch, (n.b.) nicht bestimmt, in grau unterlegt ist das Konstrukt, welches für die Durchführung der folgenden Versuche verwendet wurde.

3.3 Oct4 und Sox2 TAT-Fusionsproteine binden spezifisch an DNA-Konsensussequenzen

Um die Fähigkeit der transduzierbaren Proteine, spezifisch an DNA zu binden zu untersuchen, wurde ein *Electrophoresis Mobility Shift Assay* (EMSA) durchgeführt. Für die Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit von Oct4TH und Sox2NTH wurde eine Octamer-Sox Konsensussequenz aus dem Nanog-Promotor gewählt, die als Bindesequenz von Oct4 und Sox2 identifiziert wurde (Kuroda et al., 2005; Rodda et al., 2005).

Der EMSA zeigt, dass jedes der beiden Fusionsproteine, Oct4TH und Sox2NTH, einzeln an die Zielsequenz bindet (Abb. 3.13, Spuren 2, 6). Die Spezifität der Bindung von Oct4TH an die DNA-Probe konnte durch kompetitive Inhibition der Bindung mit einem 500-fachen Überschuss an nicht-biotinylierter Probe nachgewiesen werden (Abb. 3.13, Spur 3). Die Identifizierung der Protein-DNA-Komplexe erfolgte durch die Zugabe der jeweiligen spezifischen Antikörper. Wenn der Antikörper an das Protein bindet, wird die Mobilität des Komplexes verringert und es kommt zu einem so genannten *Supershift*. Die Zugabe eines spezifischen Oct4- bzw. Sox2-Antikörpers zu den jeweiligen Ansätzen, resultierte in beiden Fällen in einem *Supershift* (Abb. 3.13, Spuren 4, 7). Wurde jedoch der Sox2-Antikörper mit dem Oct4TH-DNA-Komplex inkubiert, erfolgte kein *Supershift* (Abb. 3.13, Spur 5). Oct4 und Sox2 sollten auch in der Lage sein, gemeinsam an die Konsensussequenzen zu binden, da die Nanog-Expression durch die gemeinsame Bindung der beiden Faktoren an die Konsensussequenz im *Nanog*-Promotor aktiviert wird. Bei der Inkubation von Oct4TH und Sox2NTH mit der biotinylierten DNA-Sequenz konnte ein ternärer Komplex identifiziert werden (Abb. 3.13, Spur 8), die dominante Bande war jedoch weiterhin der Oct4TH-DNA-Komplex. Der ternäre Komplex konnte durch einen Oct4 Antikörper identifiziert werden (Abb. 3.13, Spur 9), jedoch nicht durch einen Sox2 Antikörper (Abb. 3.13, Spur 10).

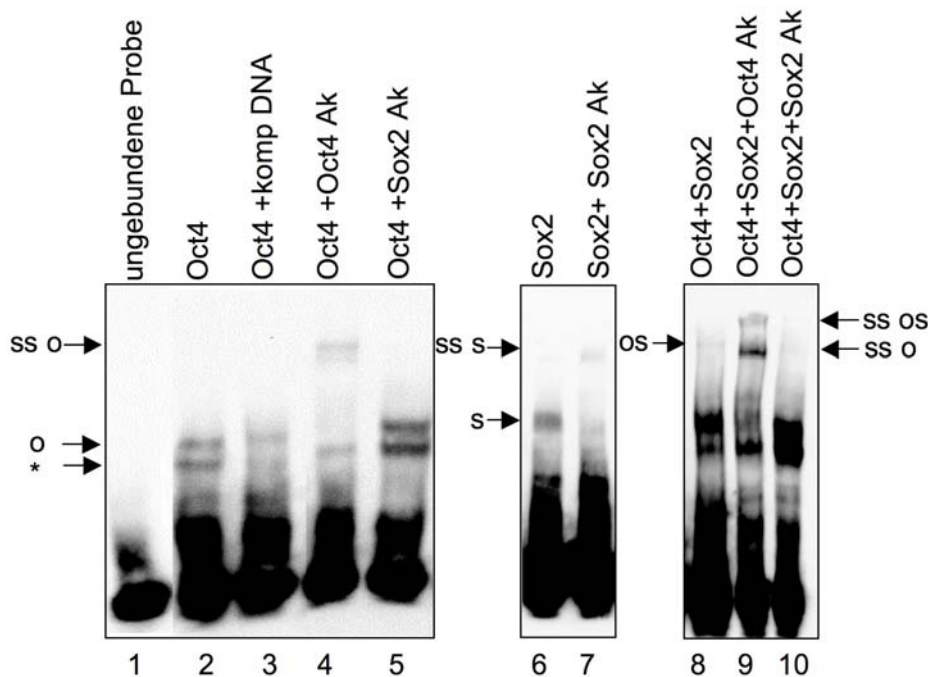


Abb. 3.13. Der EMSA zeigt eine Bindung der Oct4 und Sox2 TAT-Fusionsproteinen an DNA-Konsensussequenzen *in vitro*

Die Proteine wurden im Glycerolstock mit der biotinylierten Probe inkubiert und danach über eine native PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Nach der Detektion der biotinylierten Proben zeigt der EMSA die Bindung des rekombinanten Oct4 („o“ markiert den Oct4-DNA-Komplex) und Sox2 (s) an die Zielsequenz aus dem Nanog-Promotor (Spuren 2 und 6). Ein 500-facher Überschuss an nicht-biotinylierter DNA-Probe inhibierte die Oct4-Bindung an die biotinylierte Probe kompetitiv (Spur 3). Die Zugabe des jeweiligen spezifischen Antikörpers (Ak) zu den Protein-DNA-Komplexen führte zu einem *Supershift* (ss) (Spuren 4 und 7). Die Zugabe des Sox2-Ak zu dem Oct4-DNA-Komplex bewirkte hingegen keinen *Supershift* (Spur 5). Bei der Inkubation von Oct4, Sox2 und der DNA-Probe wurde ein ternärer Komplex gebildet (os) (Spur 8), der durch den Oct4-Ak erkannt wurde (Spur 9), aber nicht durch den Sox2-Ak (Spur 10). (*) markiert eine unspezifische Bande. Die Proteinkonzentrationen betragen 85 nM Oct4TH und 100 nM Sox2NTH.

3.4 Membranpermeabilität der transduzierbaren Proteine

Um die Aufnahme des TAT-fusionierten Oct4 und Sox2 in die Zelle zu visualisieren, wurden die Proteine mit Rhodamin markiert (R-Oct4TH und R-Sox2NTH). Der Fluoreszenz-Farbstoff bindet an die primären Aminogruppen der Proteine. Als Kontrolle wurde eine äquivalente Menge BSA unter den gleichen Bedingungen wie Oct4TH und Sox2NTH markiert. Um den Einfluss der TAT-Sequenz auf die Proteintransduktion zu untersuchen, wurden ebenfalls die TAT-losen Varianten von Oct4 und Sox2 hergestellt und mit Rhodamin markiert.

Als Zielzellen für die markierten Proteine wurden CV-1 Zellen benutzt. Diese Fibroblasten zeichnen sich durch ein großes Zytoplasma relativ zum Zellkern aus, was sich für die Visualisierungsversuche als geeignet erwies.

Die Zellkerne der CV-1 Zellen wurden vor der Proteinbehandlung mit Hoechst angefärbt. Danach wurden die Zellen 30 min mit den markierten Proteinen inkubiert. Nach dem Medienwechsel wurden die Zellen drei Mal mit Heparin behandelt, um nicht-internalisiertes Protein von der Zelloberfläche zu entfernen.

Die Zellen wurden 1, 3 und 18 Stunden nach Beginn der Proteinbehandlung mikroskopisch untersucht. Da die Fixierung der Zellen zu einer artifiziellen Verteilung der Proteine führen kann (Richard et al., 2003; Lundberg et al., 2001), wurde die Fluoreszenzmikroskopie an nicht-fixierten lebenden Zellen durchgeführt.

Die BSA-Kontrolle zeigte zu keinem der Untersuchungszeitpunkte internalisiertes Protein (Abb. 3.14).

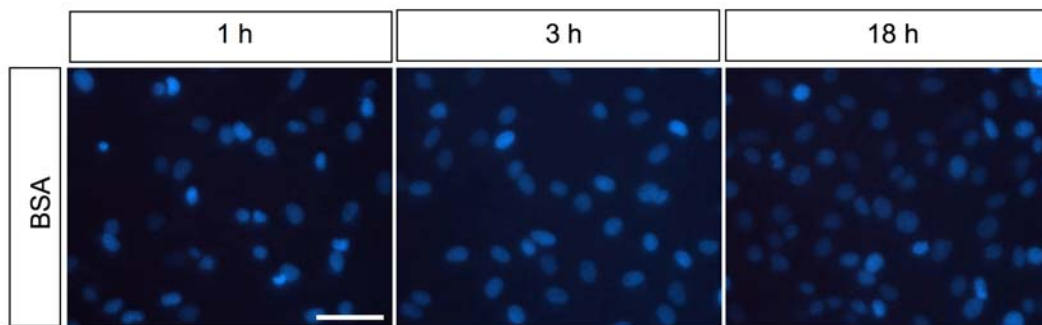


Abb. 3.14. CV-1 Zellen, behandelt mit Rhodamin markiertem BSA, zeigen kein internalisiertes Protein

Die Zellen wurden 30 min mit Rhodamin markiertem BSA behandelt, danach wurden die Zellen drei Mal mit Heparin gewaschen und zu den angezeigten Zeitpunkten untersucht. Die Abbildung zeigt eine Überlagerung zwischen DAPI- und Rhodaminkanal. Proteinkonzentration = 0,3 mg/ml, Maßstab = 25 μ m.

3.4.1 Untersuchung der zellulären Aufnahme von Oct4

Das markierte Oct4TH wurde hingegen von 97 ± 1 % der Zellen aufgenommen (Abb. 3.15.A). Eine Stunde nach Beginn der Transduktion wiesen die behandelten Zellen ein punktförmiges, charakteristisches endosomales Muster der Proteinaufnahme auf. Im Verlauf der Zeit migrierten diese vesikulären Strukturen in Richtung Zellkern und akkumulierten an einer Seite des Zellkerns (Abb. 3.15.B, C).

Das markierte TAT-lose Oct4 scheint ebenfalls von den Zellen aufgenommen zu werden, aber in schwächerem Maße trotz höherer Proteinkonzentration. Bei genauerem Vergleich der Aufnahmemuster wird deutlich, dass Oct4H zwar von ähnlich vielen Zellen aufgenommen wird, aber wesentlich weniger endosomale Strukturen pro Zelle vorhanden sind (Abb. 3.15.B).

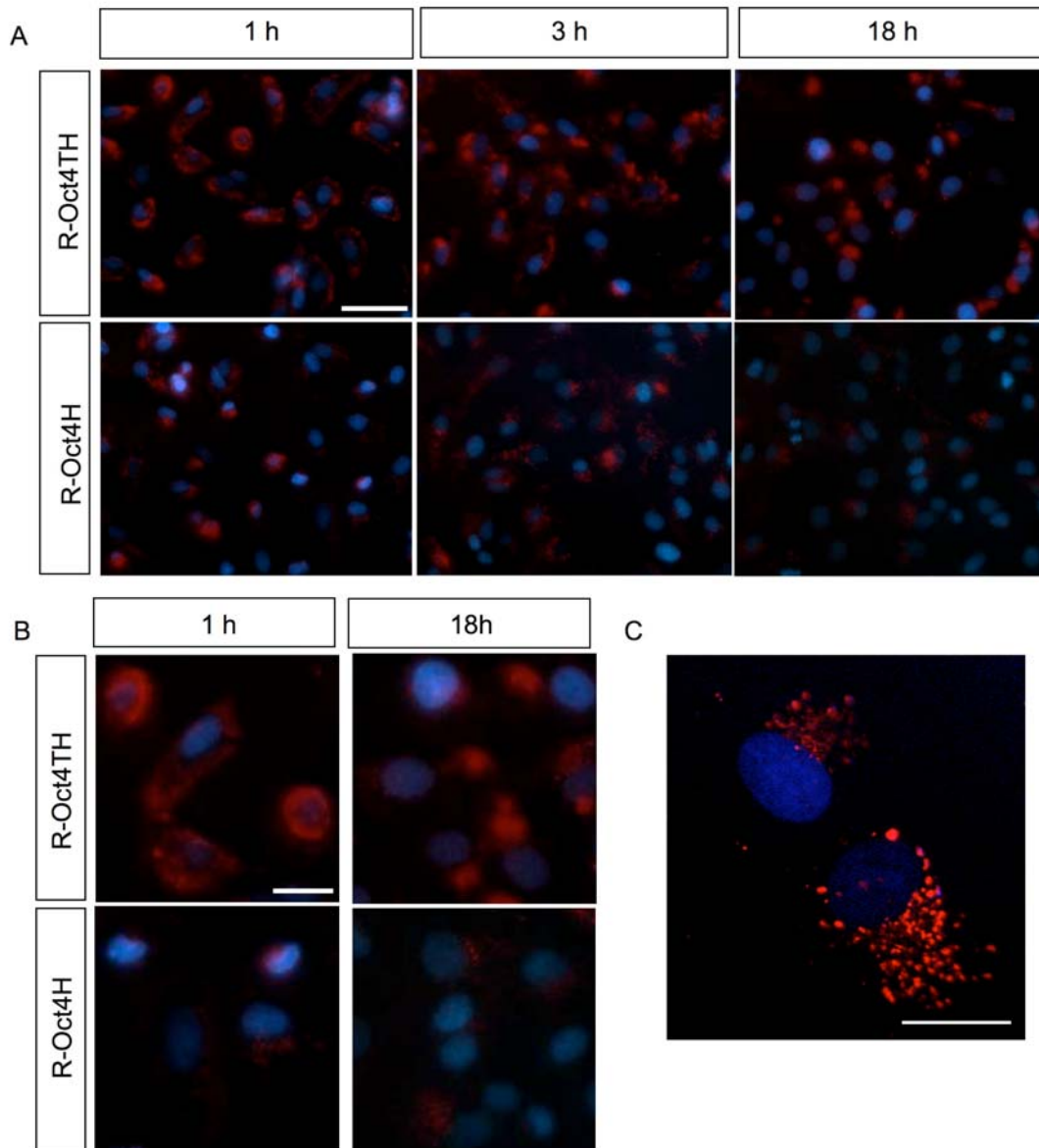


Abb. 3.15. TAT-Oct4 zeigt eine verstärkte Zellpermeabilität im Vergleich zu der TAT-losen Variante

A. Die obere Bildreihe zeigt die Behandlung von CV-1 Zellen mit Rhodamin-markiertem Oct4 (R-Oct4TH) zu den angegebenen Zeitpunkten nach Beginn der Transduktion. Die Gesamtproteinkonzentration betrug 0,23 mg/ml (1,1 μ M Oct4TH). Die untere Bildreihe zeigt die Behandlung mit R-Oct4H. Die Gesamtproteinkonzentration betrug 0,39 mg/ml (2,3 μ M Oct4H). Die Abbildung zeigt eine Überlagerung des DAPI- und Rhodaminkanals. Maßstab: 25 μ m.

B. Vergrößerte Ausschnitte aus (A) von R-Oct4TH und R-Oct4H behandelten CV-1 Zellen, 1 und 18 h nach Beginn der Transduktion. Maßstab: 10 μ m.

C. Vergrößerung der R-Oct4TH behandelten CV-1 Zellen 24h nach Beginn der Transduktion. Maßstab: 5 μ m.

3.4.2 Untersuchung der zellulären Aufnahme von Sox2

Das markierte R-Sox2NTH wurde von 85 ± 5 % der Zellen aufgenommen. Es zeigte ebenfalls ein endosomales Muster, wenn auch nicht so deutlich wie bei R-Oct4TH (Abb. 3. 16.A). Nach 18 h reicherte sich das markierte Protein ebenfalls an einem Punkt in Zellkernnähe an.

Bei der Applikation von R-Sox2H zeigten nur wenige Zellen ein regelmäßiges punktförmiges Muster, der Großteil des Proteins erschien in größeren unregelmäßigen Strukturen, bei denen es sich um Aggregate handeln könnte, die trotz der Heparinbehandlung an der Zelloberfläche haften. Nach 18 h waren bei Sox2H ebenfalls größere Strukturen vorhanden, die sich deutlich von denen der anderen untersuchten Proteinen unterscheiden (Vergleich Abb. 3.15.B und 3.16.B).

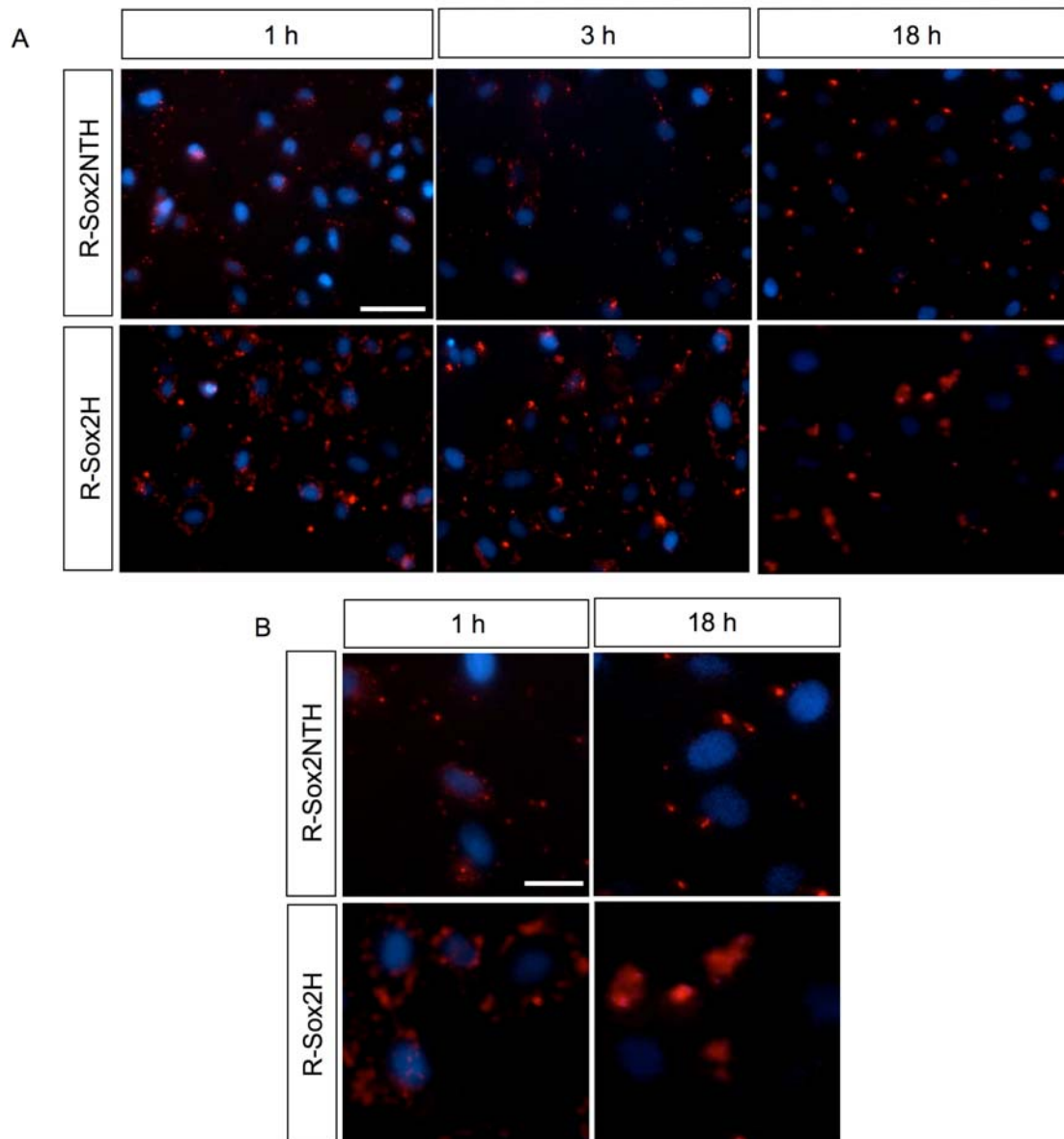


Abb. 3.16. Unterschiedliche Aufnahmemuster von Sox2 in die Zelle bei An. Bzw. Abwesenheit von TAT

A. CV-1 Zellen mit Rodamin-markiertem Sox2NTH (R-Sox2NTH) und R-Sox2H zu den angegebenen Zeitpunkten nach Beginn der Transduktion. Die Proteinkonzentration betrug bei Sox2NTH 0,47 mg/ml (3,4 μ M Sox2NTH) und bei Sox2H 0,49 mg/ml (3,4 μ M Sox2H). Die Abbildung zeigt eine Überlagerung des DAPI- und Rhodaminkanals. Maßstab: 25 μ m.

B. Vergrößerte Ausschnitte aus (A) von R-Sox2NTH und R-Sox2H behandelten CV-1 Zellen, 1 und 18 h nach Beginn der Transduktion. Maßstab: 10 μ m.

