

**Untersuchungen zur Cre-Proteintransduktion in murine  
embryonale Stammzellen und  
Etablierung einer membranpermeablen Variante des Homeobox-  
Proteins Nanog zur Modulation von Stammzeleigenschaften**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Michael Peitz

aus

Schmallenberg-Arpe

Bonn, Juli 2007

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2008

## Abkürzungen

<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>β-Gal</b>	Beta-Galaktosidase
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>CV1-5B</b>	Transgene Zell-Linie Klon 5B aus Fibroblasten der grünen Meerkatze
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>dNTP</b>	Desoxynukleotidtriphosphat
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ES-Zelle</b>	Embryonale Stammzelle
<b>FACS</b>	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
<b>FKS</b>	Fötale Kälber-Serum
<b>g</b>	Gramm
<b>g</b>	Gravitationskonstante
<b>h</b>	Stunde
<b>HEPES</b>	N-2 Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
<b>kb</b>	Kilobasen
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>l</b>	Liter
<b>LB</b>	Luria Bertani Medium
<b>LIF</b>	Leukemia Inhibitory Factor
<b>M</b>	Mol pro Liter
<b>MEF</b>	murine embryonale Fibroblasten
<b>mg</b>	Miligramm
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Mililiter
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MPW</b>	Milipore-Wasser (entionisiertes Wasser)
<b>MWCO</b>	Molecular weight cut-off
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>Ni-NTA</b>	Nickel-nitrilotriacetic acid
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NLS</b>	Kernlokalisierungssignal

---

<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PJ</b>	Propidium-Jodid
<b>RT</b>	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkription
<b>SDS</b>	Natrium-Dodecylsulfat
<b>s</b>	Sekunde
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>Vol</b>	Volumen
<b>X-Gal</b>	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -Galaktopyranosid

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 Embryonale Stammzellen und Pluripotenz	8
1.2. Extrinsische Faktoren zum Pluripotenzerhalt	9
1.3 Intrinsische Pluripotenzfaktoren	12
1.3.1 Oct4	12
1.3.2 Sox2	13
1.3.3 Nanog	13
1.4 Protein-Transduktion	15
1.4.1 Protein-Transduktionsdomänen	16
1.4.2 Mechanismus der PTD-vermittelten Protein-Transduktion	17
1.4.3 Anwendung der Protein-Transduktion bei der Cre Rekombinase	19
1.5 Ziele der Arbeit	20
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1 Verwendete Chemikalien, Geräte und biologisches Material	22
2.1.1 Chemikalien	22
2.1.2 Geräte	22
2.1.3 Enzyme	24
2.1.4 Antikörper	24
2.1.5 Bakterienstämme	25
2.1.6 Zelllinien	26
2.2 Molekularbiologie	27
2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA	27
2.2.2 Elektrophorese im Agarosegel	27
2.2.3 Quantifizierung von DNA	28
2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten	28
2.2.4 DNA-Sequenzierung	28
2.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford	29
2.2.6 SDS-PAA-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung	29
2.2.7 Western-Blot	31
2.2.8 RT-PCR	33
2.2.9 Durchflusszytometrie	34
2.2.10 Southern-Blot	34
2.2.11 Klonierung der Expressionsplasmide	36

---

2.3 Präparation rekombinanter Proteine	39
2.3.1 Proteinexpression	39
2.3.2 Native Affinitäts-Chromatografie von HTNCre	39
2.3.3 Native Affinitäts-Chromatografie von HTNFlpe	40
2.3.4 Native Affinitäts-Chromatografie von Nanog-Proteinen	42
2.3.5 Überführung von HTNCre in Glyzerinpuffer	42
2.3.6 Überführung von HTNFlpe in stabilisierenden Puffer	43
2.3.7 Herstellung des Nanog-TAT Transduktionsmediums	44
2.3.8 Herstellung des LIF-Inhibitors	45
2.3.9 Herstellung und Ansetzen von dTAT-HA2	46
2.4 Immunhistochemie und Färbungen	46
2.4.1 Immunhistochemie	46
2.4.2 X-Gal-Färbung	47
2.5 Zellkultur	47
2.5.1 Fibroblasten	47
2.5.2 Murine embryonalen Stammzellen	47
2.5.3 Humane embryonalen Stammzellen	48
2.5.4 Embryoidkörper und Teratombildung und Blastozysten-Injektion	49
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
3.1 Genetische Manipulation mit transduzierbarer Cre Rekombinase	50
3.1.1 Verbesserte Präparation des transduzierbaren Cre Proteins	50
3.1.2 Charakterisierung der Cre-Protein-Transduktion mit Cre-Reporterfibroblasten	52
3.1.3 Zusätzliche Proline an der TAT-PTD erhöhen Transduktionseffizienz	53
3.1.4 Steigerung der Transduktions-Effizienz mit dem fusogenen Peptid dTAT-HA2	54
3.1.5 Stabilität von HNTCre in der Zelle	55
3.1.6 Transduktion von Cre Protein in murine embryonale Stammzellen	56
3.1.7 Cre-Transduktion unter Erhalt der Proliferation und chromosomaler Stabilität	58
3.1.8 Erhalt der Pluripotenz von ES-Zellen nach Cre-Transduktion	61
3.1.9 Herstellung eines serumreduzierten ES-Zellmediums	61
3.1.10 Gesteigerte Transduktionseffizienz in serumreduziertem ES-Zellmedium	63
3.2 Etablierung eines transduzierbaren Nanog Proteins	64
3.2.1 TAT-Nanog mit N-terminalem H6-tag zeigt geringe Löslichkeit und Reinheit	64
3.2.2 Optimierung TAT-fusionierten Nanog-Proteins	65
3.2.3 Eigenschaften von Nanog-TAT unter Zellkulturbedingungen	66

3.3 Biologische Aktivität von Nanog-TAT	68
3.3.1 Aktivitätstest des LIF-Inhibitors hLIF-05	68
3.3.2 Differenzierungs-Inhibition muriner ES-Zellen durch Nanog-TAT	69
3.3.3 Proliferation LIF-entzogener ES-Zellen in Anwesenheit von Nanog-TAT	73
3.3.4 Durchflusszytometrische Analyse Nanog-TAT-behandelter Oct4-GiP ES-Zellen	74
3.3.5 Immunhistochemische Marker-Analyse	75
3.3.6 <i>In vitro</i> -Differenzierung Nanog-TAT-behandelter ES-Zellen	75
3.3.7 Differenzierungspotential <i>in vivo</i>	76
3.3.8 Synergismus von Nanog-TAT und LIF	78
3.3.9 Aktivität von Nanog-TAT ist unabhängig vom JAK/Stat3 Signalweg	80
3.3.10 Inhibition der endodermalen Differenzierung durch Nanog-TAT	81
3.3.11 Nanog-TAT reduziert die Differenzierung humaner ES-Zellen	82
3.3.12 Versuch zur Löslichkeitsverbesserung von TAT-fusioniertem Nanog	84
3.4 Herstellung einer transduzierbaren Flpe-Rekombinase	86
3.4.1 Präparation und Charakterisierung transduzierbarer Flp Rekombinase	86
3.4.2 Flpe-Transduktion in murine ES-Zellen	87
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>89</b>
4.1 Optimierung der Transduktions-Effizienz	89
4.2 Protein-Transduktion in embryonale Stammzellen	90
4.3 Herstellung eines transduzierbaren Nanog-Proteins	92
4.4 Optimierung des ES-Zellmediums für die Nanog-Transduktion	95
4.5 Veränderte Morphologie und Proliferation von ES-Zellen durch Nanog-TAT	96
4.6 LIF-unabhängiger Erhalt der Pluripotenz	98
4.7 Nanog-TAT-vermittelte Inhibition endodermaler Differenzierung unabhängig vom JAK/Stat3 Signalweg	100
4.8 Nanog-Transduktion in humane ES-Zellen	101
4.9 Ausblick	102
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>104</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
<b>7 Eigene Publikationen .....</b>	<b>118</b>
<b>8 Danksagung .....</b>	<b>120</b>
<b>9 Erklärung.....</b>	<b>121</b>