3.4.3 Untersuchung der nukleären Translokation von Oct4TH und Sox2NTH

Die Freisetzung der Proteine aus den Vesikeln ist ein seltenes Ereignis und wird als Limitierung der Proteintransduktion angesehen (Caron et al., 2004; Wadia et al., 2004) (siehe Einleitung). Um zu untersuchen, ob neben der perinukleären Akkumulation auch eine Kernlokalisierung bei der Applikation von Oct4TH und Sox2NTH auftritt, wurden mit Hilfe der Apotom-Technologie optische Schnitte durch die Zelle gelegt. Dadurch gelang es, die markierten Proteine auch im Zellkern zu visualisieren (Abb. 3.17).

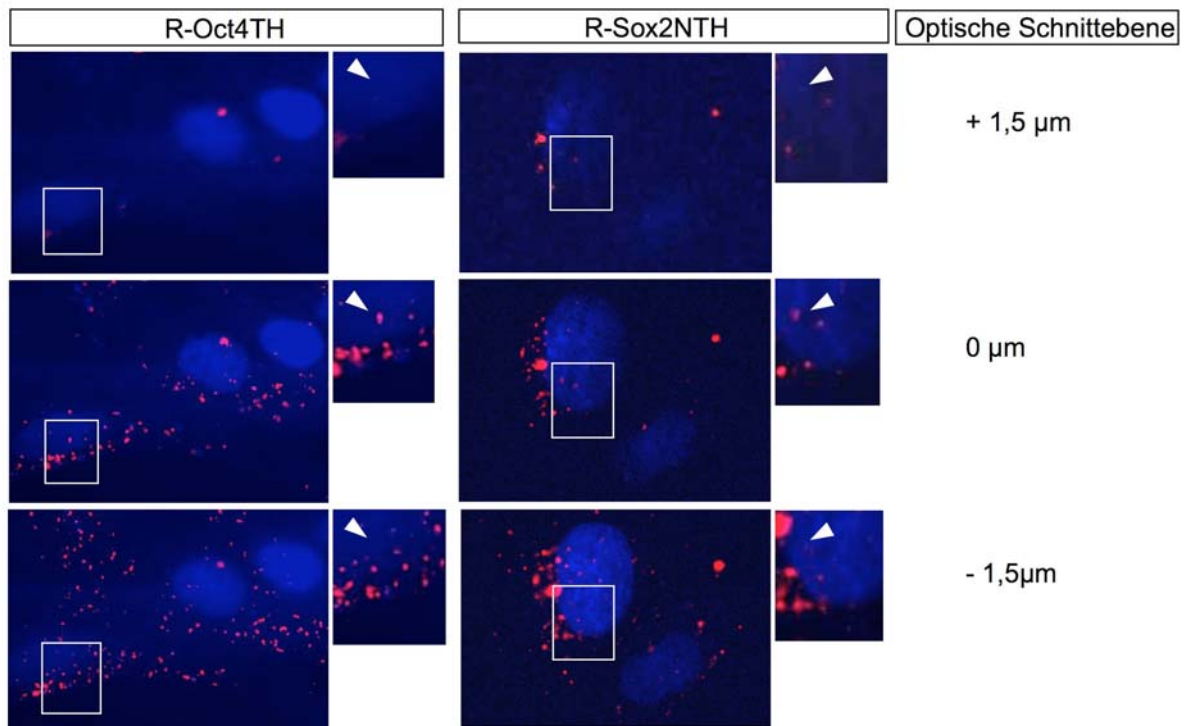


Abb. 3.17. Visualisierung der TAT-Fusionsproteine im Zellkern

Ohne Fixierung wurden die Zellen 24 h nach Beginn der Transduktion mit Moviol und einem Deckglas bedeckt. Optische Schnitte wurden mit dem Apotome durch den Zellkern gelegt. Dadurch konnten die markierten Proteine in einer Ebene des Zellkerns visualisiert werden (siehe mittlere Abbildung). Die Abbildungen sind eine Überlagerung des DAPI- und Rhodaminkanals, optische Schnittdicke: 1,5 µm.

3.5 Untersuchung der intrazellulären Aktivität von Oct4TH und Sox2NTH in murinen ES-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Oct4TH und Sox2NTH spezifisch an DNA-Zielsequenzen binden können und Zellmembran-permeabel sind, sollte die intrazelluläre Aktivität dieser rekombinanten Faktoren in ES-Zellen, sowie in differenzierten Zellen untersucht werden.

3.5.1 Oct4TH und Sox2NTH erhöhen den Anteil undifferenzierter Kolonien

Murine ES-Zellen (mES) können in Anwesenheit des *Leukimia Inhibitory Factors* (LIF) in undifferenziertem Zustand unbegrenzt kultiviert werden. Undifferenzierte mES-Zellen wachsen in Form von dreidimensionalen Kolonien, die sich durch glatte Ränder auszeichnen. Sie können entweder auf einer Schicht von Fütterzellen gehalten werden oder auf Gelatine beschichteten Platten. Im Falle der Kultivierung auf Gelatine neigen die Kolonien zu spontaner Differenzierung, die sich in verschiedenen Graden äußert, von unregelmäßigen Kolonierändern bis hin zur Auflösung der dreidimensionalen Koloniestruktur und Vereinzelung der Zellen.

Da Oct4 und Sox2 eine wichtige Rolle in der Pluripotenzerhaltung von mES-Zellen spielen, sollte im folgenden Versuch untersucht werden, welchen Einfluss die Transduktion dieser Faktoren auf das Wachstum von ES-Zellen hat. Dazu wurden ES-Zellen in niedriger Dichte auf Gelatine-beschichteten Platten ausgesät. Die Zellen wurden 5 Tage lang mit jeweils einem der beiden transduzierbaren Faktoren behandelt, sowie mit einer Kombination beider Faktoren. Um zusätzlich zur Morphologie einen Indikator für den Differenzierungsgrad der Zellen zu haben, wurden die Zellen nach der Inkubation fixiert und auf Alkalische-Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) untersucht, welche charakteristisch für undifferenzierte ES-Zellen ist. Oct4TH und Sox2NTH behandelte Zellen wiesen wesentlich weniger Differenzierung auf als die unbehandelten Zellen. Dies äußerte sich in einer kompakteren Struktur mit glatten Rändern im Vergleich zu ungleichmäßigen Kolonien in der Kontrolle. Außerdem war durch die blaue Farbe erkennbar, dass die Zellen eine höhere AP-Aktivität aufweisen (Abb. 3. 18).

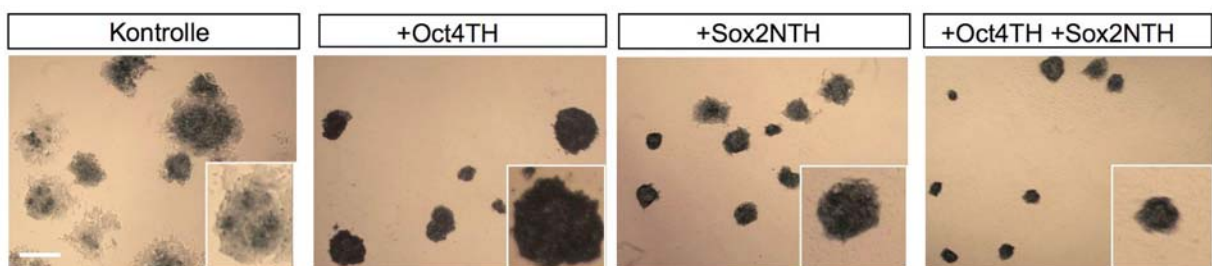


Abb. 3.18. Behandlung muriner ES-Zellen mit transduzierbaren Oct4- und Sox2-Proteine führt zu mehr undifferenzierten Kolonien

Oct4 GIP ES-Zellen wurden in niedriger Dichte (500 Zellen/24-Well Vertiefung) auf Gelatine ausgesät. Die Zellen wurden 5 Tage mit Oct4TH und Sox2NTH oder einer Kombination von beiden Faktoren behandelt. Danach wurden die Zellen fixiert und auf AP-Aktivität gefärbt, Maßstab: 50 μ m.

Um diesen Effekt besser zu charakterisieren und zu quantifizieren, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an transduzierbaren Proteinen behandelt. Nach 5 Tagen wurden die Zellen fixiert und die AP-Aktivität untersucht. Die Anteile der differenzierten und undifferenzierten Kolonien wurden ausgezählt. Dafür wurden die Kolonien in drei Kategorien unterteilt: Differenzierungsgrad I) beinhaltet undifferenzierte Kolonien, die sich durch kompakte dreidimensionale Morphologie, glatte Ränder und starke gleichmäßige AP-Färbung auszeichnen, Differenzierungsgrad II) flache Kolonien mit unregelmäßigen Rändern und ungleichmäßiger AP-Färbung, die als gemischte Kolonien bezeichnet werden können und Differenzierungsgrad III) bezeichnet differenzierte Kolonien, bei denen sich der Kolonieverbund weitestgehend aufgelöst hat und kaum bis keine AP-Färbung vorhanden ist (Abb.3.19).

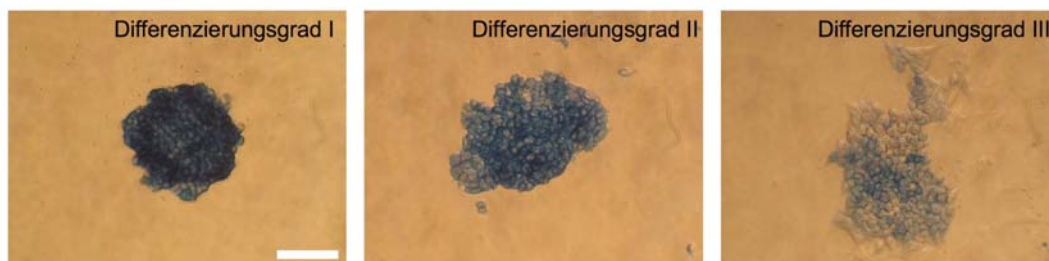


Abb. 3.19. Klassifizierung der AP-gefärbten ES-Kolonien nach Differenzierungsgrad

Oct4 GIP ES-Zellen wurden in niedriger Dichte (500 Zellen/24-Well Vertiefung) auf Gelatine ausgesät. Nach 5 Tagen in Kultur wurden die Zellen fixiert und auf AP-Aktivität gefärbt. In der Abbildung sind Beispiele für die verschiedenen Differenzierungsgrade gezeigt:

Undifferenzierte Kolonien zeigen eine kompakte Form mit starker AP-Färbung (Differenzierungsgrad I), gemischte Kolonien haben unregelmäßige Konturen und ungleichmäßige AP-Färbung (Differenzierungsgrad II), bei differenzierten Kolonien löst sich der Kolonieverbund auf und es ist kaum bis keine AP-Färbung vorhanden (Differenzierungsgrad III). Maßstab: 50 µm

Von jedem Protein wurden vier unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt. Durch den relativ hohen Salz- und Glycerinegehalt des Puffers, in dem die Proteine gelöst sind (1 M NaCl und 50% Glycerin), ist die maximal mögliche Konzentration der Proteine durch die zelluläre Verträglichkeit des Puffers begrenzt. Eine Verdünnung des Puffers von 1:20 im Medium wurde von den ES-Zellen toleriert. Dabei wurde zwar die Gesamtanzahl der Kolonien um 1/3 reduziert, der Differenzierungsgrad blieb jedoch unbeeinträchtigt, 14 % der Kolonien zeigten eine undifferenzierte Morphologie, ca. 20 % waren differenziert und 66 % der Kolonien waren gemischt (Abb. 3.20, U, K).

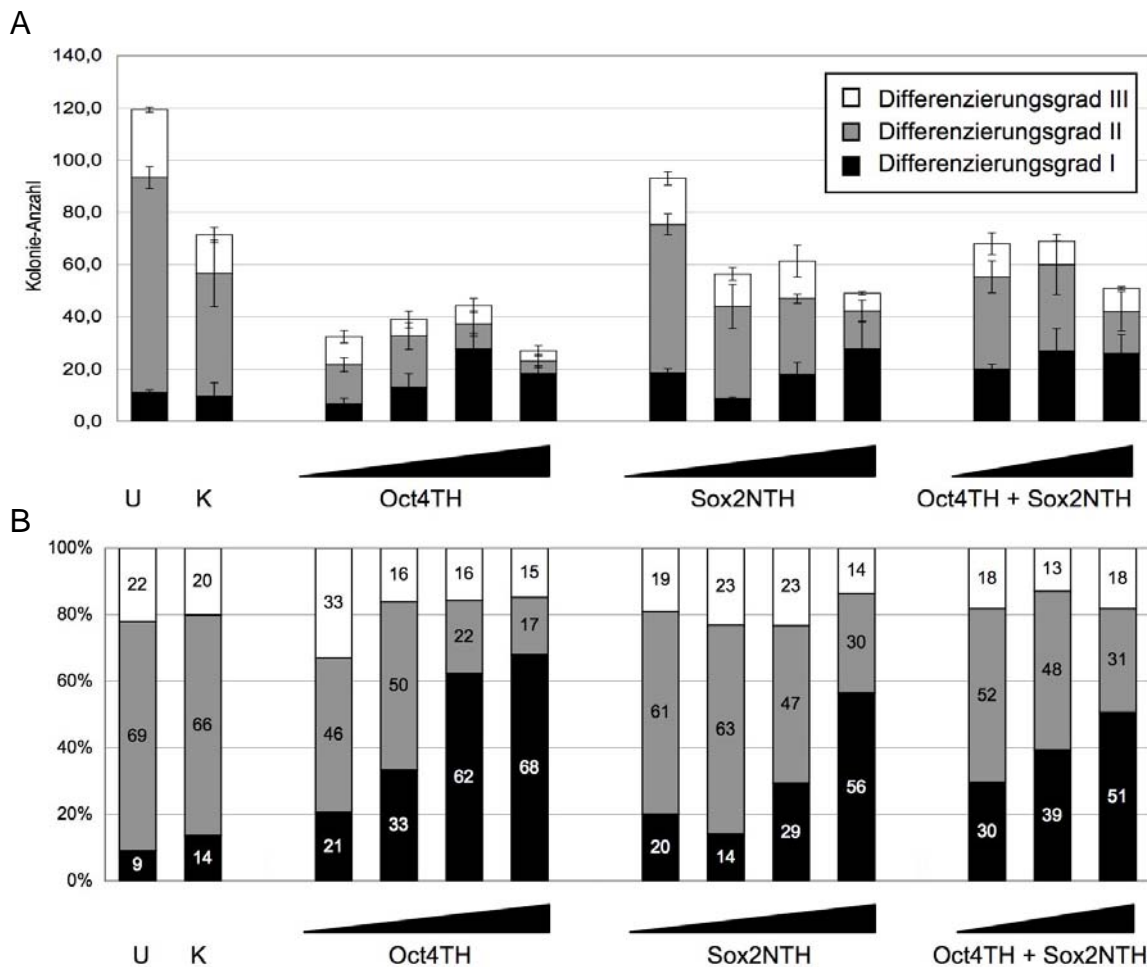


Abb. 3.20. Transduktion von Oct4TH und Sox2NTH steigert den Anteil undifferenzierter Kolonien

500 Oct4 GIP ES-Zellen/24-Well Vertiefung wurden ausgesät und 5 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen an Oct4TH, Sox2NTH oder einer Kombination von beiden inkubiert. Diese betragen für Oct4TH: 12,5, 25, 50 und 100 nM und für Sox2NTH 20, 40, 75 und 150 nM. Bei der Kombination beider Faktoren konnte maximal 50 nM von Oct4TH und 75 nM von Sox2NTH eingesetzt werden, da sonst die Maximalgrenze für den Pufferanteil überschritten werden würde. Der Pufferanteil wurde bei allen Ansätzen angeglichen, ebenfalls bei der Kontrolle.

A. Die Quantifizierung der Differenzierungsgrade der Kolonien, entsprechend der Aufteilung von Abb. 3.19. U: unbehandelte Zellen, die in ES-Medium kultiviert wurden, K: Kontrolle, Zellen die in Transduktionsmedium mit 1:20 Pufferanteil gehalten wurde. Das Experiment wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

B. Die prozentualen Anteile der verschiedenen Differenzierungsgrade der Kolonien von A.

Die maximale Konzentration lag für Oct4TH bei 100 nM und bei 150 nM für Sox2NTH. Die Konzentrationen wurden in weiteren 3 Verdünnungsschritten jeweils halbiert, wobei der Pufferanteil bei allen Proben auf 1:20 angeglichen wurde, um einheitliche Mediumbedingungen zu gewährleisten. Bei der Kombination beider Proteine konnte daher höchstens die halbmaximale Konzentration von jedem Protein eingesetzt werden.

Die Quantifizierung der Kolonien zeigte, dass die Proteinzugabe die Anzahl der gebildeten Kolonien reduziert (Abb. 23.A). Bei der maximalen Konzentration von Oct4TH ist die Kolonienanzahl auf die Hälfte reduziert, bei Sox2NTH auf 1/3. Es ist allerdings eine Verschiebung des Differenzierungsgrads von II (gemischte Kolonien) hin zu I (undifferenzierte Kolonien) erkennbar. Dies wird im Fall von Oct4TH besonders deutlich, wo die maximale Konzentration zu einem Anteil von fast 70 % undifferenzierter Kolonien anstieg, bei Sox2NTH wuchs der Anteil der undifferenzierten Kolonien auf 56 % (Abb. 3.20.B).

Außerdem ist in beiden Fällen eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit erkennbar, da die Anzahl der undifferenzierten Kolonien abnimmt wenn die Proteinkonzentration sinkt.

Durch die Applikation beider Proteine gleichzeitig war sogar ein additiver Effekt zu beobachten, im Vergleich zu der einzel-Applikation der gleichen Konzentration eines Faktors.

Da die Gesamtkolonienanzahl durch die Proteinzugabe abgenommen hatte, sollte der Einfluss der transduzierbaren Proteine auf die Vitalität der Zellen näher untersucht werden. Dafür wurden 10000 E14 Zellen/12-Well Vertiefung 5 Tage mit Oct4TH und Sox2NTH zu den oben genannten Konditionen behandelt. Danach wurden die Zellen vereinzelt, mit Hoechst gefärbt und einer Durchflusszytometrie-Analyse unterzogen (Abb 3.21).

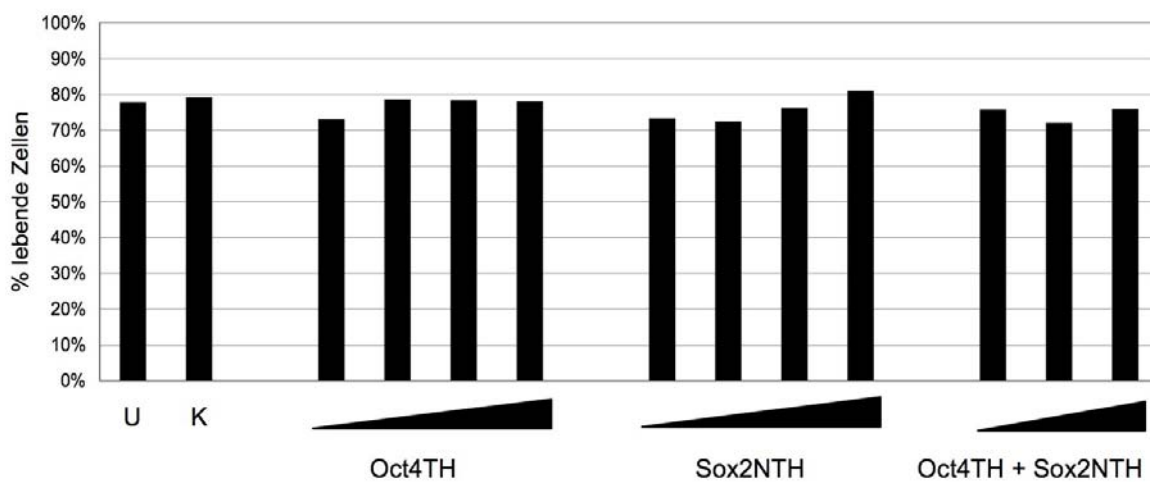


Abb. 3.21. Die Proteintransduktion hatte keinen negativen Einfluss auf die Vitalität von ES-Zellen

Nach 5-tägiger Proteinbehandlung wurden die Zellen vereinzelt und mit Hoechst gefärbt. Nur die toten Zellen nehmen den Farbstoff auf und werden bei der Durchflusszytometrie-Analyse aussortiert. Der Anteil der lebenden Zellen lag unabhängig von der Proteinkonzentration bei 75-80 %. Proteinkonzentrationen siehe Abb. 3.20. U: unbehandelte Zellen, die in ES-Medium kultiviert wurden, K: Kontrolle, die in Transduktionsmedium mit 1:20 Pufferanteil gehalten wurde. Die Daten sind repräsentative Ergebnisse von zwei Versuchen.

Wie in Abb. 3.21 zu erkennen ist, waren in allen Proben 75-80 % der Zellen lebend und es bestanden nur marginale Unterschiede in dem Anteil der lebenden Zellen, die nicht mit der Proteinkonzentration in Relation standen. Auch die Zugabe des Puffers schien keinen toxischen Effekt auf die Zellen zu haben.

3.5.2 SSEA-1 als Marker für pluripotente mES-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Transduktion von Oct4TH und Sox2NTH auf morphologischer Ebene zu einem erhöhten Anteil an pluripotenten Zellen führte, sollte nun der Einfluss der Transduktion auf molekularer Ebene untersucht werden. SSEA-1 ist ein Oberflächenmarker pluripotenter mES-Zellen (Cui et al., 2004). E14 Zellen wurden wie in Abb. 3.20 beschrieben mit unterschiedlichen Konzentrationen von Oct4TH und Sox2NTH behandelt. Nach 5-tägiger Behandlung wurden die Zellen abgelöst, vereinzelt, auf SSEA-1 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 3.22).

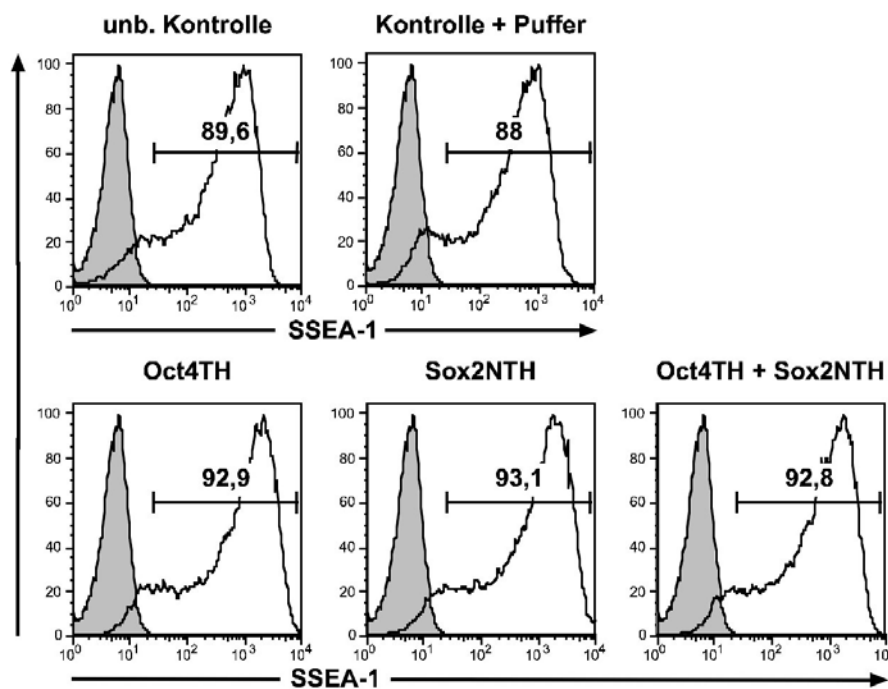


Abb. 3.22. Der bereits sehr hohe Anteil an SSEA-1 positiven Zellen konnte durch die Behandlung mit Oct4TH und Sox2NTH noch geringfügig gesteigert werden

Die Histogramme zeigen den Anteil der SSEA-1 positiven Zellen (schwarze Linie) im Vergleich zu Zellen, die nur mit dem Zweitantikörper gefärbt wurden (graues Histogramm). Die Proteinkonzentrationen betragen in den Einzelansätzen 100 nM für Oct4TH und 150 nM für Sox2NTH und bei der Doppelinkubation 50 nM für Oct4TH bzw. 75 nM für Sox2NTH.

Kontrollzellen, die in ES-Medium gehalten wurden, waren zu knapp 90 % SSEA-1 positiv. Das Transduktionsmedium mit zusätzlichem Glycerin-Puffer scheint keinen Einfluss auf den

Anteil der SSEA-1 positiven Zellen zu haben. Der in den Kontrollen bereits sehr hohe Anteil an SSEA-1 positiven Zellen konnte durch die Behandlung mit transduzierbaren Proteinen bei den maximalen Konzentrationen auf bis zu 93 % erhöht werden. Bei den geringeren Proteinkonzentrationen lag der Anteil der SSEA-1 positiven Zellen ebenfalls zwischen 90-93 %. In Abb. 3.22. sind exemplarisch die Histogramme der jeweils höchsten Proteinkonzentrationen abgebildet.

Da SSEA-1 als Marker scheinbar in der Sättigung ist, wäre eine Möglichkeit gewesen das GFP-Transgen der Oct4-GIP Zelllinie als Reporter für den Einfluss der Oct4- und Sox2-Proteinbehandlung auf die Oct4-Expression in ES-Zellen einzusetzen. Dementsprechende Vorversuche zeigten jedoch, dass die Sensitivität dieses System zu gering und die Verzögerung der GFP-Herunterregulation zu groß war, um die Effekte kurzfristiger Proteinapplikation über eine Durchflußzytometrieanalyse oder mikroskopisch zu messen.

3.5.3 Transaktivierungspotential von Oct4TH und Sox2NTH in murinen ES-Zellen

Um den Einfluss von Oct4TH und Sox2NTH auf die Aktivierung der Transkription in murinen ES-Zellen zu untersuchen, wurde die Expression von pluripotenz-erhaltenden Zielgenen quantitativ auf mRNA Ebene untersucht. Dafür wurden E14 ES-Zellen für 3 Tage in An- und Abwesenheit von LIF mit der maximalen Konzentration von jeweils einem Protein, oder einer Kombination beider Proteine behandelt. Die Expression der Zielgene Oct4, Sox2 und Nanog im Vergleich zu Kontrollzellen wurde untersucht (Abb. 3.23).

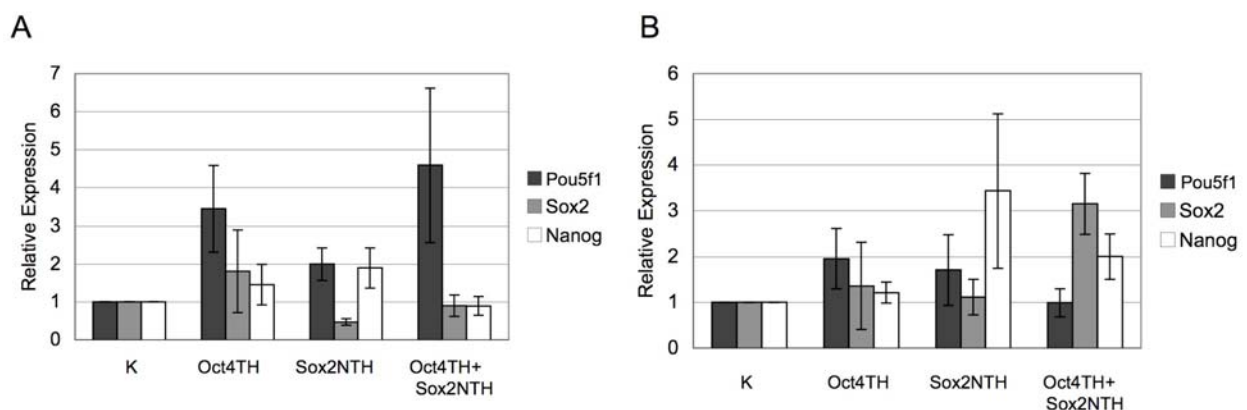


Abb. 3.23. Transaktivierungspotential von Oct4TH und Sox2NTH auf die Expression von Zielgenen in murinen ES-Zellen

3.10⁴ E14 ES-Zellen wurden/6-Well Vertiefung ausgesät und mit Oct4TH, Sox2NTH oder einer Kombination von beiden in Anwesenheit (A) oder Abwesenheit (B) von LIF für 3 Tage kultiviert. Jede PCR wurde 4 Mal durchgeführt, die Werte sind auf die Expression von β -Actin normalisiert und als relative Expressionsänderung zu Kontrollzellen präsentiert, die entsprechend mit dem Transduktionsmedium behandelt wurden. Die Fehlerbalken

repräsentieren den *SEM*. Die Proteinkonzentrationen betragen in den Einzelansätzen 100 nM für Oct4TH und 185 nM für Sox2NTH und bei der Doppelinkubation 50 nM für Oct4TH bzw. 92 nM für Sox2NTH.

In der Anwesenheit von LIF zeigt Oct4TH das größte Transaktivierungspotential bei der Expression von *Pou5f1* (Abb. 3.23.A). Dieser Effekt wird bei gleichzeitiger Applikation mit Sox2NTH erhöht. Sox2NTH zeigt hingegen in Anwesenheit von LIF ein geringeres Transaktivierungspotential, die Expression von *Sox2* scheint sogar reduziert zu werden. In der Abwesenheit von LIF ist die Situation umgekehrt, Sox2NTH zeigt das größere Aktivierungspotential, besonders bei der Expression von *Nanog* (Abb.3.23.B).

3.5.4 Kompensation des *knock out* bzw. *knock down* von Oct4 und Sox2 durch die Transduktion der rekombinanten Faktoren

Die Untersuchung des Anteils der SSEA-1 positiven Zellen unter optimalen Kulturbedingungen zeigt, dass dieser Pluripotenzmarker bereits in der Sättigung ist und daher nicht als Indikator für die Funktionalität der transduzierbaren Pluripotenzfaktoren geeignet ist (Absatz 3.5.2). Ähnlich ist die Situation bei den intrazellulären Pluripotenzmarkern. Oct4, Sox2 und *Nanog* gelten als Schlüsselregulatoren der Pluripotenz, die sich auch gegenseitig regulieren. Dieses stark regulierte Netzwerk erlaubt daher ebenfalls nur unzureichend die Untersuchung des Einflusses der transduzierbaren Faktoren Oct4 und Sox2 in undifferenzierten Zellen, da der Effekt der Konzentrationserhöhung unter optimalen Kulturbedingungen durch eine interne Rückkopplung wieder normalisiert werden könnte (Boer et al., 2007). Um einen Weg zu finden, die Funktionalität der Proteine auf molekularer Ebene und mit deutlicheren Effekten zu untersuchen, wurde ein Kompensations-Versuch durchgeführt. Dabei sollte die endogene Expression von Oct4 und Sox2 reduziert bzw. eliminiert werden, und die Auswirkung dieser Reduktion auf das regulatorische Netzwerk dieser Faktoren untersucht werden. Außerdem sollte geprüft werden, ob die transduzierbaren Faktoren Oct4 und Sox2 in der Lage sind, diesen Verlust zu kompensieren. Es wurden folgende Strategien gewählt, um die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren zu vermindern: I) eine *Pou5f1 flox/flox* Zelllinie, bei der durch Cre-vermittelte Rekombination die *Pou5f1* Expression inaktiviert werden kann und II) die Reduktion der Expression von *Pou5f1* und *Sox2* durch RNA-Interferenz (RNAi).

3.5.4.1 Kompensationsversuch des *Pou5f1 knock outs* durch Oct4TH Transduktion

Für diesen Versuch wurde eine bereits etablierte *Pou5f1 flox/flox* ES-Zelllinie genutzt (Kehler et al., 2004). Diese Zelllinie enthält homozygot *loxP*-modifizierte *Pou5f1* Allele (Abb. 3.21.A). Durch eine Cre-vermittelte Rekombination kann die Expression von *Pou5f1* aufgehoben werden. Es sollte untersucht werden, ob Oct4TH die Deletion des endogenen Oct4 kompensieren kann.

Etablierung des HTNCre-vermittelten knock out von Pou5f1

Für die Deletion des endogenen *Pou5f1* wurde die transduzierbare Cre-Rekombinase (HTNCre) eingesetzt (Peitz et al., 2002). Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Einsatz der transduzierbaren Cre-Rekombinase in ES-Zellen zu über 90 % Rekombinationseffizienz führt (Peitz et al., 2007). Die *Pou5f1 flox/flox* ES-Zellen wurden mit 2 μ M HTNCre für 24 h behandelt. Danach wurde die genomische DNA der behandelten, unbehandelten und der wildtypischen parentalen Zelllinie präpariert und über PCR genotypisiert (Abb. 3.21.B). Bei diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass eine HTNCre-vermittelte Deletion von *Pou5f1* möglich ist.

Um die Effizienz der Deletion von *Pou5f1* durch HTNCre zu validieren, wurden verschiedene Konzentrationen HTNCre appliziert und die Deletions-Effizienz per Southern Blot untersucht. *Pou5f1 flox/flox* und *Pou5f1 +/+* ES-Zellen wurden mit 0, 4 und 8 μ M HTNCre für 20 h behandelt. Danach wurde die genomische DNA aus den Zellen isoliert und ein *EcoRI* Restriktionsverdau durchgeführt. Die Southern Blot Strategie ist in Abb. 3.21.A schematisch dargestellt. Im Falle eines wildtypischen Allels wird eine Bande von 12 Kb erwarten, wenn die Deletion stattgefunden hat wird eine Bande bei 10,8 Kb erwartet. Die Southern Blot Analyse zeigt, dass bei 4 μ M HTNCre eine partielle Rekombination stattfindet und erst bei 8 μ M die Deletion vollständig zu sein scheint (Abb. 3. 21.C).

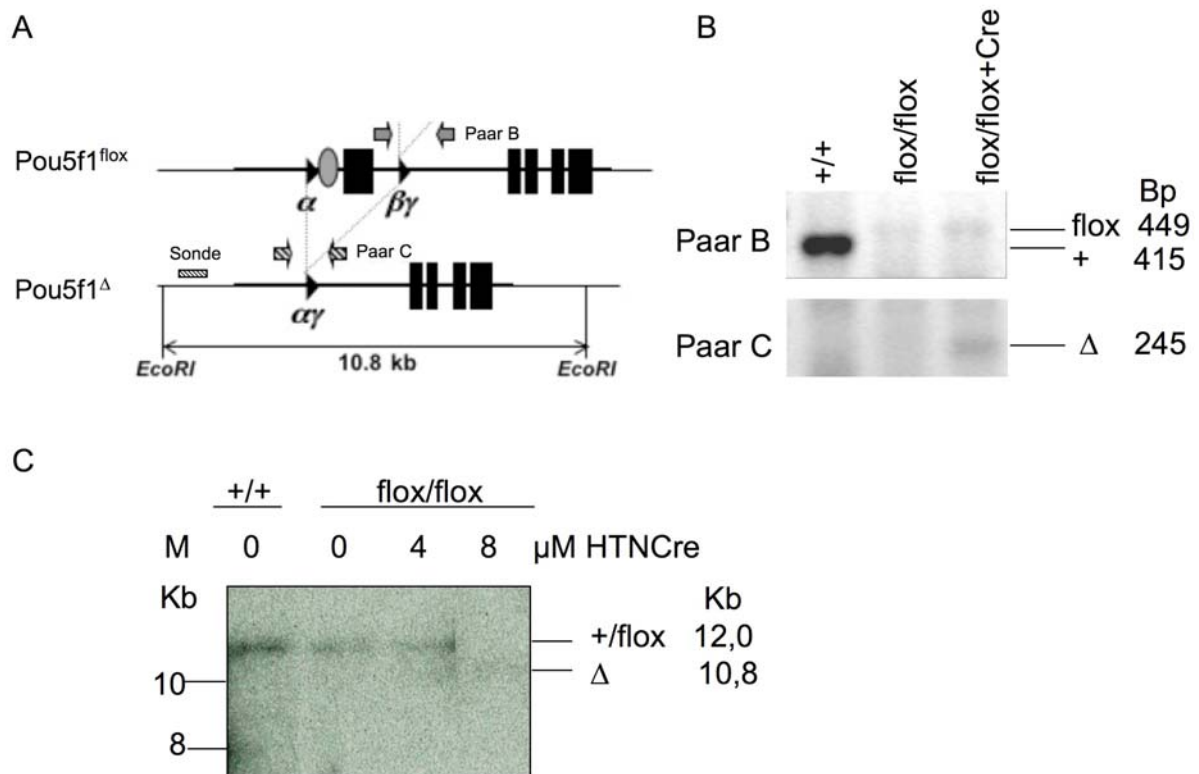


Abb. 3. 24. Genotypisierung der *Pou5f1* flox/flox Zelllinie vor und nach der Behandlung mit HTNCRE

A. Schematische Darstellung eines *loxP*-modifizierten *Pou5f1* Allels in der *Pou5f1* flox/flox Zelllinie (nach Kehler et al., 2004). In dem *Pou5f1*^{flox} Allel flankieren zwei *loxP* Sequenzen die essentielle *Pou5f1* Promotor Region (graues Oval) und das erste *Pou5f1* Exon (schwarzes Rechteck). Dieser Genotyp kann mit dem PCR-Primerpaar B detektiert werden, welches mit zwei Pfeilen eingezeichnet ist. Im Falle des Wildtyps (+) wird eine Bande von 415 Bp erwartet und im Falle von *Pou5f1*^{flox} 449 Bp. Nach einer Deletion des *loxP*-flankierten Fragments durch Cre-vermittelte Rekombination (*Pou5f1*^Δ) kann der Genotyp durch das PCR-Primerpaar C überprüft werden, wobei im Falle der Deletion eine Bande von 245 bp erwartet wird. Ebenfalls angezeigt ist die Southern-Blot-Strategie zur Überprüfung der Deletion. Nach einem *EcoRI* Verdau des Genoms wird durch die angezeigte Sonde ein Fragment von 10,8 Kb detektiert. Im Falle von *Pou5f1*^{flox} wird eine Bande von 12,0 Kb erwartet.

B. PCR-Analyse des Genotyps des Wildtyps (+/+), der homozygot *Pou5f1* loxP-flankierten Zelllinie (flox/flox) und nach der Behandlung dieser Zellen mit 2 μ M HTNCRE (flox/flox+Cre). Bei PCR-Primerpaar B weist der Wildtyp die erwartete Bande bei 415 Bp auf (+) und die *Pou5f1* flox/flox Zelllinie eine Bande bei 449 Bp (flox). Auch nach der Behandlung mit HTNCRE ist die flox-Bande noch vorhanden, was auf unvollständige Rekombination schließen lässt. Mit dem Primerpaar C ist nach der Behandlung mit HTNCRE eine Bande bei 245 Bp (Δ) vorhanden, die nur nach vollzogener Rekombination zu stande kommt.

C. Southern Blot zur Analyse der Rekombinationsbedingungen von *Pou5f1* flox/flox-Zellen. *Pou5f1* flox/flox und parentale Zellen wurden 20 h mit den angezeigten Konzentrationen an HTNCRE in Medium mit 5 % FKS behandelt. Die genomische DNA wurde isoliert und mit *EcoRI* verdaut. Die Southern Blot Analyse der genomischen DNA dieser Zellen zeigt, dass bei den unbehandelten Zellen, sowie bei den parental Zellen (+/+) eine Bande bei 12,0 Kb (+) erscheint. Bei der Behandlung mit 4 μ M HTNCRE erscheint bei der flox/flox Zelllinie zusätzlich eine Bande bei 10,8 Kb (Δ). Bei 8 μ M HTNCRE scheint die Rekombination vollständig zu sein, da nur noch die Δ -Bande vorhanden ist. M: 1 Kb Marker.

Versuche zur Kompensation der Pou5f1-Deletion durch Oct4TH

Um zu testen, ob das transduzierbare Oct4 den Verlust des endogenen Oct4 kompensieren kann, wurde folgender Versuch durchgeführt: *Pou5f1 flox/flox* Zellen und die parentalen *Pou5f1 +/+* Zellen wurden mit 10 μ M HTNCre für 20 h behandelt. Der FKS-Gehalt im Medium wurde von 5 auf 15 % angehoben, da dies den publizierten Transduktionsbedingungen in ES-Zellen bei HTNCre Konzentrationen in dieser Höhe entspricht (Peitz et al., 2007). Die HTNCre Konzentration wurde im Vergleich zu den Vorversuchen auf von 8 auf 10 μ M angehoben um der Transduktionsinhibition durch das FKS entgegen zu wirken. Danach wurde ein Teil der Zellen 5 Tage mit Oct4TH behandelt. Vor der Auswertung wurden die Zellen fixiert und auf alkalische Phosphatase-Aktivität gefärbt (Abb. 3.25). Die unbehandelten Zellen von beiden Zelllinien zeigten kaum Unterschiede im Wachstumsverhalten, die *loxP*-modifizierten Zellen schienen mehr zu proliferieren, da sie mehr und größere Kolonien bildeten. Die HTNCre-Behandlung an sich scheint eine sehr hohe toxische Wirkung auf die Zellen zu haben, da die Koloniebildung und das Wachstum bei den HTNCre-behandelten parentalen Zellen extrem reduziert waren. Bei den *Pou5f1 flox/flox* Zellen haben sich nach der HTNCre-Behandlung hingegen keine Kolonien mehr gebildet. Die Tatsache, dass der Unterschied vor und nach der HTNCre-Behandlung bei den *Pou5f1 flox/flox* Zellen größer war als bei den *Pou5f1 +/+* Zellen, könnte zusätzlich zu dem toxischen Effekt der HTNCre-Transduktion auf eine Wachstumsinhibition durch die *Pou5f1*-Deletion hinweisen. Die Behandlung mit Oct4TH konnte bei beiden Zelllinien keine Wachstumsförderung bewirken. Wurden die Zellen schon während der HTNCre Transduktion mit Oct4TH behandelt, kam es zu starker Präzipitation der Proteine. Die Präzipitate waren ebenfalls hinderlich für das Koloniewachstum, so dass sich auch in diesem Fall nach der Deletion von *Pou5f1* keine Kolonien bildeten.