# 1 Einleitung

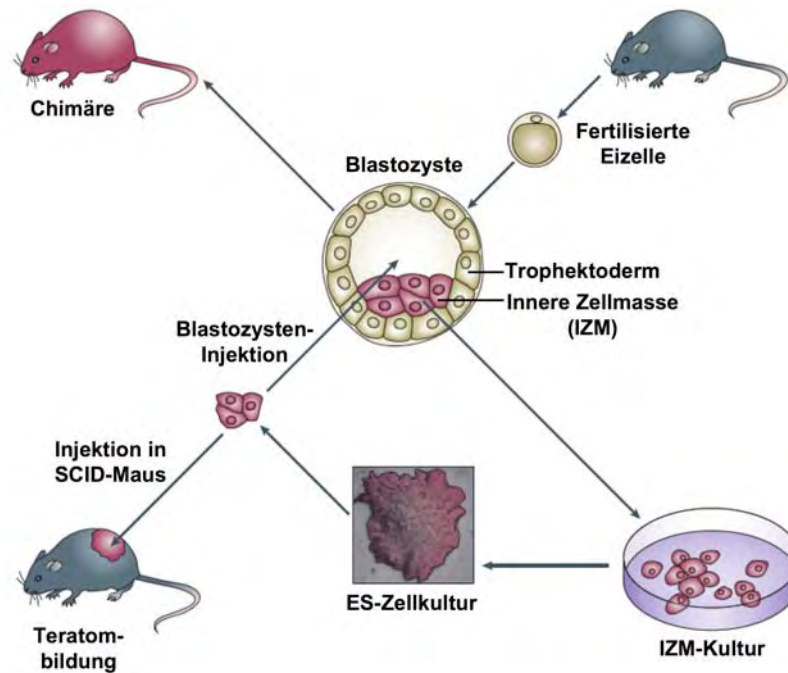
## 1.1 Embryonale Stammzellen und Pluripotenz

Stammzellen haben im Gegensatz zu differenzierten Zellen das Potenzial zur Selbsterneuerung und können in einen oder mehrere Zelltypen differenzieren. Im Organismus findet man in einigen Organen wie z. B. dem Blut, der Haut oder dem Gehirn sogenannte multipotente Stammzellen, d. h. aus diesen Zellen können sich verschiedene Zelltypen des entsprechenden Keimblatts entwickeln. Das Vermögen, keimblattübergreifend in alle Zelltypen des Organismus differenzieren zu können, wird als Pluripotenz definiert. Kommt die Fähigkeit hinzu, durch Selbst-Organisation einen ganzen Organismus ausbilden zu können, spricht man von Totipotenz (Solter 2006).

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) lassen sich aus der pluripotenten inneren Zellmasse der Blastozyste ableiten (Abb. 1). Zum ersten Mal ist dies 1981 bei der Maus (Evans und Kaufman, 1981; Martin 1981) und 1998 beim Menschen (Thomson et al., 1998) gelungen. Die innere Zellmasse differenziert in der embryonalen Entwicklung in zwei unterschiedliche Zell-Linien. Zum einen in das extraembryonale Endoderm, welches sich weiter zu extraembryonalen Geweben entwickelt; zum anderen in den Epiblast, welcher das primitive Ektoderm ausbildet, woraus schließlich der Embryo entsteht. Das primitive Ektoderm hat eine epitheliale Morphologie (Gardner & Rossant, 1979) und bereits an Entwicklungspotenzial verloren, da sich diese Zellen u. a. nicht mehr in extraembryonale Linien entwickeln können. Man spricht hier von „eingeschränkter“ Pluripotenz (Niwa 2007).

Die Regulation des Pluripotenzerhalts in ES-Zellen erfolgt über vernetzte Faktoren und Signalwege, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können: extrinsische und intrinsische Faktoren (Abb. 2). Extrinsische Faktoren sind meist Zytokine und Hormone. Die Gruppe der intrinsischen Faktoren beinhaltet hauptsächlich Transkriptionsfaktoren. In diesem Zusammenhang spielen auch epigenetische Faktoren eine wichtige Rolle, z. B. Chromatin-assoziierte Moleküle wie die *Polycomb group* Repressor-Proteine (Boyer et al., 2006; Lee et al., 2006) und die Modifizierung von DNA bzw. Histonen durch Methylierung bzw. Azetylierung.