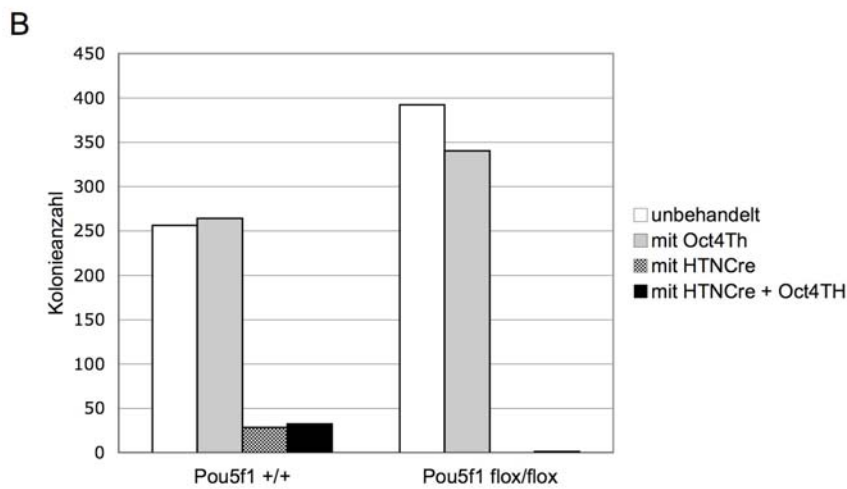
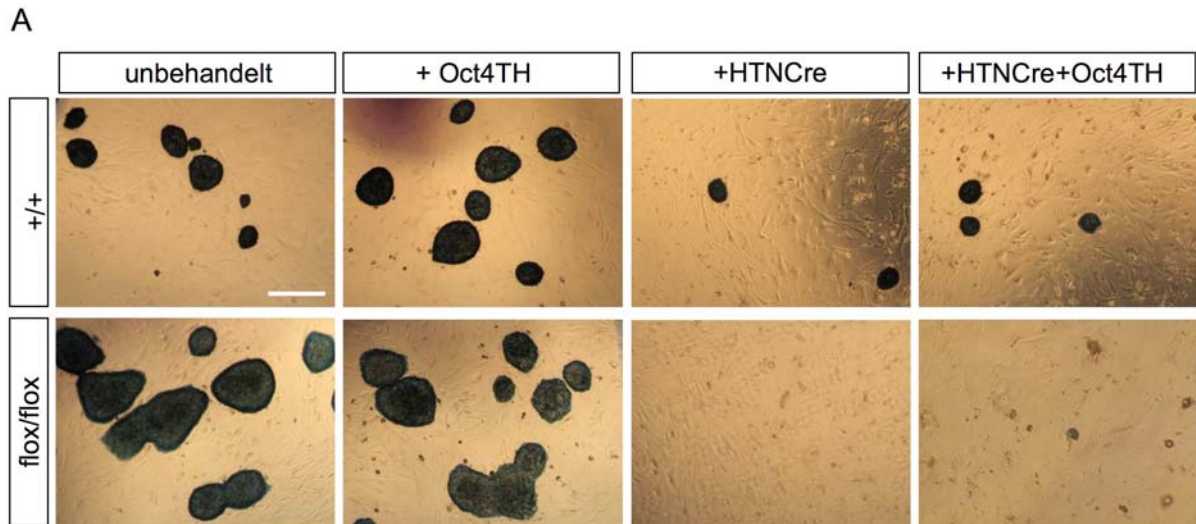


Abb. 3.25. *Pou5f1*-Deletion und Kompensations-Versuch mit Oct4TH-Behandlung

A. 1000 Zellen/24-Well Vertiefung der *Pou5f1 flox/flox* Zelllinie und der parentalen (+/+) Zellen wurden auf einer Lage von Fütterzellen ausgesät und 20 h mit 10 μ M HTNCre in ES-Medium mit 15% FKS behandelt. Danach wurde ein Teil der Zellen 5 Tage mit 100 nM Oct4TH behandelt. Die Zellen wurden nach Beendigung des Versuchs fixiert und auf alkalische Phosphatase-Aktivität gefärbt. Maßstab: 50 μ m.

B. Quantifizierung der Kolonienzahl in A.

Da die Deletion von *Pou5f1* anscheinend zur Wachstumsinhibition führte, bevor die Möglichkeit der Kompensation bestand, sollte eine Methode eingesetzt werden, bei der die Expression von *Pou5f1* nur partiell reduziert wird. Hierfür wurde der *knock down* durch die Methodik der RNA-Interferenz (RNAi) gewählt.

3.5.4.2 Etablierung des RNAi knock downs von *Pou5f1* und *Sox2*

Für einen vorübergehenden *knock down* (*k.d.*) wurde eine transiente Transfektion von *short interfering RNA* (siRNA) gewählt, um die endogene Expression von *Pou5f1* und *Sox2* zu reduzieren. Für den *Pou5f1 k.d.* wurde eine veröffentlichte Sequenz aus Hey et al. (2004), und für den *Sox2 k.d.* eine Sequenz aus Ivanova et al. (2006) genutzt, die bereits auf ihre Spezifität hin getestet worden waren.

Um die *knock down*-Effizienz auf Transkriptionsebene nachzuweisen, wurden quantitative RT-PCR Analysen durchgeführt. Die Transfektion von 80 nM *Pou5f1* siRNA senkte die Transkription von *Pou5f1* auf 10 % relativ zur Transkription im Fall der Kontroll-siRNA Transfektion unter gleichen Bedingungen (Abb. 3.26.A). Der *Sox2 k.d.* auf RNA-Ebene benötigte eine höhere Konzentration an siRNA, um einen vergleichbaren *k.d.* zu erreichen. Die Applikation von 130 nM *Sox2* siRNA führte zu einer Reduktion der *Sox2* Transkription auf ca. 30 % der Expression unter Kontrollbedingungen (Abb. 3.26.B).

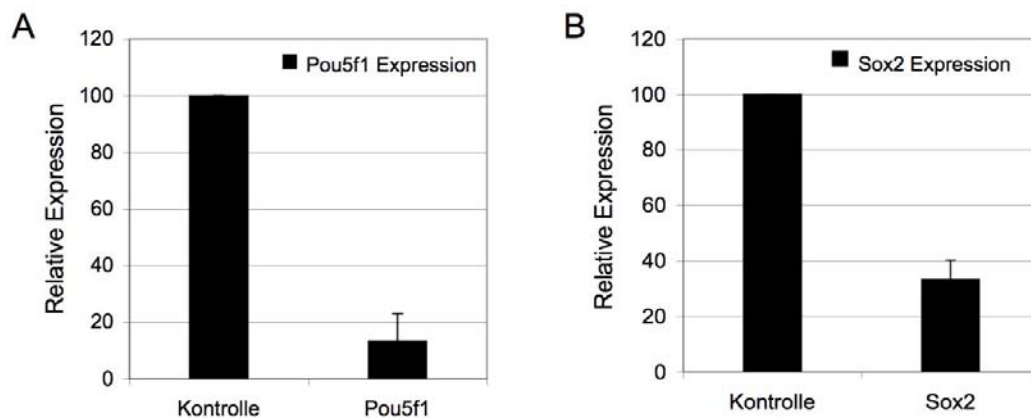


Abb. 3.26. qRT-PCR Analyse des siRNA *k.d.* von *Pou5f1* und *Sox2* 48 h nach Beginn der siRNA Transfektion

ES-Zellen wurden in (A) mit 80 nM siRNA gegen *Pou5f1* transfiziert, dadurch wurde die Transkription von *Pou5f1* auf 10 % der Kontrolle reduziert und in (B) mit 130 nM siRNA gegen *Sox2*, wodurch die Transkription von *Sox2* auf 30 % der Kontrolle reduziert wurde. Die jeweiligen Kontrollzellen wurden mit den entsprechenden Konzentrationen an negativ-Kontroll siRNA behandelt. Die Ergebnisse sind auf die Expression von β -*Actin* normalisiert und sind der Mittelwert von vier unabhängigen Versuchen, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Als nächster Schritt wurde untersucht, ob der *knock down* über mehrere Tage hinweg stabil ist. Dafür wurden ES-Zellen mit der jeweiligen siRNA transfiziert und über mehrere Tage inkubiert. Die Western Blot Analyse zeigt, dass die Expression von Oct4 und Sox2 über einen Zeitraum von mindestens 72 h reduziert bleibt (Abb. 3.27).

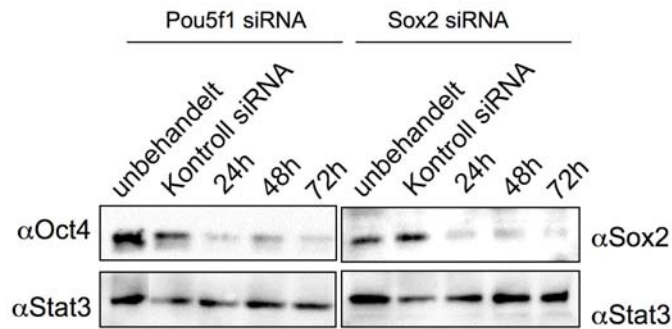


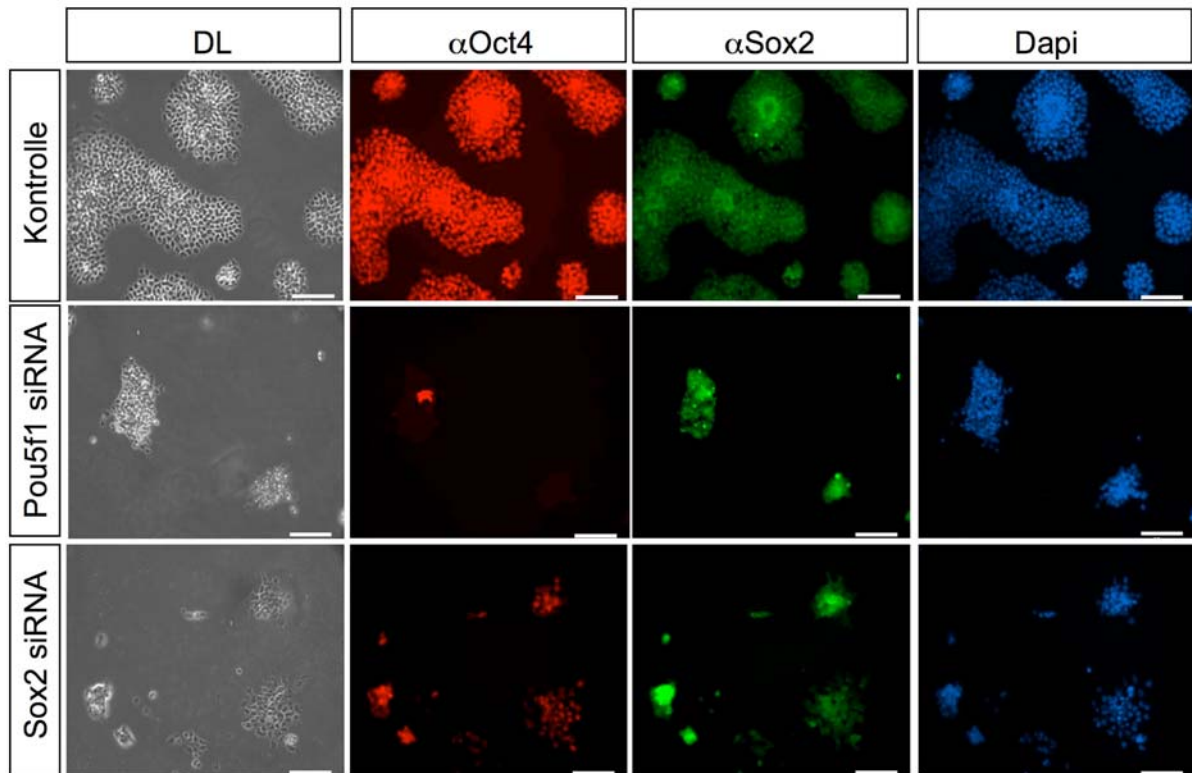
Abb. 3.27. Die *Pou5f1* und *Sox2* Expression konnte effizient durch RNAi reduziert werden

1.10^5 E14 ES-Zellen/24-Well Vertiefung wurden auf Gelatine ausgesät. Die Zellen wurden mit der entsprechenden siRNA gegen *Pou5f1* und *Sox2* transfiziert.

Die Western Blot Analyse zeigt, dass das Signal für *Pou5f1* und *Sox2* Expression durch siRNA Behandlung der Zellen bis zu 72 h nach Beginn der Transfektion reduziert wird. Das Signal beträgt weniger als 30 % der Expression in unbehandelten Zellen oder negativ-Kontroll siRNA behandelten Zellen (siRNA Konzentrationen: 80 nM bei *Pou5f1* siRNA, 100 nM bei *Sox2* siRNA und 80 nM bei negativ-Kontroll siRNA). Die eingesetzten Zellzahlen pro SDS-Probe wurden angeglichen, zusätzlich wurde Stat3 als Ladekontrolle benutzt.

Diese Ergebnisse konnten auch auf immunzytochemischer Ebene bestätigt werden (Abb. 3.28). Bei einem *k.d.* von *Pou5f1* war Oct4 nur noch in ca. 20 % der Kolonien detektierbar im Vergleich zu 90 % positiven Kolonien bei der negativ-Kontroll siRNA. Bei einem *Sox2 k.d.* war in ca. 50 % der Kolonien Sox2 detektierbar, im Vergleich zu 80 % positiver Kolonien in der Kontrolle. Interessanterweise blieb im Falle des *Pou5f1 k.d.* die Sox2 Expression unverändert, während Oct4 bei einem *Sox2 k.d.* nur noch in ca. 30 % der Kolonien exprimiert wurde.

A



B

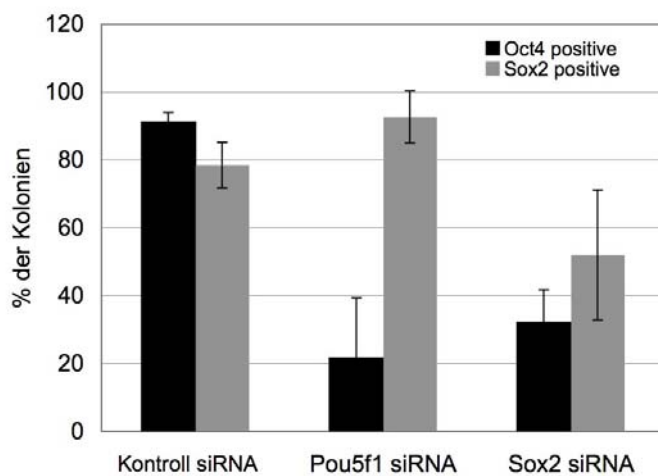


Abb. 3.28. Immunzytochemische Analyse bestätigt den *k.d.* von *Pou5f1* und *Sox2*

A. $2 \cdot 10^5$ E14 ES-Zellen/6-Well Vertiefung wurden ausgesät und mit der angezeigten siRNA transfiziert. Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden 48 h nach Beginn der Transfektion angefertigt. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt, DL: Durchlicht, Maßstab: 50 μ m.

B. Die Quantifizierung der Immunfluoreszenz-Aufnahmen zeigt, dass nach dem *Pou5f1 k.d* nur noch 10 % der Kolonien Oct4 positiv sind., die *Sox2*-Expression bleibt in diesem Fall unbeeinflusst. Nach einem *Sox2 k.d.* waren 50 % der Kolonien Sox2-negativ, was auch an eine Herunterregulation der Oct4-Expression gekoppelt war.

3.5.4.3 Kompensation des siRNA *k.d.* von *Pou5f1* und *Sox2* durch transduzierbare Proteine

Im nächsten Schritt sollte getestet werden, ob die transduzierbaren Faktoren den *knock down* von *Pou5f1* und *Sox2* kompensieren können. Dazu wurde 24 h nach Beginn der Transfektion der siRNA gegen *Pou5f1* und *Sox2* das entsprechende Protein, Oct4TH bzw. Sox2NTH, appliziert. Nach weiteren 24 h wurde die Morphologie der Zellen, untersucht bzw. RNA extrahiert (Abb. 3.29).

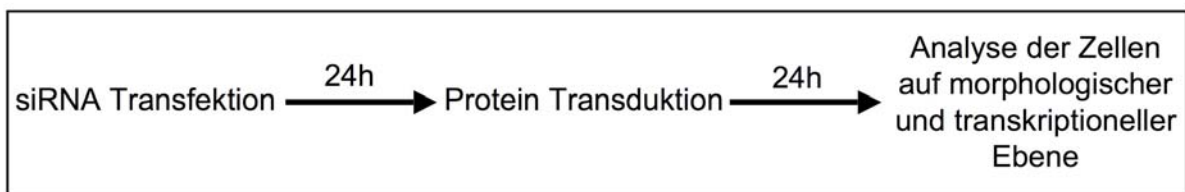
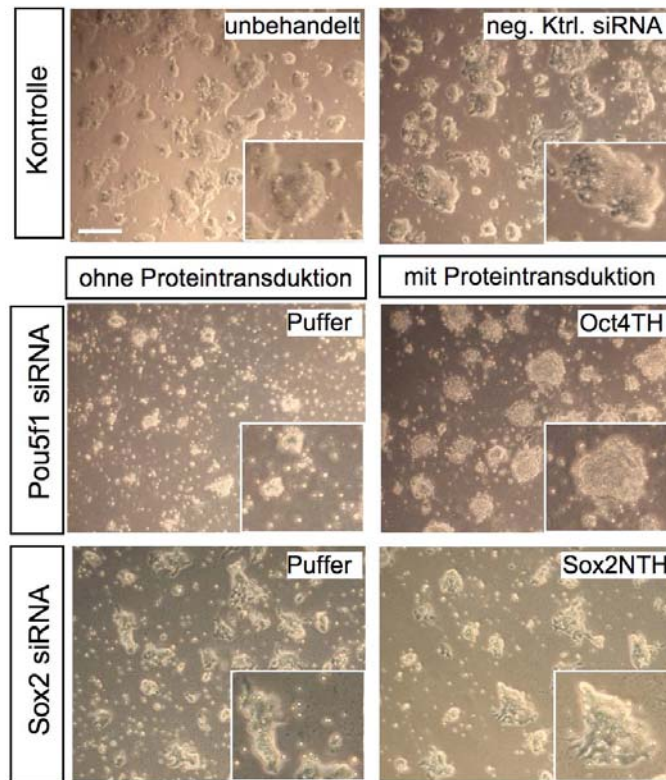


Abb. 3.29. Zeitplan des Kompensationsexperiments des siRNA *knock downs* von *Pou5f1* und *Sox2* durch transduzierbare Faktoren

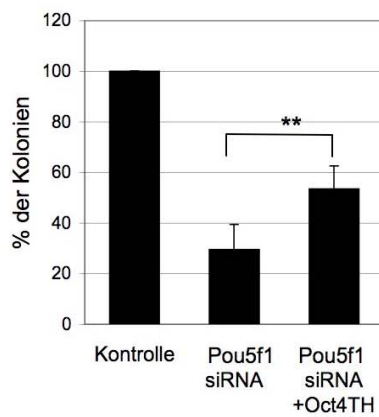
Morphologisch betrachtet, konnten unterschiedliche Phänotypen bei ES-Zellen nach dem *k.d.* von *Pou5f1* bzw. von *Sox2* beobachtet werden. Der *k.d.* von *Pou5f1* führte zu geringerer Koloniebildung (70 % weniger Kolonien), vielen abgelösten Zellen und kleineren Kolonien, morphologisch jedoch nicht differenziert (Abb. 3.30. A, B). Der *k.d.* von *Sox2* bewirkte neben eine um 50 % reduzierte Koloniebildung auch Differenzierung in epithelartige Zellen (Abb. 3.30. A, C).

Die Zugabe von Oct4TH führte im Gegensatz zu dem unbehandelten Ansatz zu einer Verdoppelung der Kolonienanzahl und wesentlich größeren Kolonien (Abb. 3.30. A, B). Obwohl die Kolonienanzahl trotz der Sox2NTH Zugabe unverändert blieb, kam es zu einem Anstieg des Anteils der undifferenzierten Kolonien von 5 auf 20 % (Abb. 3.30. A, C).

A



B



C

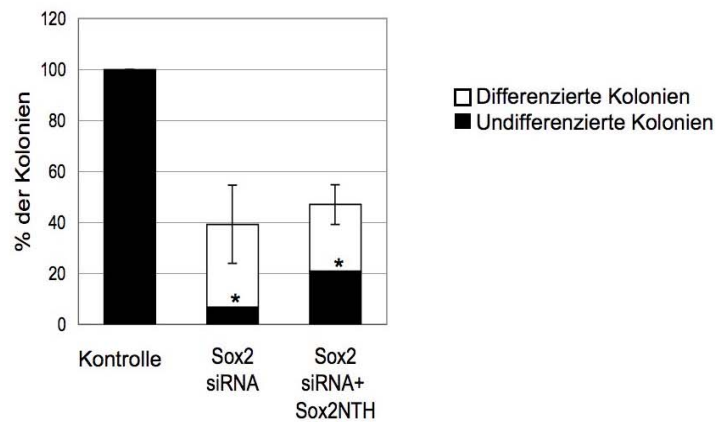


Abb. 3.30. Der Phänotyp des *k.d.* von *Pou5f1* bzw. *Sox2* konnte durch die Zugabe von Oct4TH bzw. Sox2NTH teilweise kompensiert werden

A. Mikroskopische Aufnahmen von Oct4 GIP ES-Zellen 48 h nach Transfektion der siRNA gegen *Pou5f1* und *Sox2*. Die Proteintransduktion 24 h nach Beginn der Transfektion führte im Fall von Oct4TH zu einer größeren Anzahl an Kolonien und mehr Wachstum. Die Zugabe von Sox2NTH führte zu weniger differenzierten Kolonien als in dem unbehandelten Ansatz. Proteinkonzentrationen: Oct4TH= 100 nM und Sox2NTH= 200 nM. Maßstab: 50 µm.

B. Vergleich der Kolonienanzahl nach *Pou5f1* siRNA Transfektion, mit und ohne Oct4TH-Behandlung.

C. Kolonienanzahl nach *Sox2* siRNA Transfektion, mit und ohne Sox2NTH-Behandlung, unterteilt in differenzierte und undifferenzierte Kolonien.

Die Ergebnisse sind der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, ** steht für p-Wert < 0,0001, * p<0,05 für die Anzahl undifferenzierter Kolonien.

Um den Unterschied zwischen mit Protein behandelten und unbehandelten Zellen auf Expressionsebene zu untersuchen, wurde die RNA aus den verschiedenen Ansätzen isoliert und über quantitative RT-PCR die Expression verschiedener Pluripotenzmarker untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die *Pou5f1* Expression durch den siRNA *k.d.* 40-fach abgeschwächt wurde (Abb. 3.31.A). Der Effekt auf der Ebene der Oct4-Zielgene *Sox2* und *Nanog* war weniger stark, diese waren 2-fach reduziert. Der *Pou5f1 k.d.* konnte durch die Zugabe von Oct4TH zu 2/3 kompensiert werden.

Der *Sox2 k.d.* drückte sich weniger in der Reduktion der Expression von *Sox2* als in der verminderten Expression der Sox2-Zielgene *Pou5f1* und *Nanog* aus (Abb. 3.31.B). Die *Sox2* Expression wurde nur 2,5-fach reduziert, während die Expression von *Pou5f1* 8-fach abgeschwächt wurde und die von *Nanog* 9-fach. Durch die Zugabe von Sox2NTH konnte die Reduktion von *Pou5f1* um ca. die Hälfte und die von *Nanog* um etwa 2/3 kompensiert werden.

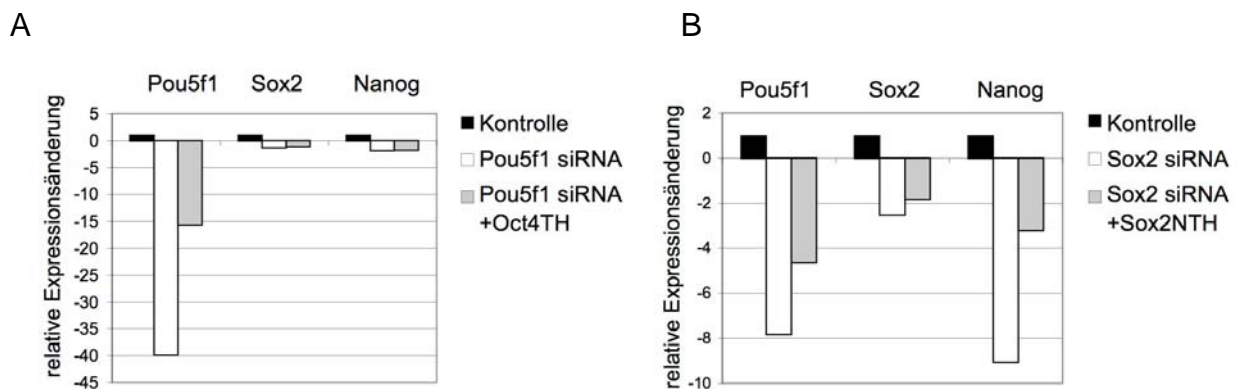


Abb. 3.31. Untersuchung der Auswirkungen des siRNA *k.d.* von *Pou5f1* bzw. *Sox2* auf die Expression ihrer Zielgene und die Möglichkeit der Kompensation des *k.d.* mit transduzierbaren Oct4- und Sox2-Proteinen

Oct4 GIP ES-Zellen wurden wie in Abb. 3.29. gezeigt behandelt, die RNA isoliert und über qRT-PCR analysiert.

A. Der siRNA *k.d.* von *Pou5f1* konnte durch die Zugabe von Oct4TH bis zu 2/3 kompensiert werden.

B. Der siRNA *k.d.* von *Sox2* hatte starke Auswirkungen auf die Expression der Zielgene *Pou5f1* und *Nanog*. Diese wurden 8- bzw. 9-fach herunterreguliert. Durch die Zugabe von Sox2NTH konnte die Abschwächung der Expression auf ca. die Hälfte vermindert werden.

Die Werte sind auf die Expression von β -Actin normalisiert und als relative Expressionsänderung zur negativ-Kontroll siRNA präsentiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche, die im Triplikat durchgeführt wurden. Die Proteinkonzentrationen betragen 100 nM für Oct4TH und 200 nM für Sox2NTH.

Um zu untersuchen, ob die Rolle von Sox2 durch eine Überexpression von Oct4 kompensiert werden kann, wurde nach einem *Sox2 k.d.*, dem Zeitplan von Abb. 3.29 entsprechend, Oct4TH hinzugegeben. Es ist deutlich zu erkennen, dass Oct4TH die Reduktion in der

Expression von *Pou5f1* und *Nanog*, verursacht durch den *Sox2 k.d.*, nicht kompensieren konnte (Abb. 3.32).

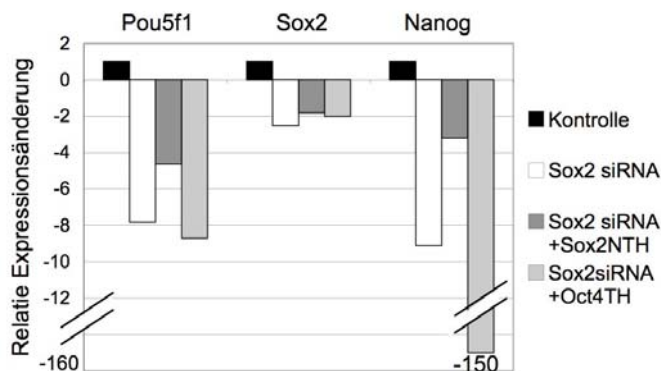


Abb. 3.32. Vergleich der Kompensation des siRNA *k.d.* von Sox2 durch Sox2NTH bzw. Oct4TH

Oct4 GIP ES-Zellen wurden wie in Abb. 3.29. gezeigt behandelt, die RNA isoliert und über qRT-PCR analysiert. Wie bereits in Abb 3.31 dargestellt, konnte die Reduktion in der Expression von *Pou5f1* und *Nanog* von Sox2NTH zum größten Teil kompensiert werden, aber nicht durch Oct4TH.

3.6 Untersuchung der Aktivität von TAT-fusioniertem Oct4 und Sox2 in somatischen Zellen

Die Transkriptionsfaktoren Oct4 und Sox2 werden normalerweise in embryonalen Zellen exprimiert. Jedoch wurde kürzlich entdeckt, dass eine Überexpression der beiden Faktoren über virale Transduktion zusammen mit den Onkogenen Klf4 und c-Myc in somatischen Zellen zu der Induktion von Pluripotenz dieser Zellen führt (Takahashi et al., 2006). Daher sollte die Aktivität von Oct4TH und Sox2NTH in somatischen Zellen charakterisiert werden.

3.6.1 Oct4TH und Sox2NTH haben einen wachstumsfördernden Effekt auf NIH 3T3 Zellen

Um den Einfluss der transduzierbaren Oct4 und Sox2 Proteine auf die Teilung somatischer Zellen zu untersuchen, wurde das Wachstum von NIH 3T3 Zellen unter dem Einfluss von Oct4TH und Sox2NTH beobachtet (Abb. 3.33). Dem Wachstumstest ist zu entnehmen, dass die Behandlung der Zellen mit Oct4TH zu einer Verdoppelung der Zellzahl führte; Sox2NTH bewirkte sogar eine Verdreifachung der Zellzahl. Diese Ergebnisse zeigen, dass die transduzierbaren Oct4- und Sox2- Proteine einen wachstumsfördernden Effekt auf 3T3 Zellen haben.

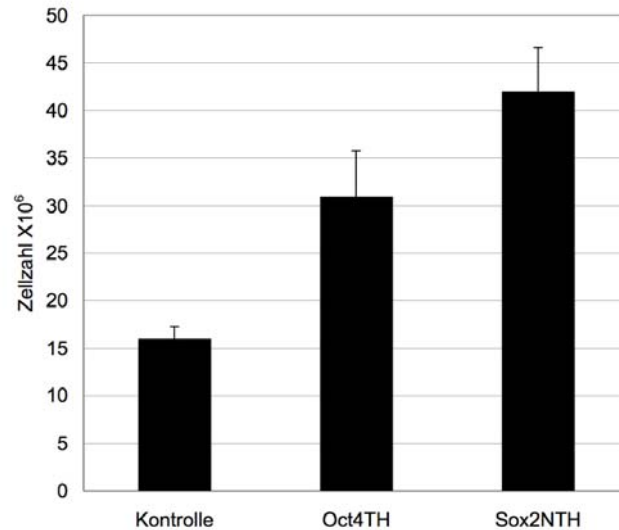


Abb. 3.33. Oct4TH und Sox2NTH haben einen wachstumsfördernden Effekt auf NIH 3T3 Zellen

5.10⁴ NIH 3T3 Zellen wurden pro 24-Well Vertiefung ausgesät und alle drei Tage vereinzelt und wieder ausgesät. Das Diagramm zeigt die kumulativen Zellzahlen nach 10 Tagen Kultur. Die Behandlung mit Oct4TH führte zu einer Verdoppelung der Zellzahl, mit Sox2NTH zu einer Verdreifachung. Der Versuch wurde im Triplikat durchgeführt, Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Proteinkonzentrationen 120 nM für Oct4TH und 300 nM für Sox2NTH, die Kontrollzellen wurden mit Transduktionsmedium behandelt.

3.6.2 Sox2NTH induziert Nanog Expression in Fibroblasten Zellen

Um den Effekt von Oct4TH und Sox2NTH auf somatische Zellen auf molekularer Ebene zu untersuchen wurden murine embryonale Fibroblasten (Passage 2) drei Tage mit Oct4TH, Sox2NTH und einer Kombination beider Proteine behandelt. Die mRNA wurde 48 und 72 h nach Beginn der Inkubation isoliert und die Expression verschiedener Pluripotenzmarker über RT-PCR untersucht (Abb. 3.34.A). Es konnte in drei unabhängigen Experimenten bestätigt werden, dass Sox2NTH nach dreitägiger Behandlung eine schwache, aber detektierbare *Nanog* Expression hervorrufen konnte. Dieses Ergebnis wurde durch eine quantitative RT-PCR verifiziert (Abb.3.34.B). Von *Pou5f1* war scheinbar eine gewisse Hintergrund-Expression vorhanden, während *Sox2* komplett negativ blieb. Bei der Behandlung mit Oct4TH einzeln oder die Kombination beider Faktoren wurden keine Veränderungen in der Expression der untersuchten Zielgene festgestellt.

Da die *Nanog*-Expression von Sox2 in Kombination mit Oct4 reguliert wird (Kuroda et al., 2005, Rodda et al., 2005) sollte des Weiteren untersucht werden, ob andere POU-Faktoren mit Sox2 interagiert haben könnten, um eine *Nanog*-Expression zu induzieren. Dafür käme z.B. Oct6 in Frage, wovon auch eine basale Expression in MEF-Zellen detektiert werden konnte. Außerdem wurde die Expression der Reprogrammierungsfaktoren c-Myc und Klf4

untersucht. *c-Myc* scheint relativ stark exprimiert zu sein, *Klf4* war dagegen nicht nachweisbar.

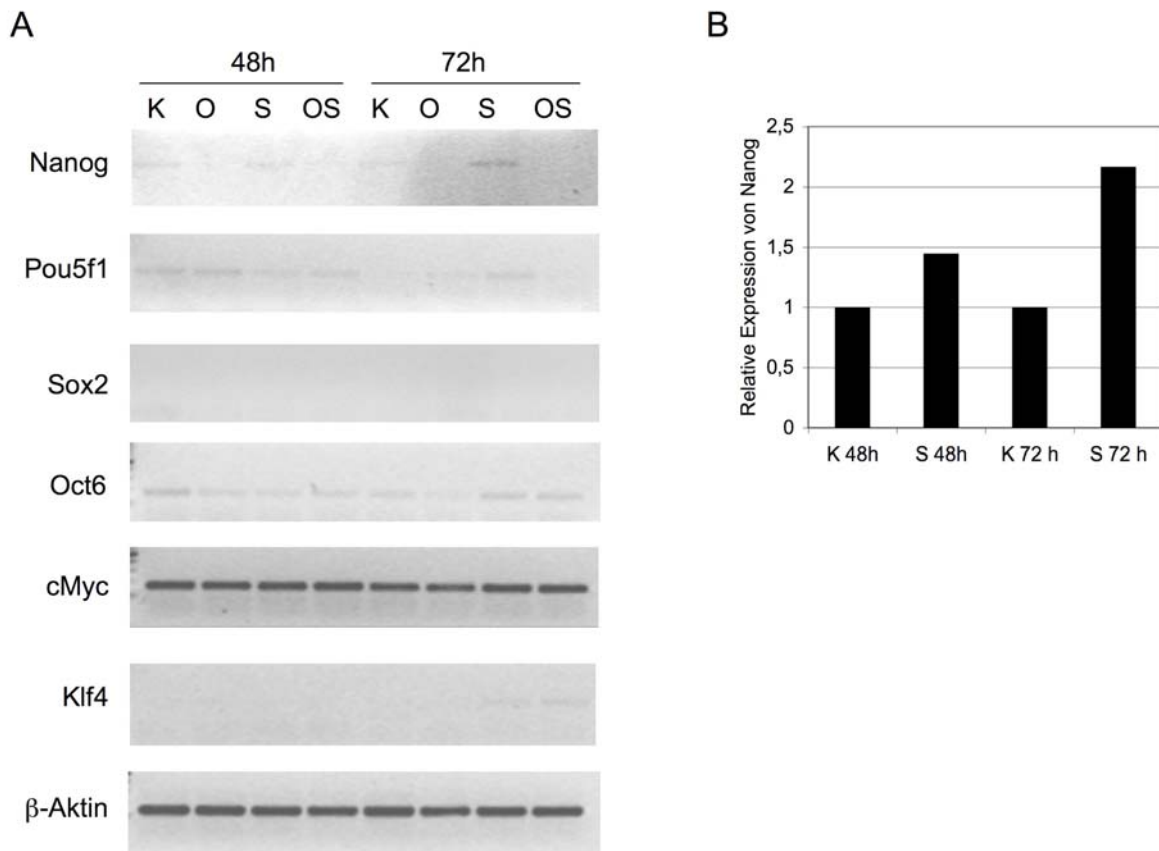


Abb. 3.34. Induktion der Nanog-Expression in somatischen Zellen durch Sox2NTH Behandlung

A. MEF-Zellen wurden drei Tage mit Kontrollmedium (K), Oct4TH (O), Sox2NTH (S) oder einer Kombination der beiden Faktoren (OS) behandelt. Die RNA wurde nach 48 und 72 h präpariert und mittels RT-PCR untersucht (35 Zyklen, außer *c-Myc* und β -Aktin 30 Zyklen). Proteinkonzentrationen: Oct4TH= 100 nM und Sox2NTH= 150 nM.

B. qRT-PCR von Nanog auf der Grundlage der Proben von A.

4 Diskussion

Zellpermeable Fusionsproteine stellen eine vielversprechende Strategie zur Untersuchung von zellulären Zusammenhängen ohne genetische Manipulation dar. In dieser Arbeit wurde Zellpermeable Versionen der Pluripotenzfaktoren Oct4 und Sox2 hergestellt. Viele Studien zeigen, dass die beiden Transkriptionsfaktoren zusammen mit Nanog eine zentrale Rolle in der Pluripotenzerhaltung von ES-Zell spielen (Nichols et al., 1998; Alvilion et al., 2003; Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Nach der Charakterisierung der hergestellten Faktoren, wurde die Möglichkeit der Modulation von Stammzeleigenschaften mit Hilfe der Transduzierbaren Faktoren untersucht. Durch *gain of function* und *loss of function* Studien wurden Implikationen für die Hierarchie der Pluripotenzfaktoren untereinander aufgestellt.

4.1 Herstellung der rekombinanten Faktoren Oct4 und Sox2

Bei der Herstellung möglicher transduzierbarer Proteine werden die Gensequenzen dieser Proteine typischerweise mit den entsprechenden DNA-Sequenzen funktionaler Peptide in verschiedenen Kombinationen fusioniert. Zu diesen funktionalen Peptidsequenzen gehört in erster Linie die Proteintransduktions-Domäne (PTD), in diesem Fall TAT-HIV, die sich schon mehrfach als effiziente Transduktionsdomäne erwiesen hat (Schwarze et al., 1999; Peitz et al., 2002). Des Weiteren kann in manchen Fällen ein Kernlokalisierungssignal (NLS) benötigt werden, falls kein endogenes Signal vorhanden ist. Für die Aufreinigung wird ein *His-Tag* benötigt. Die Anordnung der funktionalen Peptide spielt eine große Rolle in der Stabilität und Löslichkeit der resultierenden Proteine (Braun et al., 2002). Da es bisher noch kein rationales Design für transduzierbare Proteine gibt (Patsch & Edenhofer 2007), sind empirische Untersuchungen nötig, um die optimale Anordnung der einzelnen Domänen zu ermitteln. Zur Optimierung dieses Prozesses, wurde in dieser Arbeit das pSESAME Vektor System etabliert. Es ermöglicht durch seinen modularen Aufbau die einfache Klonierung verschiedener Konstrukt-Varianten, sowie den Wechsel von N- zu C-terminal fusionierten Domänen. Das pSESAME System diente als Basis für die Herstellung der rekombinanten Oct4- und Sox2-Fusionsproteine und wird mittlerweile als Standardplattform für die Generierung transduzierbarer Proteine in unserer Arbeitsgruppe genutzt. Das pSESAME-System wurde validiert, indem die Rekombinationsaktivität des pSESAME-basierten zellpermeablen Cre-Fusionsproteins mit der des bereits etablierten pTriEx-basierenden Konstrukt (Peitz et al., 2002; Nolden et al., 2006) verglichen, und als äquivalent befunden wurde (Herlofsen, 2007).

In dieser Arbeit sollten transduzierbare Versionen von Oct4 und Sox2 hergestellt und optimiert werden. Dafür wurde die Expression und Aufreinigung verschiedener Versionen untersucht. Die Überexpression von Oct4-Fusionsproteinen in *E. coli* war relativ schwach, obwohl ein optimierter BL21 Bakterienstamm benutzt wurde, der sich durch eine hohe Transformationseffizienz auszeichnet. Der größte Teil des exprimierten Proteins lag in Form von Einschlusskörpern (*Inclusion Bodies*) vor. Durch denaturierende Aufreinigung mit anschließender Renaturierung konnte zwar wesentlich reineres Protein gewonnen werden, dieses war aber in physiologischen Puffern nicht stabil. Möglicherweise war die Rückfaltung nicht abgeschlossen, so dass es bei vollständiger Entfernung des Rückfaltungspuffers durch Dialyse erneut zu einer fehlerhaften Interaktion der hydrophoben Flächen kam, wodurch die Proteine aggregierten und präzipitierten. Die Aufreinigung des N-terminal fusionierten HTNOct4 aus dem löslichen Teil des Zellysats führte nur zu einer geringen Ausbeute, welche unter physiologischen Pufferbedingungen ebenfalls instabil war. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Oct4-Fusionsprotein-Variante ohne exogenes NLS (HTOct4) eine bessere Löslichkeit aufwies, insbesondere unter physiologischen Bedingungen. Möglicherweise führten die positiv geladenen Aminosäuren des NLS-Peptids zur Destabilisierung des Proteins. Da Oct4 ein endogenes NLS enthält (Pan et al., 2004), sollte das Entfernen des exogenen NLS keinen Einfluss auf die Funktionalität haben. Die C-terminal fusionierte Variante Oct4TH weist eine höhere Reinheit und auch bessere Löslichkeit auf als das N-terminale Konstrukt, und wurde daher für die weiteren Versuche verwendet.