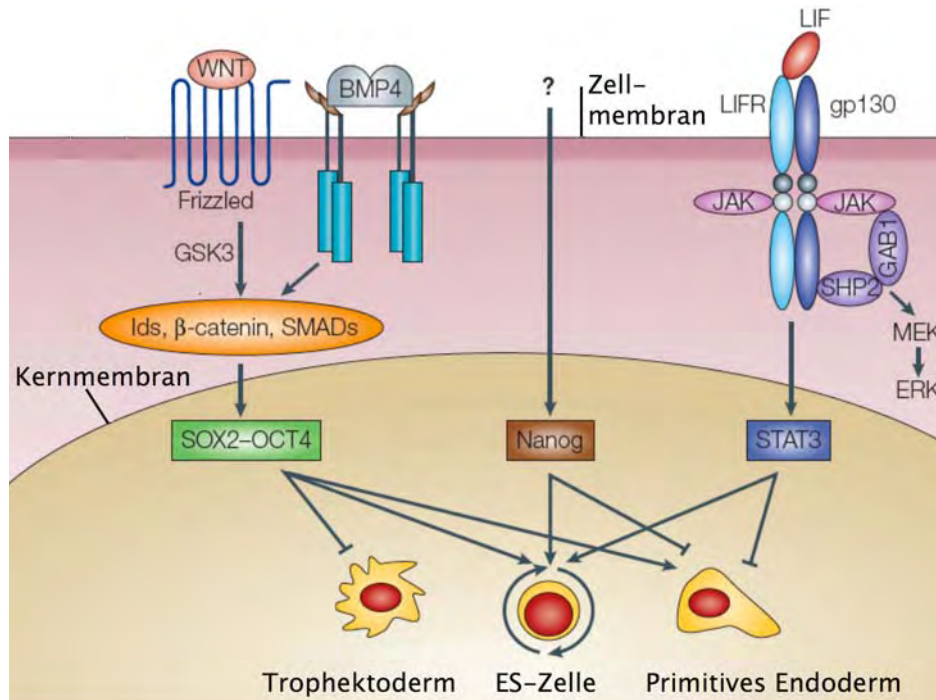


**Abb. 1: Herstellung von ES-Zellen und Überprüfung der Pluripotenz.**

Nach einigen Teilungsrunden entwickelt sich aus der fertilisierten Eizelle die Blastozyste. Diese besteht aus dem Trophektoderm und der inneren Zellmasse (IZM). Ersteres entwickelt sich weiter in extra-embryonales Gewebe wie die Plazenta und letzteres in alle Zellen des Embryos. Werden die Zellen der IZM unter geeigneten Bedingungen kultiviert, z. B. mit LIF (murine ES-Zellen) oder mit Fütterzellen (murine und humane ES-Zellen), können sie sich kontinuierlich selbst erneuern. Diese aus der IZM abgeleiteten Zelllinien werden als ES-Zellen bezeichnet. Die Pluripotenz kann bei murinen ES-Zellen über die Injektion in eine Blastozyste gezeigt werden. Es bildet sich eine chimäre Maus, in welche sich die injizierten Zellen integrieren und zu sämtlichen Zelllinien des Körpers differenzieren, einschließlich der Keimzellen. Für humane ES-Zellen kommt diese Methode aus ethischen und rechtlichen Gründen nicht in Frage. Stattdessen wird anhand der Entstehung von Teratomen in immundefizienten Mäusen die Bildung verschiedener Gewebe aus den drei Keimblättern nachgewiesen. Adaptiert von Nishikawa et al. (2007)

## 1.2. Extrinsische Faktoren zum Pluripotenzerhalt

Zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz von ES Zellen in der Zellkultur sind verschiedene extrinsische Faktoren erforderlich. Ursprünglich wurden murine ES-Zellen auf einer Lage von murinen embryonalen „Fütterzellen“ (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) kultiviert. Diese Zellen konditionieren das Medium mit löslichen Faktoren und versorgen die ES-Zellen so mit den nötigen Stimulanzien. Vor fast 20 Jahren wurde dann LIF (*leukemia inhibitory factor*) als wichtigster der extrinsischen Faktoren identifiziert (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Für viele ES-Zelllinien ist bei entsprechender LIF-Stimulation keine Ko-Kultur mit Fütterzellen notwendig. So wurden z. B. die ersten genetischen Veränderungen die über die Keimbahn weitergegeben wurden, mit MEF-frei kultivierten ES-Zellen durchgeführt (Hooper et al., 1987; Thompson et al., 1989). LIF ist ein Mitglied der IL6 Zytokin-Familie und bindet direkt an den LIF-Rezeptor (LIFR), welcher daraufhin mit seiner zytoplasmatischen Domäne