Wie im Fall von Oct4 war auch bei Sox2 die Expression zunächst gering und der größere Teil des exprimierten Proteins lag in unlöslicher Form in Einschlusskörpern vor. Die N-terminal fusionierte Variante HTNSox2 wies im Western Blot zusätzlich zu dem vollständig translatierten Protein mehrere kleinere Fragmente auf, die ebenfalls von dem α -His Antikörper erkannt wurden. Da der Einsatz von Protease-Inhibitoren diese Banden nicht verhindern konnte, handelt es sich hierbei wahrscheinlich um translationale Abbrüche. Diese sind meist die Folge des Auftretens von Kodons, die von *E. coli* selten genutzt werden und daher nur wenige Moleküle der entsprechende tRNA vorhanden sind (Chen et al., 1994). Bei der Überexpression eines rekombinanten Proteins, welches relativ viele seltene Kodons in der DNA-Sequenz enthält, kann es zu Engpässen während der Translation kommen. Dadurch können Abbrüche oder Leserasterverschiebungen auftreten, welche zu unvollständigen Proteinfragmenten führen. Dieses Problem konnte mit der Nutzung der C-terminal fusionierten Variante Sox2NTH behoben werden, wodurch nur noch vollständig translatierte

Proteine aufgereinigt wurden. Dennoch wäre eine Kodon-Optimierung sinnvoll, um die Ausbeute der Expression zu erhöhen. Dies könnte auch im Fall von Oct4 eine Verbesserung der Ausbeute bewirken.

Eine weitere Möglichkeit die Proteinausbeute zu erhöhen wäre eukaryotische Expressionssysteme zu benutzen, wie z.B. Hefe- oder Insekten-Zellen. Diese Systeme haben meistens den Vorteil einer zügigen und stabilen Induktion der Expression zu ermöglichen, entsprechende Chaperone exprimieren die eine korrekte Faltung der Proteine unterstützen und die Proteine mit authentischen posttranslationalen Modifikationen versehen.

Für die Anwendung der rekombinanten Proteine auf kultivierten Zellen, muss die Stabilität unter physiologischen Bedingungen gegeben sein. Die Stabilität der Proteine unter diesen Bedingungen wird von dem Serumanteil im Medium sehr stark beeinflusst, da das Serum die transduzierbaren Proteine zu stabilisieren scheint. Allerdings wurde festgestellt, dass Serum eine hemmende Wirkung auf die Proteintransduktion hat, wie anhand von Reporterzell-Versuchen mit der transduzierbaren Cre-Rekombinase gezeigt wurde (, 2007). Daher wurde für die Transduktion von Oct4 und Sox2 serumreduziertes „Advanced DMEM“-Medium mit 5 % FKS benutzt. Mit diesem Medium wurde bereits die Transduktion des Stammzellfaktors Nanog etabliert (, 2007). Da jedoch 5 % FKS nicht ausreichend war, um die Proteine zu stabilisieren, wurde zusätzlich Albumax eingesetzt. Es handelt sich dabei um ein optimiertes Serum für Medien mit niedrigem FKS-Gehalt. Es wird durch ein chromatographisches Verfahren aus bovinem Plasma aufgereinigt, bei dem Albumin-assoziierte Lipide erhalten bleiben und wahrscheinlich eine stabilisierende Wirkung auf die rekombinanten Proteine haben. 0,5 % Albumax zusätzlich zu 5 % FKS waren ausreichend, um die beiden Proteine über 24 Stunden zu stabilisieren.

Das Protein konnte in einem Glycerol-Stock über mehrere Wochen bei -20 °C gelagert werden, allerdings ist durch die Zusammensetzung der Stocklösung die maximale Konzentration im Medium limitiert, da der Puffer bei ES-Zellen nicht höher als mit einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt werden kann und für manche Zelltypen auf Dauer toxisch ist. Als Alternative kann das Protein direkt gegen das Medium dialysiert werden.

4.2 DNA-Bindungsfähigkeit der rekombinanten Oct4 und Sox2 Proteine

Um die DNA-Bindungsfähigkeit von Oct4TH und Sox2^{NTH} zu untersuchen, wurde ein EMSA durchgeführt, bei dem eine Octamer-Sox Konsensus Sequenz aus dem Nanog

Promotor als Probe benutzt wurde. Die Sequenz wurde von zwei Gruppen parallel als Bindungssequenz von Oct4 und Sox2 identifiziert (Kuroda et al., 2005, Rodda et al., 2005). Durch die Bindung von Oct4 und Sox2 an die Sequenz im Nanog Promotorbereich wird die Expression von Nanog reguliert. Im Fall von Oct4TH und Sox2NTH konnte mit jedem der rekombinanten Proteine die Ausbildung eines binären Protein/DNA Komplexes beobachtet werden. Die Komplexe konnten durch spezifische Antikörper gegen das jeweilige Protein identifiziert werden, was in einem *Supershift* resultierte. Die Spezifität der Antikörperbindung konnte durch das Ausbleiben einer Kreuzreaktion nachgewiesen werden. Bei der gleichzeitigen Inkubation beider Proteine mit der Zielsequenz konnte ein ternärer Oct4/Sox2/DNA-Komplex beobachtet werden. Der ternäre Komplex wurde von einem spezifischen Oct4 Antikörper erkannt, nicht aber von einem Sox2-Antikörper. Diese Beobachtungen sind übereinstimmend mit dem Verhalten der endogenen Proteine in den Studien von Kuroda et al. (2005) und Rodda et al. (2005), welche nukleäre Extrakte aus ES-Zellen bzw. embryonalen Karzinomzellen (EK-Zellen) einsetzten. In beiden Studien konnte die Bindung jedes Faktors (einzeln) an die Zielsequenz nachgewiesen werden, wobei die Sox2-Bindung – wie auch in der vorliegenden Arbeit – schwächer war, was sich durch ein geringeres Signal im Vergleich zu dem Signal der Oct4-Bindung äußerte. Der Grund dafür könnte die relativ schwache DNA-Affinität sein, welche die meisten Sox-Faktoren aufweisen. Im Vergleich zu anderen DNA-bindenden Proteinen haben Sox-Faktoren relativ hohe Dissoziationskonstanten (K_d); sie liegen *in vitro* bei 10^{-8} - 10^{-9} M für Sox-Faktoren im Vergleich zu ca. 10^{-11} M im Regelfall bei potenten Aktivatoren (Kamachi et al., 2000). Interessanterweise war die Erkennung des ternären Komplexes durch verschiedene Sox2-Antikörper bei Kuroda et al. (2005) im Fall der nukleären Extrakte aus ES-Zellen ebenfalls nicht gegeben. In EK-Zellen hingegen wurde der ternäre Komplex durch Sox2 und Oct4-Antikörper gleichermaßen erkannt. In der Studie wird diese Diskrepanz zwischen ES- und EK-Zellen durch die Postulation eines zusätzlichen Sox-Element-Bindungsproteins erklärt, welches in pluripotenten Zellen um die Bindung an den Nanog Promotor mit Sox2 kompetiert. Ein schwächerer *Supershift* des ternären Oct4/Sox2/DNA-Komplexes durch den Sox2 Antikörper wurde ebenfalls in einer weiteren Studie beobachtet, in der die Bindung von Oct4 und Sox2 aus ES-Zell Extrakten an ein Oct-Sox Element untersucht wurde (Chew et al., 2005). Hier wurde die Interferenz des Sox2 Antikörpers mit der Protein-DNA-Interaktion als Begründung angegeben. Eine weitere Erklärung für das auch in dieser Arbeit beschriebene Ausbleiben der Erkennung des ternären Komplexes durch einen Sox2-Antikörper könnte die Maskierung des Sox2-Epitops durch die Interaktion mit Oct4 sein.

Die Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit von Oct4TH und Sox2NTH zeigt, dass die rekombinanten Faktoren die DNA-Bindungsfähigkeit der entsprechenden endogenen Proteine widerspiegeln.

4.3 Detektion der zellulären Translokation der TAT-fusionierten Oct4 und Sox2

Um die zelluläre Aufnahmefähigkeit von Oct4TH und Sox2NTH zu untersuchen, wurden beide Proteine mit Rhodamin markiert, um dadurch den Weg der Proteine in die Zelle visualisieren zu können. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden an lebenden Zellen durchgeführt, da Fixierung zu einer artifiziellen Translokation in den Nukleus führen kann (Richard et al., 2003; Lundberg et al., 2002). Beide Proteine wurden hocheffizient von den Zellen aufgenommen und schon kurze Zeit nach Beginn der Transduktion in vesikulären Strukturen sichtbar. Sox2NTH wurde von 85 ± 5 % der Zellen aufgenommen, Oct4TH von 97 ± 1 %. Beide Proteine zeigten ein endosomales Aufnahmemuster, die proteinbeladenen Vesikel erschienen zuerst in der Peripherie und bewegten sich mit der Zeit Richtung Zellkern, wo sie perinukleär akkumulierten. Dies ist ein typisches Muster für Proteine dieser Größe (Wadia et al., 2004; Caron et al., 2004; Tünnemann et al., 2006). Die Visualisierung im Zellkern ist jedoch ein seltenes Ereignis, welches bei der transduzierbaren Rekombinase HTNCRE nicht detektierbar war, obwohl eine Rekombination nachgewiesen werden konnte (Tünnemann et al., 2006). Auch das TAT-lose Oct4 wurde von den Zellen aufgenommen, jedoch mit geringerer Effizienz; deutlich weniger endosomale Strukturen als bei Oct4TH wurden sichtbar. Die intrinsische Transduktionsfähigkeit mancher Proteine wurde bereits in der Literatur beschrieben, sie wird meist jedoch verstärkt durch die Fusion mit einer PTD (Peitz et al., 2002; Noguchi et al., 2003; Kwon et al., 2005). Das TAT-lose Sox2 zeigte nicht das vesikuläre Muster, sondern resultierte in unregelmäßigen Strukturen bei denen es sich wahrscheinlich um Aggregate handelte, die nicht in die Zelle aufgenommen wurden. Nicht auszuschließen ist, dass Verunreinigungen, die im Eluat vorhanden sind ebenfalls gelabelt wurden und in die Zellen translozierten. Durch die beobachteten Unterschiede im Transduktionsverhalten der Proteine mit und ohne TAT-Fusion, obwohl in beiden Fällen die Verunreinigungen vorhanden waren ist jedoch die Wahrscheinlichkeit relativ gering.

Die Freisetzung aus den Endosomen und Translokation in den Nukleus wird als „Flaschenhals“ der Methode angesehen (Caron et al., 2004, Wadia et al., 2004). Dennoch gelang es in dieser Arbeit, durch optische Schichtung des Zellkerns markiertes Protein im

Zellkern zu detektieren. Der Einsatz von Substanzen wie Chloroquin, welche die endosomale Freisetzung erhöhen, war im Fall der Anwendungen von Oct4 und Sox2 nicht möglich, da Chloroquin bei langfristiger Applikation toxisch ist und daher nur für kurzfristige Einsätze, wie bei transduzierbaren Rekombinasen, geeignet ist (Caron et al., 2004). TAT-HA, ein Peptid, das ebenfalls die Freisetzung der Proteine aus den Endosomen erhöht (Wadia et al., 2004), führte zur Präzipitation von Oct4 im Zellkulturmedium. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass geringe Konzentrationen von transduzierbarem HoxB4 (10-50 nM im Medium) einen signifikanten proliferativen Effekt auf hämatopoetische Stammzellen hat, folglich können auch geringe Mengen eines Proteins die den Zellkern erreichen, im Fall von Transkriptionsfaktoren ausreichend für einen Effekt sein (Krosl et al., 2003). Bei einer Konzentration von 100-150 nM von Oct4TH bzw. Sox2NTH und einer Transduktionseffizienz von 85-95% sollte die nukleäre Translokation der beiden Faktoren gewährleistet sein.

4.4 Pluripotenzerhaltung von ES-Zellen durch Oct4TH und Sox2NTH Applikation

Oct4 und Sox2 werden als Hauptbestandteile des regulatorischen Netzwerks der Pluripotenz angesehen (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006). Um die Möglichkeit zu untersuchen, dieses transkriptionale Netzwerk mit zellpermeablen Faktoren zu modulieren, wurden ES-Zellen 5 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen an transduzierbarem Oct4 und Sox2 inkubiert und die Auswirkung der Proteine auf Morphologie und alkalische Phosphatase-Aktivität untersucht. Die Inkubation mit den transduzierbaren Faktoren führte im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu einem Anstieg in der Anzahl der undifferenzierten Kolonien um 40 %-Punkte im Fall von Sox2NTH und um 50 %-Punkte im Fall von Oct4TH. Die Steigerung des Anteils an undifferenzierten Kolonien nahm bei der Erhöhung der Oct4- bzw. Sox2-Konzentration im Medium zu, was auf einen spezifischen, von den Proteinen hervorgerufenen Effekt hindeutet. Die Kombination beider transduzierbarer Faktoren führte ebenfalls zu einer Steigerung des Anteils undifferenzierter Kolonien. Bei niedrigen Konzentrationen war sogar ein additiver Effekt dahingehend zu erkennen, dass der Anteil undifferenzierter Kolonien bei einer Kombination beider Proteine größer ist als bei nur einem Protein mit der gleichen Konzentration. Eine Kombination beider Proteine in Maximalkonzentrationen war nicht möglich, da der resultierende hohe Pufferanteil einen toxischen Effekt auf die Zellen hat. Allerdings scheint die Proteinzugabe einen negativen Effekt auf die Koloniebildung zu haben, da bei den hohen Konzentrationen die Koloniezahl

reduziert war. Der Anteil der lebenden Zellen nach 5-tägiger Behandlung mit Protein zeigte jedoch keinen Unterschied zu unbehandelten Zellen. Möglicherweise haben Bestandteile des Proteinstocks einen negativen Effekt auf die Koloniebildung nicht aber auf die Vitalität der Zellen.

Auf transkriptioneller Ebene spiegelt sich die Potenz der beiden Faktoren zur Pluripotenzerhaltung beizutragen ebenfalls wider. Beide Faktoren führen in Anwesenheit von LIF zu einer Verdopplung der Transkriptmenge ihrer Zielgene *Pou5f1*, *Sox2* und *Nanog*. Die Menge an mRNA von *Pou5f1* wurde durch Oct4TH verdreifacht und in Kombination mit Sox2NTH sogar vervierfacht. Da Oct4 eine essentielle Rolle in der Pluripotenzerhaltung spielt (siehe Abschnitt 1.3) könnte diese Aktivierung der *Pou5f1*-Transkription zu dem erhöhten Anteil an undifferenzierten Zellen führen. Eine Ausnahme bildet der Einfluss von Sox2NTH auf die mRNA-Menge von *Sox2*, da es eine Reduktion der *Sox2*-Transkription bewirkt. Dies ist übereinstimmend mit den Ergebnissen von Boer et al. (2007), die eine ektopischen Überexpression von *Sox2* untersuchten und einen negative Rückkopplungs-Schleife identifizierten.

In Abwesenheit von LIF scheint die Transaktivierungskapazität der beiden Faktoren im Allgemeinen geringer zu sein, möglicherweise durch das Fehlen von Interaktionspartnern. Dies könnte der Grund für eine stärkere Transaktivierung der Zielgene *Sox2* und *Nanog* im Fall einer Doppelapplikation sein. Auffallend ist die starke Aktivierung der *Nanog*-Transkription durch Sox2NTH in Abwesenheit von LIF; diese Aktivierung wurde auch im Fall der Sox2NTH-Applikation auf MEF-Zellen beobachtet (siehe Abschnitt 4.6).

In einigen Studien wurde gezeigt, dass für den Erhalt der Pluripotenz nicht nur die Anwesenheit dieser Faktoren, sondern auch ihre Konzentration wichtig ist. So führt zum Beispiel eine Überexpression von *Pou5f1* auf über 50 % des normalen Expressionsniveaus in ES-Zellen zu einer Differenzierung in extraembryonales Endoderm und Mesoderm (Niwa et al., 2000). Außerdem wurde kürzlich berichtet, dass die Überexpression von *Sox2* in ES-Zellen und embryonalen Karzinomzellen auf das Doppelte der normalen Expression zur Reduktion der endogenen *Sox2* Expression und der einiger *Sox2*-Zielgene (*Pou5f1*, *Nanog*, *Fgf4* und *Utf1*) führt (Boer et al., 2007), sowie zur Differenzierung der Zellen in verschiedene Linien, darunter Neuroectoderm, Mesoderm und Trophektoderm (Kopp et al., 2008). Folglich ist die pluripotenzerhaltende Wirkung der Transkriptionsfaktoren Oct4 und Sox2 nur in einer gewissen Konzentrationsspanne gegeben.

Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit keine Differenzierung durch die Zugabe von Oct4TH und Sox2NTH bei den behandelten ES-Zellen hervorgerufen wurde, könnte daran

liegen, dass die intranukleär erreichte Konzentration der transduzierbaren Faktoren nicht der einer Überexpression entspricht und möglicherweise noch im Pluripotenz-erhaltenden Bereich liegt. Diese Annahme wird durch die Expression des Pluripotenzmarkers SSEA-1 in den mit Protein behandelten ES-Zellen gestützt. Eine Durchflusszytometrie-Analyse zeigte, dass unbehandelte ES-Zellen zu ca. 90 % SSEA-1 positiv sind. Dieser bereits sehr hohe Anteil an SSEA-1 positiven Zellen wurde durch die Behandlung mit den transduzierbaren Faktoren Oct4 und Sox2 auf ca. 93 % gesteigert.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Proteinbehandlung einen toxischen Effekt auf die behandelten Zellen hat. Es wurde eine Reduktion der Gesamt-Kolonieanzahl in den Protein-behandelten Ansätzen beobachtet. Der Anteil der lebenden Zellen unterschied sich jedoch nicht zwischen Protein-behandelten und Kontroll-Zellen nach 5-tägiger Inkubation und betrug in beiden Fällen 70-80 %. Demnach scheint die Proteinbehandlung einen negativen Effekt auf die Koloniebildung zu haben, aber nicht auf die Vitalität der bereits angewachsenen Zellen.

4.5 *Knock down*-Studien von Oct4 und Sox2 und die Auswirkung auf die autoregulatorischen Schleife

Die Regulation der Expression von *Pou5f1* und *Sox2* unterliegt der Kontrolle des Oct4-Sox2 Komplexes (Tomioka et al., 2002, Okumura-Nakanishi et al., 2005). Diese autoregulatorische Schleife trägt offensichtlich dazu bei, dass eine gleichmäßige Expressionsstärke der beiden Faktoren in pluripotenten Zellen erhalten bleibt.

Um einen tieferen Einblick in dieses regulatorische Netzwerk zu bekommen, wurden in dieser Arbeit *knock down* Versuche durchgeführt. Hierbei wurde die endogene Expression von *Pou5f1* oder *Sox2* reduziert, um die Auswirkung auf die Expression des jeweils anderen Faktors zu untersuchen. Außerdem wurde analysiert, ob die transduzierbaren Faktoren Oct4 und Sox2 eine Reduktion der endogenen Expression des jeweiligen endogenen Faktors kompensieren können.

Für den *knock down* wurden zwei unterschiedliche Ansätze durchgeführt: I) die Deletion von endogenem *Pou5f1* und II) die Reduktion der endogenen Expression von *Pou5f1* und *Sox2* durch RNA-Interferenz.

4.5.1 Genetische Deletion von *Pou5f1*

In der vorliegenden Arbeit wurde die ES-Zelllinie *Pou5f1 flox/flox* (Kehler et al., 2004) genutzt, um den *Pou5f1 knock out in situ* in ES-Zellen zu untersuchen ob Oct4TH in der Lage ist, einen Verlust des endogenem Oct4 auszugleichen. Die Deletion der *loxP*-flankierten Sequenzen erfolgte durch die Behandlung der Zellen mit transduzierbarer HTNCre Rekombinase (Peitz et al., 2007). Per Southern Blot konnte eine vollständige Deletion von *Pou5f1* konnte nachgewiesen werden. Die HTNCre Behandlung hatte einen starken toxischen Effekt, der sich in Wachstumsinhibition äußerte, da das Wachstum der parentalen Zelllinie nach der Behandlung mit HTNCre auf 10 % reduziert wurde. Bei der Behandlung der *Pou5f1 flox/flox* Zellline ES-Zellen mit HTNCre kam es zu einem Wachstumsstillstand, da keine Kolonien mehr nachweisbar waren. Die klassische, nicht-konditionale Deletion von *Pou5f1* wurde 1998 von Nichols et al. *in vivo* beschrieben. Sie führte zum Verlust der Pluripotenz der inneren Zellmasse (IZM) und der Differenzierung in die trophektodermale Zellen. *In vitro* konnten von Nichols et al. (1998) keine homozygot *Pou5f1* deletierten ES-Zellen isoliert werden, da dies anscheinend zu einem Verlust der Selbsterneuerung der Zellen führte. Für die Vitalität von Keimzellen *in vivo* scheint Oct4 ebenfalls essentiell zu sein (Kehler et al., 2004). Die Deletion führte zu Apoptose in diesen Zellen.