**Abb. 2: Zusammenhang zwischen extrinsischen und intrinsischen Pluripotenz-Regulatoren**

Membranständige Rezeptoren geben Signale von extrinsischen Faktoren wie LIF und BMP4 weiter an die intrinsischen Faktoren Stat3, Oct4, Sox2 und Nanog. Ob Nanog auch direkt durch einen extrinsischen Stimulus reguliert wird, ist derzeit noch unklar. Die Bindung von LIF an den LIF-Rezeptor (LIFR) führt zu einer Trimerisierung mit Glycoprotein-130 (gp130). So kann die Nicht-Rezeptor Janus Tyrosin Kinase (JAK) rekrutiert werden, die zusammen mit der Antiphospho-Tyrosin Immunreaktive Kinase (TIK) den zytoplasmatischen Teil von LIFR/gp130 phosphoryliert. Die phosphorylierten Stellen dienen wiederum als Andockstellen für Proteine mit SH2-Domänen, darunter auch Stat3, welches phosphoryliert wird und als Dimer in den Kern gelangt. Im Zellkern verursachen Stat3, Oct4, Sox2 und Nanog Änderungen in der Genexpression, die zu einem ES-Zell-Phänotyp führen.

GAB1, *GRB2-associated binding protein-1*; GSK3, *glycogen synthase kinase-3*; Id, *inhibitor of differentiation*, JAK, Janus Kinase; MEK, *mitogen-activated protein kinase (MAPK) and extracellular signal regulated kinase (ERK) protein kinase*; SMAD, *similar to mothers against decapentaplegic homologue*; SHP2, *SH2-domain-containing protein tyrosine phosphate-2*; WNT, *wingless type protein*.

Adaptiert von Boiani und Schöler (2005)

den Transmembran-Rezeptor gp130 rekrutiert, um einen trimeren Komplex zu bilden. Danach erfolgt die Phosphorylierung, Dimerisierung und Kerntranslokation von Stat3 (*signal transducer and activator of transcription*). Es ließ sich zeigen, dass allein die Aktivierung von Stat3 ausreichend ist, um die Selbsterneuerung von ES-Zellen aufrecht zu erhalten (Matsuda et al., 1999).

Weitere wichtige extrinsische Faktoren sind BMP4 bzw. BMP2 (*bone morphogenetic proteins*) und das BMP-verwandte GDF6 (*growth and differentiation factor-6*). Jeder dieser Faktoren kann das normalerweise in der ES-Zellkultur erforderliche fötale Kälberserum (FKS) ersetzen, sodass darin sogar einzelne ES-Zellen kultiviert bzw. neue ES-Zelllinien generiert werden können (Ying et al., 2003). Die BMP/GDF-Funktion inhibiert die neurale Differenzierung embryonaler Stammzellen, da BMP-stimulierte ES-Zellen unter LIF-Entzug

in eine nicht-neurale Richtung differenzieren. Werden dagegen ES-Zellen ausschließlich mit LIF stimuliert, ist in Abwesenheit von Serum oder BMP/GDF die Fähigkeit zur Selbsterneuerung stark eingeschränkt und die ES-Zellen beginnen in eine neurale Richtung zu differenzieren. Bei der Stimulation mit BMP/GDF spielt die Induktion sogenannter Id-Proteine (*inhibitors of differentiation*) eine entscheidende Rolle. Gezeigt wurde dies u. a. dadurch, dass mit einer Überexpression von Id1, Id2 oder Id3 die Notwendigkeit einer BMP/GDF Stimulation umgangen wird (Ying et al., 2003).

Wnt (*wingless type*) Proteine unterdrücken ebenfalls die neurale Differenzierung von ES-Zellen (Aubert et al., 2002). Der wnt-Signalweg scheint zumindest an einer kurzzeitigen Aufrechterhaltung von Pluripotenz bei murinen und humanen ES-Zellen beteiligt zu sein (Sato et al., 2004).