Die Zugabe von Oct4TH nach der Deletion des endogenen *Pou5f1* konnte keine Selbsterneuerung bewirken. Der Effekt des zellpermeablen Oct4 könnte durch den toxischen Effekt der HTNCre Transduktion maskiert worden sein. Möglicherweise war auch die Zeitspanne zwischen Abbau des endogenen Oct4 und der Zugabe des Oct4TH zu lang. Der Versuch diese Zeitspanne durch gleichzeitige Behandlung mit HTNCre und Oct4TH zu verkürzen, war nicht erfolgreich, da es zu starker Präzipitation der Proteine kam. Wahrscheinlich war die Gesamtproteinkonzentration zu hoch.

Das System erwies sich somit nicht als geeignet, um die Konzentration des endogenen Oct4 effizient und zuverlässig zu modulieren. Daher wurde die Methode der RNAi gewählt, in der die Expression des Zielgens abgeschwächt, aber nicht vollständig ausgeschaltet wird.

4.5.2 RNAi knock down von *Pou5f1* und *Sox2* und die Kompensation durch Proteintransduktion

Die post-transkriptionale Reduktion von Genaktivitäten mittels RNA-Interferenz (RNAi) wurde in den letzten Jahren als robuste Methode zur Manipulation der Genexpression und der Untersuchung von Genfunktionen etabliert (Hannon et al., 2002; Elbashir et al., 2001).

In dieser Arbeit wurde die direkte Transfektion von doppelsträngigen RNA Sequenzen, bestehend aus 20 Basenpaaren gewählt, auch short interfering RNA (siRNA) genannt, um die Expression von *Pou5f1* und *Sox2* abzuschwächen. Die benutzten Sequenzen waren veröffentlicht und bereits auf ihre Effizienz und Spezifität hin untersucht worden (Hey et al., 2004 für *Pou5f1*; Ivanova et al., 2006 für *Sox2*).

Der *knock down* von *Pou5f1* und *Sox2* konnte erfolgreich durchgeführt werden und wurde über RT-PCR-Analyse auf mRNA-Ebene nachgewiesen, hierbei wurde die *Pou5f1* Expression auf 10 % und die *Sox2* Expression auf 30 % reduziert. Western Blot Analysen zeigten, dass Oct4 und Sox2 für mindestens drei Tage nach Beginn der Transfektion auf ca. 30 % des Expressionsniveaus in Kontrollzellen reduziert wurde.

Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass 48 Stunden nach Beginn eines *Sox2 knock downs* in ES-Zellen ca. 50 % der Kolonien Sox2-negativ waren, dies korreliert mit einer Reduktion des Oct4-Signals. Bei einem *Pou5f1 k.d.* waren nach 48 Stunden 80 % der Kolonien Oct4 negativ, die Sox2 Expression wurde in diesem Fall jedoch kaum beeinflusst. Obwohl Chew et al. (2005) zufolge die Expression von *Pou5f1* und *Sox2* reziprok über einen Oct4-Sox2 Komplex reguliert wird, könnte der beobachtete Effekt damit erklärt werden, dass Sox2 in der regulatorischen Hierarchie Oct4 übergeordnet ist, und dadurch nur indirekt von einem *Pou5f1 knock down* beeinflusst wird, was zu einer zeitlich verzögerten Reduktion von Sox2 führt. Diese mögliche Erklärung wird auch von Studien durch Masui et al (2007) bestätigt.

Um den kompensatorischen Effekt zu untersuchen, den die transduzierbaren Faktoren Oct4 und Sox2 bei dem *knock down* des jeweiligen endogenen Faktors ausüben könnten, wurden ES-Zellen 24 Stunden mit siRNA behandelt, so dass das Abschalten des Zielgens bereits stattgefunden und die darauf folgende Differenzierung begonnen hatte. Zu diesem Zeitpunkt wurde das korrespondierende transduzierbare Protein dazugegeben, und der Ansatz für weitere 24 Stunden inkubiert.

Morphologisch führte ein *Pou5f1 knock down* zu einer starken Reduktion von Größe und Anzahl der Kolonien, sowie zu vielen abgelösten Kolonien, was auf Verlust der Selbsterneuerungskapazität und Zelltod hindeutet, wie auch im Fall der Cre-vermittelten

Deletion von *Pou5f1*. Die Zugabe von transduzierbarem Oct4 konnte die Selbsterneuerung signifikant erhöhen, da die Kolonien größer und gleichmäßiger waren und es zu einer Verdoppelung der Koloniezahl kam. Beim *Sox2 knock down* kam es zusätzlich zur Reduktion der Zellzahl zur morphologischen Differenzierung in epitheliale Zellen, wie auch bei Chew et al. (2005) beschrieben. Die Transduktion von Sox2NTH konnte den Zelltod zwar nur minimal verringern, aber die Differenzierung der Kolonien erheblich reduzieren.

Zu dem selben Zeitpunkt wurde die RNA präpariert und die Auswirkung des *knock downs* und der Proteintransduktion auf die Expression der Bestandteile des regulatorischen Netzwerks der Pluripotenz untersucht, nämlich *Pou5f1*, *Sox2* und *Nanog*, da diese Faktoren auch Zielgene von Oct4 und Sox2 sind (Boyer et al., 2005; Okumura-Nakanishi et al., 2005; Tomioka et al., 2002; Kuroda et al., 2005; Rodda et al., 2005; Loh et al., 2006). Quantitative RT-PCR Analysen ergaben, dass durch die Transfektion der siRNA gegen *Pou5f1* das Expressionsniveau von *Pou5f1* 40-fach reduziert wurde. Durch die Zugabe von Oct4TH konnte der *knock down* um 60 % kompensiert werden, was die Aktivierungskapazität von Oct4TH demonstriert. Die Expression von *Sox2* und *Nanog* blieb zu diesem Zeitpunkt unbeeinträchtigt von dem *Pou5f1 knock down*, was ebenfalls durch eine langsamere Kinetik der Herabregulation begründet werden könnte. Dies war auch bei einer *Pou5f1* Deletion der Fall, durchgeführt von Niwa et al. (2000). Hier wurde gezeigt, dass 48 Stunden nach Beginn der *Pou5f1* Deletion die Expression von *Sox2* mRNA kaum beeinträchtigt war, erst nach 72 Stunden ließ die Intensität nach.

Beim *Sox2 knock down* war *Sox2* nur 2-fach reduziert, während der Einfluss auf die Zielgene *Pou5f1* und *Nanog* stärker war. Nach 48 Stunden war das Expressionsniveau fast 10-fach abgeschwächt, was auch mit anderen *knock down* Studien zu *Sox2* übereinstimmt, in welchen ebenfalls die Repression der Zielgene relativ prompt erfolgte und durchaus auch stärker war als die Reduktion der *Sox2*-Expression an sich (Chew et al., 2005; Masui et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte der *knock down* von *Sox2* durch die Behandlung mit Sox2NTH zu 30-60 % verhindert werden. Diese Kompensationseffekte sind ein weiterer deutlicher Hinweis auf die Transaktivierungskapazität von Sox2NTH.

Der Versuch den *Sox2 knock down* durch Zell-permeables Oct4 zu kompensieren schlug fehl. Dies deutet auf einen spezifischen Effekt von Sox2NTH in der Kompensation des *Sox2 knock downs* hin. Außerdem zeigt dieser Versuch, dass *Sox2* nicht durch Oct4 zu ersetzen ist.

Kürzlich wurde von Masui et al. (2007) publiziert, dass in einem konditionalen *Sox2 knock out* eine Kompensation durch eine transgene Oct4 Expression möglich ist. Allerdings ist es schwierig die beiden Systeme miteinander zu vergleichen, da es sich bei Masui et al. um ein

doppel-transgenes Zellsystem handelt, zum ist *Sox2* deletiert und zum anderen Oct4 über ein Transgen überexprimiert. Das Ergebnis von Masui et al. (2007) konnte in der vorliegenden Arbeit nicht verifiziert werden.

4.6 Effekt von Oct4TH und Sox2NTH in somatischen Zellen

Nachdem die Transaktivierungskapazität von Oct4TH und Sox2NTH in ES-Zellen untersucht worden war, sollte geprüft werden, ob die Transaktivierung durch die transduzierbaren Faktoren auch in somatischen Zellen möglich ist. Wie bereits in der Einleitung erläutert, zeigen die Expressionsmuster von Oct4 und Sox2 eine deutliche Beschränkung auf pluripotente Zellen bzw. im Fall von Sox2 zusätzlich neurale Vorläuferzellen. Daher wird eine Aktivität in differenzierten Zellen nicht erwartet. Da jedoch die beiden Faktoren in Kombination mit Klf4 und c-Myc in der Lage sind, Pluripotenz in somatischen Zellen zu induzieren (Takahashi et al., 2006; Okita et al., 2007; Maherali et al., 2007; Wernig et al., 2007), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die transduzierbaren Oct4- und Sox2-Proteine einen transaktivierenden Effekt in somatischen Zellen ausüben können.

Ein Wachstumstest mit NIH 3T3 Zellen zeigte, dass die Proteinbehandlung keinen toxischen Effekt auf das Wachstum der Zellen hatte. Die Faktoren hatten sogar einen wachstumsfördernden Effekt auf die Zellen.

Das Transaktivierungspotential der transduzierbaren Faktoren Oct4 und Sox2 in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF-Zellen) wurde auf Zielgenebene untersucht. Es konnte zwar keine Induktion Expression von *Pou5f1* oder *Sox2* beobachtet werden, allerdings wurde eine schwache Aktivierung der *Nanog* Expression beobachtet, die durch die Applikation von Sox2NTH hervorgerufen wurde und mit der Zeit zunahm. Die Aktivierung der *Nanog* Expression durch Sox2NTH konnte auch in ES-Zellen bei LIF-Entzug beobachtet werden.

Da Sox2 einen Interaktionspartner benötigt, um *Nanog* Expression zu aktivieren, im Normalfall Oct4 (Kuroda et al., 2005; Rodda et al., 2005), wurde untersucht, ob andere mögliche Interaktionspartner exprimiert werden. Tatsächlich wurde eine relativ schwache, aber detektierbare Expression von Oct6 beobachtet.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Sox- und Oct-Faktoren in unterschiedlichen Kombinationen interagieren können, um Zielgene zu aktivieren (Reményi et al., 2004). Eine Interaktion von Sox2 und Oct6 konnte bereits an der regulatorischen Region SRR2 innerhalb des *Sox2* Promotors identifiziert werden (Tomioka et al., 2002). In ES-Zellen wird Oct6 nicht exprimiert, dort werden die regulatorischen Sequenzen im *Sox2*-Promotor SRR1 und SRR2

von Oct4 und Sox2 gebunden und dadurch *Sox2*-Expression aktiviert. Es konnte allerdings durch EMSA und Reporterversuche gezeigt werden, dass Oct6 und Oct4 gleichermaßen an SRR2 binden und dadurch die Expression von *Sox2* aktivieren können (Tomioka et al., 2002). Es wäre denkbar, dass Sox2 bei einer Bindung an den *Nanog*-Promotor in der Lage ist, Oct6 zu rekrutieren und dadurch die Expression von *Nanog* in MEF-Zellen zu aktivieren. Um dies nachzuweisen, müssten genauere Untersuchungen durchgeführt werden, wie z.B. Promotor-Bindungs-Studien und Reportergerätsversuche. Im Falle der Doppelinkubation von Sox2^{NTH} und Oct4TH wurde keine *Nanog* Expression induziert. Möglicherweise war in diesem Fall die Sox2 Konzentration nicht ausreichend, da hier nur die halbmaximale Menge eingesetzt werden konnte, um den toxischen Effekt des Puffers zu umgehen.

Die intrinsische Expression der beiden Reprogrammierungsfaktoren *c-Myc* und *Klf4* in MEF-Zellen wurde ebenfalls untersucht. *c-Myc* Expression konnte detektiert werden, aber keine *Klf4* Expression. Die Rolle von *c-Myc* bei der Reprogrammierung wird auf die Chromatin-Remodellierungs-Aktivität des Faktors zurückgeführt (Welstead et al., 2008). Es ist möglich, dass die *c-Myc* ebenfalls zu der durch Sox2^{NTH} induzierten *Nanog* Expression auf diese Weise beigetragen hat beigetragen hat.

4.7 Ausblick

In dieser Arbeit konnten wurden Zell-permeable Versionen der Transkriptionsfaktoren Oct4 und Sox2 hergestellt werden. Sie konnten für die Modulation von Stammzeleigenschaften eingesetzt werden. Um die Ausbeute des löslichen Proteins bei der Expression zu erhöhen, könnte es von Vorteil sein langfristig auf eukaryotische Expressionssysteme umzusteigen, um die Faltung der exprimierten Proteine zu verbessern.

Eine Möglichkeit die Effizienz der Transduktion zu erhöhen wäre die zytosolische Freisetzung der endosomal aufgenommenen Proteine zu verstärken, oder die Proteinaufnahme über alternative Wege zu induzieren, z.B. mit der Nutzung von negativ geladenen Gegenionen mit hoher Hydrophobizität, wie z.B. Pyrenbutyrat, die ein zytosolische Translokation von TAT-Fusionsproteinen ermöglichen (Takeuchi et al., 2006). Allerdings müsste ein Protokoll etabliert werden, bei dem die Zytotoxizität von Pyrenbutyrat möglichst gering gehalten wird.

Eine praktische Anwendung für das transduzierbare Oct4 wäre die Verbesserung der Effizienz des nukleären Transfers. Boiani et al. (2002) zeigten, dass nach dem Transfer eines somatischen Zellkerns in eine Oozyte (SCNT = *somatic cell nuclear transfer*) die

Überlebenswahrscheinlichkeit des Klons mit dem Oct4-Gehalt der Zellen sinkt. Wahrscheinlich ist aberrante Oct4-Expression assoziiert mit Expressionsstörungen von anderen essentiellen Entwicklungsfaktoren. Die Behandlung der Oozyte mit transduzierbarem Oct4 vor und nach dem nukleären Transfer könnte durch einen erhöhten intrazellulären Anteil an Oct4 zu einer erfolgreichen Weiterentwicklung zur Morula beitragen.

Oct4 und Sox2 sind neben ihrer Funktion als Pluripotenzfaktoren in undifferenzierten Zellen auch Induktoren von Pluripotenz in differenzierten Zellen. Dafür wurden sie bisher über virale Transduktion gemeinsam mit den Faktoren Klf4 und c-Myc (Takahashi et al., 2006; Okita et al., 2007; Maherali et al., 2007; Wernig et al., 2007; Takahashi et al., 2007; Park et al., 2008), oder auch in Kombination mit Nanog und Lin28 (Yu et al., 2007) in die Zielzellen eingeführt. Um die reprogrammierten Zellen klinisch nutzen zu können, ist es essentiell eine Alternative zur integrierenden Viren zu finden, da diese zu insertionaler Mutagenese führen könnten. Kürzlich gelang es Stadtfeld et al. (2008) murine Zibroblasten mit nicht-integrierenden Adenoviren zu reprogrammieren. Dadurch wurde bestätigt, dass die virale Integration nicht notwendig ist um eine Reprogrammierung zu erreichen. Somit könnte die Proteintransduktion tatsächlich eine Alternative für die virale Transduktion darstellen. Ein erster Schritt in diese Richtung wäre, bei der Reprogrammierung einzelne Viren durch einen der etablierten transduzierbaren Faktoren Oct4 oder Sox2 zu ersetzen. Unklar ist dabei, ob die intranukleär erreichte Konzentration ausreichend für die Reprogrammierung sein wird. Im positiven Fall könnte versucht werden weitere Viren durch transduzierbare Proteine oder *small molecules* zu ersetzen, um eine Virus-freie Reprogrammierung zu erreichen.

In einem Ansatz von Kim et al. (2008) konnte die Anzahl der benötigten Reprogrammierungsfaktoren bereits auf zwei reduziert werden. Dabei wurden neurale Stammzellen (NS-Zellen) mit Oct4 und Klf4 reprogrammiert. NS-Zellen weisen eine intrinsische Sox2 Expression auf, die doppelt so hoch ist wie in ES-Zellen, und eine c-Myc Expression die vergleichbar mit ES-Zellen ist.

Demnach stellen neurale Stammzellen einen besonders geeigneten Kandidaten für einen Substitutionsversuch des Oct4-Virus durch transduzierbares Protein, da es sich auf eine minimale Anzahl an Faktoren beschränkt. Entsprechende Experimente werden derzeit in der Arbeitsgruppe durchgeführt.

5 Zusammenfassung

Die Transkriptionsfaktoren Oct4 und Sox2 sind zwei Hauptregulatoren der Pluripotenz embryonaler Stammzellen (ES-Zellen), deren Interaktion weitere Pluripotenz-erhaltende Faktoren aktiviert bzw. Differenzierungsfaktoren reprimiert. Um die Modulation von Stammzeleigenschaften ohne genetische Modifikation zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit Zell-permeable Varianten der beiden Faktoren hergestellt. Durch die Fusion mit einer Proteintransduktionsdomäne wurde der direkte Transfer der Proteine in die Zielzellen ermöglicht. Um die optimale Anordnung der Fusionsdomänen zu ermitteln, wurde ein modulares Expressions-Vektorsystem (pSESAME) etabliert. Mit diesem System können die Transduktions- und Aufreinigungspeptide wahlweise N- oder C-terminal an das Genprodukt des Zielgens fusioniert werden, je nach Einfluss auf die Löslichkeit und Stabilität des Produkts.

Mit Hilfe des pSESAME Vektorsystems wurden transduzierbare Varianten von Oct4 (Oct4TH) und Sox2 (Sox2NTH) rekombinant hergestellt. Beide Fusionsproteine spiegeln die Eigenschaften der endogenen Faktoren in der DNA-Bindung an eine spezifische Zielsequenz wieder. Durch die Markierung des rekombinanten Oct4 bzw. Sox2 mit Rhodamin konnte die Aufnahme der Proteine in die Zelle visualisiert werden. Eine optische Sektion der Zellen ermöglichte darüber hinaus die Detektion der markierten Proteine im Zellkern.

Die Anwendung der Zell-permeablen Faktoren auf ES-Zellen führte zu einem erhöhten Anteil an undifferenzierten Zellen, was durch die zusätzliche Aktivierung einiger Pluripotenzfaktoren zu erklären ist.

Ein RNAi-vermittelter *knock down* von *Oct4* in ES-Zellen führte zum Verlust der Selbsterneuerung. Ein *Sox2-knock down* resultierte außerdem in epithelialer Differenzierung der Zellen. Der Phänotyp des *knock down* konnte in beiden Fällen mit dem entsprechenden transduzierbaren Faktor partiell kompensiert werden.

Da Oct4 und Sox2 zusammen mit Klf4 und c-Myc im Stande sind, Pluripotenz in adulten Zellen zu induzieren, wurde der Einfluss von Oct4 und Sox2 auf Maus-Fibroblasten untersucht. Bei der Applikation von transduzierbarem Sox2 wurde die Aktivierung der Expression eines weiteren Pluripotenzfaktors, *Nanog*, beobachtet.

6 Literaturverzeichnis

- Alon, U. (2007). Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat Rev Genet* 8, 450-461.
- Ambrosetti, D.C., Basilico, C., and Dailey, L. (1997). Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Molecular and cellular biology* 17, 6321-6329.
- Astriab-Fisher, A., Sergueev, D., Fisher, M., Shaw, B.R., and Juliano, R.L. (2002). Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions. *Pharm Res* 19, 744-754.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development* 17, 126-140.
- Belting, M., Persson, S., and Fransson, L.A. (1999). Proteoglycan involvement in polyamine uptake. *Biochem J* 338 (Pt 2), 317-323.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.
- Boer, B., Kopp, J., Mallanna, S., Desler, M., Chakravarthy, H., Wilder, P.J., Bernadt, C., and Rizzino, A. (2007). Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2:Oct-3/4 target genes. *Nucleic acids research* 35, 1773-1786.
- Boeuf, H., Hauss, C., Graeve, F.D., Baran, N., and Kedinger, C. (1997). Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J Cell Biol* 138, 1207-1217.
- Boiani, M., Eckardt, S., Scholer, H.R., and McLaughlin, K.J. (2002). Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes & development* 16, 1209-1219.
- Bosnali, M., and Edenhofer, F. (2008). Generation of transducible versions of transcription factors Oct4 and Sox2. *Biol Chem* 389, 851-861.

- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., *et al.* (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956.
- Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., *et al.* (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349-353.
- Braun, P., Hu, Y., Shen, B., Halleck, A., Koundinya, M., Harlow, E., and LaBaer, J. (2002). Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2654-2659.
- Brustle, O., Jones, K.N., Learish, R.D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O.D., Duncan, I.D., and McKay, R.D. (1999). Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science (New York, N.Y)* 285, 754-756.
- Brustle, O., Spiro, A.C., Karram, K., Choudhary, K., Okabe, S., and McKay, R.D. (1997). In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14809-14814.
- Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., and Smith, A. (1999). Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 210, 30-43.
- Caron, N.J., Quenneville, S.P., and Tremblay, J.P. (2004). Endosome disruption enhances the functional nuclear delivery of Tat-fusion proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 12-20.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-655.
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., and Rossant, J. (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev Cell* 10, 615-624.
- Chen, G.T., and Inouye, M. (1994). Role of the AGA/AGG codons, the rarest codons in global gene expression in *Escherichia coli*. *Genes & development* 8, 2641-2652.
- Chew, J.L., Loh, Y.H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W.L., Yeap, L.S., Li, P., Ang, Y.S., Lim, B., Robson, P., and Ng, H.H. (2005). Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* 25, 6031-6046.

- Chung, F.Z., Wu, L.H., Lee, H.T., Mueller, W.T., Spahr, M.A., Eaton, S.R., Tian, Y., Settini, P.D., Oxender, D.L., and Ramharack, R. (1998). Bacterial expression and characterization of human recombinant apolipoprotein(a) kringle IV type 9. *Protein Expr Purif* 13, 222-228.
- Conti, L., Pollard, S.M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q.L., Cattaneo, E., and Smith, A. (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* 3, e283.
- Cui, L., Johkura, K., Yue, F., Ogiwara, N., Okouchi, Y., Asanuma, K., and Sasaki, K. (2004). Spatial distribution and initial changes of SSEA-1 and other cell adhesion-related molecules on mouse embryonic stem cells before and during differentiation. *J Histochem Cytochem* 52, 1447-1457.
- Dailey, L., and Basilico, C. (2001). Coevolution of HMG domains and homeodomains and the generation of transcriptional regulation by Sox/POU complexes. *Journal of cellular physiology* 186, 315-328.
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *The Journal of biological chemistry* 269, 10444-10450.
- Dostmann, W.R., Taylor, M.S., Nickl, C.K., Brayden, J.E., Frank, R., and Tegge, W.J. (2000). Highly specific, membrane-permeant peptide blockers of cGMP-dependent protein kinase I α inhibit NO-induced cerebral dilation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14772-14777.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elliott, G., and O'Hare, P. (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88, 223-233.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Ferri, A.L., Cavallaro, M., Braidà, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P.P., Sala, M., DeBiasi, S., and Nicolis, S.K. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development (Cambridge, England)* 131, 3805-3819.

- Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppe, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F., and Giacca, M. (2003). Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *The Journal of biological chemistry* 278, 34141-34149.
- Fong, H., Hohenstein, K.A., and Donovan, P.J. (2008). Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem cells* 26, 1931-1938.
- Frankel, A.D., and Pabo, C.O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189-1193.
- Gidekel, S., Pizov, G., Bergman, Y., and Pikarsky, E. (2003). Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* 4, 361-370.
- Glover, D.J., Lipps, H.J., and Jans, D.A. (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet* 6, 299-310.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., and Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39, 749-765.
- Green, M., and Loewenstein, P.M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55, 1179-1188.
- Grosschedl, R., Giese, K., and Pagel, J. (1994). HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet* 10, 94-100.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88.
- Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature* 418, 244-251.
- Haupt, S., Edenhofer, F., Peitz, M., Leinhaas, A., and Brustle, O. (2007). Stage-specific conditional mutagenesis in mouse embryonic stem cell-derived neural cells and postmitotic neurons by direct delivery of biologically active Cre recombinase. *Stem cells* 25, 181-188.
- Hay, D.C., Sutherland, L., Clark, J., and Burdon, T. (2004). Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem cells* 22, 225-235.
- Herlofsen, S. (2007). Etablierung eines Systems zum direkten Transfer der Reprogrammierungsfaktoren c-Myc und Klf4 in Fibroblasten. (Diplomarbeit, Universität Bonn)
- Herr, W., and Cleary, M.A. (1995). The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes & development* 9, 1679-1693.

- Hochedlinger, K., Yamada, Y., Beard, C., and Jaenisch, R. (2005). Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* *121*, 465-477.
- Houbaviy, H.B., Murray, M.F., and Sharp, P.A. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* *5*, 351-358.
- Hough, S.R., Clements, I., Welch, P.J., and Wiederholt, K.A. (2006). Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of OCT4 and Nanog. *Stem cells* *24*, 1467-1475.
- Hwang, S., Tamilarasu, N., Kibler, K., Cao, H., Ali, A., Ping, Y.H., Jeang, K.T., and Rana, T.M. (2003). Discovery of a small molecule Tat-trans-activation-responsive RNA antagonist that potently inhibits human immunodeficiency virus-1 replication. *The Journal of biological chemistry* *278*, 39092-39103.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* *96*, 23-28.
- Ivanova, N., Dobrin, R., Lu, R., Kotenko, I., Levorse, J., DeCoste, C., Schafer, X., Lun, Y., and Lemischka, I.R. (2006). Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* *442*, 533-538.
- Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* *120*, 635-647.
- Joliot, A., and Prochiantz, A. (2004). Transduction peptides: from technology to physiology. *Nature cell biology* *6*, 189-196.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., and Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* *16*, 182-187.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M., and Rajewsky, K. (2005). Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes & development* *19*, 489-501.
- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomeli, H., Nagy, A., McLaughlin, K.J., Scholer, H.R., and Tomilin, A. (2004). Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep* *5*, 1078-1083.
- Kellendonk, C., Tronche, F., Monaghan, A.P., Angrand, P.O., Stewart, F., and Schutz, G. (1996). Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic acids research* *24*, 1404-1411.

- Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Arauzo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M., and Scholer, H.R. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* *454*, 646-650.
- Kloosterman, W.P., and Plasterk, R.H. (2006). The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* *11*, 441-450.
- Kopp, J.L., Ormsbee, B.D., Desler, M., and Rizzino, A. (2008). Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem cells* (Dayton, Ohio) *26*, 903-911.
- Krosl, J., Austin, P., Beslu, N., Kroon, E., Humphries, R.K., and Sauvageau, G. (2003). In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med* *9*, 1428-1432.
- Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S.Y., Suemori, H., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2005). Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Molecular and cellular biology* *25*, 2475-2485.
- Kwon, Y.D., Oh, S.K., Kim, H.S., Ku, S.Y., Kim, S.H., Choi, Y.M., and Moon, S.Y. (2005). Cellular manipulation of human embryonic stem cells by TAT-PDX1 protein transduction. *Mol Ther* *12*, 28-32.
- Laflamme, M.A., Chen, K.Y., Naumova, A.V., Muskheli, V., Fugate, J.A., Dupras, S.K., Reinecke, H., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., *et al.* (2007). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature biotechnology* *25*, 1015-1024.
- Landry, J.R., Kinston, S., Knezevic, K., de Bruijn, M.F., Wilson, N., Nottingham, W.T., Peitz, M., Edenhofer, F., Pimanda, J.E., Ottersbach, K., and Gottgens, B. (2008). Runx genes are direct targets of Scl/Tal1 in the yolk sac and fetal liver. *Blood* *111*, 3005-3014.
- Lee, Y.S., and Dutta, A. (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes & development* *21*, 1025-1030.
- Li, J., Pan, G., Cui, K., Liu, Y., Xu, S., and Pei, D. (2007a). A dominant-negative form of mouse SOX2 induces trophectoderm differentiation and progressive polyploidy in mouse embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry* *282*, 19481-19492.
- Li, T., Steinbeck, J.A., Lusardi, T., Koch, P., Lan, J.Q., Wilz, A., Segschneider, M., Simon, R.P., Brustle, O., and Boison, D. (2007b). Suppression of kindling epileptogenesis by adenosine releasing stem cell-derived brain implants. *Brain* *130*, 1276-1288.

- Liang, J., Wan, M., Zhang, Y., Gu, P., Xin, H., Jung, S.Y., Qin, J., Wong, J., Cooney, A.J., Liu, D., and Songyang, Z. (2008). Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nature cell biology* *10*, 731-739.
- Liu, Y., Jones, M., Hingtgen, C.M., Bu, G., Laribee, N., Tanzi, R.E., Moir, R.D., Nath, A., and He, J.J. (2000). Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat Med* *6*, 1380-1387.
- Loh, Y.H., Wu, Q., Chew, J.L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., *et al.* (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature genetics* *38*, 431-440.
- Loh, Y.H., Zhang, W., Chen, X., George, J., and Ng, H.H. (2007). Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes & development* *21*, 2545-2557.
- Looijenga, L.H., Stoop, H., de Leeuw, H.P., de Gouveia Brazao, C.A., Gillis, A.J., van Roozendaal, K.E., van Zoelen, E.J., Weber, R.F., Wolffenbuttel, K.P., van Dekken, H., *et al.* (2003). POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* *63*, 2244-2250.
- Lord, J.M., and Roberts, L.M. (1998). Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. *J Cell Biol* *140*, 733-736.
- Lowry, W.E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A.D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A.T., and Plath, K. (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 2883-2888.
- Lundberg, M., and Johansson, M. (2001). Is VP22 nuclear homing an artifact? *Nature biotechnology* *19*, 713-714.
- Ma, Y., Certel, K., Gao, Y., Niemitz, E., Mosher, J., Mukherjee, A., Mutsuddi, M., Huseinovic, N., Crews, S.T., Johnson, W.A., and Nambu, J.R. (2000). Functional interactions between *Drosophila* bHLH/PAS, Sox, and POU transcription factors regulate CNS midline expression of the slit gene. *J Neurosci* *20*, 4596-4605.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., *et al.* (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* *1*, 55-70.

- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 7634-7638.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., *et al.* (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature cell biology* 9, 625-635.
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., and Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 18, 4261-4269.
- Mayr, C., Hemann, M.T., and Bartel, D.P. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science (New York, N.Y)* 315, 1576-1579.
- Mineno, J., Okamoto, S., Ando, T., Sato, M., Chono, H., Izu, H., Takayama, M., Asada, K., Mirochnitchenko, O., Inouye, M., and Kato, I. (2006). The expression profile of microRNAs in mouse embryos. *Nucleic acids research* 34, 1765-1771.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-642.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.
- Murchison, E.P., Partridge, J.F., Tam, O.H., Cheloufi, S., and Hannon, G.J. (2005). Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 12135-12140.
- Nagahara, H., Vocero-Akbani, A.M., Snyder, E.L., Ho, A., Latham, D.G., Lissy, N.A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S.A., and Dowdy, S.F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med* 4, 1449-1452.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology* 26, 101-106.
- Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., Yagi, K., Miyazaki, J., Matoba, R., Ko, M.S., and Niwa, H. (2006). Klf4 cooperates with Oct3/4

- and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* 26, 7772-7782.
- Narita, M., Bu, G., Olins, G.M., Higuchi, D.A., Herz, J., Broze, G.J., Jr., and Schwartz, A.L. (1995). Two receptor systems are involved in the plasma clearance of tissue factor pathway inhibitor in vivo. *The Journal of biological chemistry* 270, 24800-24804.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-391.
- Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A., and Muramatsu, M. (1999). The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Molecular and cellular biology* 19, 5453-5465.
- Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development (Cambridge, England)* 134, 635-646.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & development* 12, 2048-2060.
- Niwa, H., Masui, S., Chambers, I., Smith, A.G., and Miyazaki, J. (2002). Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* 22, 1526-1536.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics* 24, 372-376.
- Noguchi, H., Kaneto, H., Weir, G.C., and Bonner-Weir, S. (2003). PDX-1 protein containing its own antennapedia-like protein transduction domain can transduce pancreatic duct and islet cells. *Diabetes* 52, 1732-1737.
- Nolden, L., Edenhofer, F., Haupt, S., Koch, P., Wunderlich, F.T., Siemen, H., and Brustle, O. (2006). Site-specific recombination in human embryonic stem cells induced by cell-permeant Cre recombinase. *Nat Methods* 3, 461-467.
- Odom, D.T., Dowell, R.D., Jacobsen, E.S., Nekludova, L., Rolfe, P.A., Danford, T.W., Gifford, D.K., Fraenkel, E., Bell, G.I., and Young, R.A. (2006). Core transcriptional regulatory circuitry in human hepatocytes. *Mol Syst Biol* 2, 2006 0017.

- Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., and Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60, 461-472.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.
- Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H., and Ishikawa, F. (2005). Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 5307-5317.
- Palmieri, S.L., Peter, W., Hess, H., and Scholer, H.R. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol* 166, 259-267.
- Pan, G., Li, J., Zhou, Y., Zheng, H., and Pei, D. (2006). A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *FASEB J* 20, 1730-1732.
- Pan, G., Qin, B., Liu, N., Scholer, H.R., and Pei, D. (2004). Identification of a nuclear localization signal in OCT4 and generation of a dominant negative mutant by its ablation. *The Journal of biological chemistry* 279, 37013-37020.
- Patsch, C., and Edenhofer, F. (2007). Conditional mutagenesis by cell-permeable proteins: potential, limitations and prospects. *Handb Exp Pharmacol*, 203-232.
- Pease, S., Braghetta, P., Gearing, D., Grail, D., and Williams, R.L. (1990). Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol* 141, 344-352.
- Peitz, M. (2007). Untersuchungen zur Cre-Proteintransduktion in murine embryonale Stammzellen und Etablierung einer membranpermeablen Variante des Homeobox-Proteins Nanog zur Modulation von Stammzeleigenschaften. (Doktorarbeit, Universität Bonn).
- Peitz, M., Jager, R., Patsch, C., Jager, A., Egert, A., Schorle, H., and Edenhofer, F. (2007). Enhanced purification of cell-permeant Cre and germline transmission after transduction into mouse embryonic stem cells. *Genesis* 45, 508-517.
- Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K., and Edenhofer, F. (2002). Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4489-4494.

- Pera, M.F., and Trounson, A.O. (2004). Human embryonic stem cells: prospects for development. *Development (Cambridge, England)* *131*, 5515-5525.
- Piskounova, E., Viswanathan, S.R., Janas, M., LaPierre, R.J., Daley, G.Q., Sliz, P., and Gregory, R.I. (2008). Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28. *The Journal of biological chemistry* *283*, 21310-21314.
- Remenyi, A., Lins, K., Nissen, L.J., Reinbold, R., Scholer, H.R., and Wilmanns, M. (2003). Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes & development* *17*, 2048-2059.
- Remenyi, A., Scholer, H.R., and Wilmanns, M. (2004). Combinatorial control of gene expression. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 812-815.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature biotechnology* *18*, 399-404.
- Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V., and Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *The Journal of biological chemistry* *278*, 585-590.
- Park, I.H., Lerou, P.H., Zhao, R., Huo, H., and Daley, G.Q. (2008). Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* *3*, 1180-1186.
- Rodda, D.J., Chew, J.L., Lim, L.H., Loh, Y.H., Wang, B., Ng, H.H., and Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *The Journal of biological chemistry* *280*, 24731-24737.
- Rosner, M.H., Vigano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W., and Staudt, L.M. (1990). A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* *345*, 686-692.
- Rubin, L.L. (2008). Stem cells and drug discovery: the beginning of a new era? *Cell* *132*, 549-552.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y)* *239*, 487-491.
- Sampson, V.B., Rong, N.H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N.J., Dunn, S.P., and Krueger, L.J. (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res* *67*, 9762-9770.

- Sandvig, K., and van Deurs, B. (2002). Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett* 529, 49-53.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Scholer, H.R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., and Gruss, P. (1990). New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344, 435-439.
- Sharp, P.A., Sugden, B., and Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12, 3055-3063.
- Singh, S.K., Kagalwala, M.N., Parker-Thornburg, J., Adams, H., and Majumder, S. (2008). REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 453, 223-227.
- Smith, A.G. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual review of cell and developmental biology* 17, 435-462.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690.
- Snyder, E.L., and Dowdy, S.F. (2005). Recent advances in the use of protein transduction domains for the delivery of peptides, proteins and nucleic acids in vivo. *Expert Opin Drug Deliv* 2, 43-51.
- Soriano, N.S., and Russell, S. (1998). The *Drosophila* SOX-domain protein Dichaete is required for the development of the central nervous system midline. *Development (Cambridge, England)* 125, 3989-3996.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science (New York, N.Y.)*
- Suh, M.R., Lee, Y., Kim, J.Y., Kim, S.K., Moon, S.H., Lee, J.Y., Cha, K.Y., Chung, H.M., Yoon, H.S., Moon, S.Y., *et al.* (2004). Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* 270, 488-498.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.

- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663-676.
- Takeuchi, T., Kosuge, M., Tadokoro, A., Sugiura, Y., Nishi, M., Kawata, M., Sakai, N., Matile, S., and Futaki, S. (2006). Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate. *ACS Chem Biol* *1*, 299-303.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y)* *282*, 1145-1147.
- Tokuzawa, Y., Kaiho, E., Maruyama, M., Takahashi, K., Mitsui, K., Maeda, M., Niwa, H., and Yamanaka, S. (2003). Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Molecular and cellular biology* *23*, 2699-2708.
- Tomilin, A., Remenyi, A., Lins, K., Bak, H., Leidel, S., Vriend, G., Wilmanns, M., and Scholer, H.R. (2000). Synergism with the coactivator OBF-1 (OCA-B, BOB-1) is mediated by a specific POU dimer configuration. *Cell* *103*, 853-864.
- Tomioka, M., Nishimoto, M., Miyagi, S., Katayanagi, T., Fukui, N., Niwa, H., Muramatsu, M., and Okuda, A. (2002). Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic acids research* *30*, 3202-3213.
- Torchilin, V.P., Rammohan, R., Weissig, V., and Levchenko, T.S. (2001). TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 8786-8791.
- Tunnemann, G., Martin, R.M., Haupt, S., Patsch, C., Edenhofer, F., and Cardoso, M.C. (2006). Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *Faseb J* *20*, 1775-1784.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P., and Sharp, P.A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & development* *13*, 3191-3197.
- Uchikawa, M., Kamachi, Y., and Kondoh, H. (1999). Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mech Dev* *84*, 103-120.
- Uwanogho, D., Rex, M., Cartwright, E.J., Pearl, G., Healy, C., Scotting, P.J., and Sharpe, P.T. (1995). Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech Dev* *49*, 23-36.

- Vernallis, A.B., Hudson, K.R., and Heath, J.K. (1997). An antagonist for the leukemia inhibitory factor receptor inhibits leukemia inhibitory factor, cardiotrophin-1, ciliary neurotrophic factor, and oncostatin M. *The Journal of biological chemistry* 272, 26947-26952.
- Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., and Gregory, R.I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science (New York, N.Y)* 320, 97-100.
- Wadia, J.S., Stan, R.V., and Dowdy, S.F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* 10, 310-315.
- Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., and Blelloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature genetics* 39, 380-385.
- Wegner, M. (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic acids research* 27, 1409-1420.
- Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P., and Jaenisch, R. (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2, 10-12.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.
- Wood, H.B., and Episkopou, V. (1999). Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mech Dev* 86, 197-201.
- Yeom, Y.I., Fuhrmann, G., Ovitt, C.E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hubner, K., and Scholer, H.R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development (Cambridge, England)* 122, 881-894.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P., and Smith, A.G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-548.

- Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519-523.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y)* 318, 1917-1920.
- Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., and Dailey, L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes & development* 9, 2635-2645.
- Yun, C.O., Shin, H.C., Kim, T.D., Yoon, W.H., Kang, Y.A., Kwon, H.S., Kim, S.K., and Kim, J.S. (2008). Transduction of artificial transcriptional regulatory proteins into human cells. *Nucleic acids research* 36, e103.
- Zappone, M.V., Galli, R., Catena, R., Meani, N., De Biasi, S., Mattei, E., Tiveron, C., Vescovi, A.L., Lovell-Badge, R., Ottolenghi, S., and Nicolis, S.K. (2000). Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. *Development (Cambridge, England)* 127, 2367-2382.

7 Eigene Publikationen

Bosnali, M., and Edenhofer, F. (2008). Generation of transducible versions of transcription factors Oct4 and Sox2. *Biol Chem* 389, 851-861.

Bosnali, M., Münt, B., Edenhofer, F. Deciphering the stem cell machinery - Multiple layers of pluripotency control. CMLS. Review. (*In preparation*)

8 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir persönlich, selbständig und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Die Daten, die im Rahmen einer Kooperation gewonnen wurden, sind ausnahmslos gekennzeichnet. Die vorliegende Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht. Ich habe früher noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Bonn, Oktober 2008

Manal Bosnali