Des Weiteren gibt es Hinweise auf alternative extrinsische Faktoren, die bislang noch nicht identifiziert wurden. So haben im Maus-Embryo bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von Pluripotenz Mutationen an LIF, am LIF-Rezeptor oder Stat3 keine Auswirkung, obwohl der LIF-Rezeptor in der inneren Zellmasse exprimiert wird (Nichols et al., 1996) und dieser Rezeptor beim Pluripotenzerhalt *in vitro* eine wichtige Rolle spielt.

Normalerweise können Mäuse über mehrere Wochen die Einnistung eines Embryos verzögern und dabei die Pluripotenz der inneren Zellmasse aufrechterhalten, wenn der derzeitige Nachwuchs noch gesäugt wird. Doch Mutationen an gp130 führen dazu, dass Embryonen innerhalb von sechs Tagen den Epiblast verlieren und keinen Fötus mehr generieren können (Nichols et al., 1996). Somit scheint auch *in vivo* eine gp130-vermittelte Signalwirkung zur Stabilisierung pluripotenter Zellen erforderlich zu sein. Diese muss aber auf alternativem Weg induziert werden, da mutierte Komponenten des LIF/Stat3-Signalwegs keinen Phänotyp in den frühen Embryonalstadien erzeugen.

Die Fähigkeit von LIF-defizienten ES-Zellen, sich in Anwesenheit eines neutralisierenden gp130 Antikörpers selbst erneuern zu können, deutet ebenfalls auf einen weiteren Signalweg zur Aufrechterhaltung der ES-Zellidentität hin. Die verantwortliche Aktivität wurde als ESRF (*ES cell self-renewal factor*) bezeichnet und wird, wie auch LIF, von differenzierenden ES-Zellen sekretiert. ESRF konnte im konditionierten Medium einer parietales-endodermartigen Zelllinie detektiert werden, die aus ES-Zellen abgeleitet wurde (Dani et al., 1998).

Die Sekretion von LIF aus Fütterzellen scheint zwar die Hauptursache zu sein, welche den undifferenzierten Status fördert, doch können auch ES-Zellen mit homozygot deletierten LIF-Rezeptor-Allelen auf Fütterzellen noch Kolonien bilden, wenn auch mit deutlich verminderter

---

Effizienz (Chambers 2004). Dies deutet ebenfalls auf einen LIF-unabhängigen Mechanismus hin, der die Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen unterstützt.

### **1.3 Intrinsische Pluripotenzfaktoren**

Intrinsische Pluripotenzfaktoren sind Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch extrinsische Signale und/oder interne autoregulatorische Netzwerke kontrolliert werden. Zu den wichtigsten Vertretern gehören Oct4, Sox2 und Nanog. Diese drei Proteine bilden ein Transkriptionsfaktoren-Netzwerk zur Selbsterneuerung von humanen (Boyer et al., 2005) und murinen (Loh et al., 2006) ES-Zellen aus. Die drei Faktoren sind untereinander so verschaltet, dass jeder Faktor sich selbst und die anderen reguliert. Oct4, Sox2 und Nanog ko-okkupieren darüber hinaus auch die Promotoren vieler anderer Transkriptionsfaktoren, von denen viele entwicklungsrelevante Homeoproteine sind. Somit stabilisiert eine Triade aus Transkriptionsfaktoren den Erhalt der Pluripotenz (zur Übersicht siehe Niwa, 2007).

#### **1.3.1 Oct4**

Oct4 gehört zu einer Familie DNA-bindender Proteine, welche an die Oktamer-Sequenz ATGCAAAT binden. Oct4 ist bereits in der unbefruchteten Eizelle nachweisbar und die Expression setzt sich fort bis hin zur inneren Zellmasse der Blastozyste. Im angrenzenden Trophektoderm dagegen ist Oct4 herunterreguliert. Die Expression von Oct4 wird im prä- bzw. postimplantierten Embryo über den Epiblast hinweg aufrechterhalten, bleibt dann aber auf die primordiales Keimzellen beschränkt. Oct4-defiziente Blastozysten sehen äußerlich normal aus, es ist aber nicht möglich ES-Zellen aus ihnen abzuleiten, man erhält nur trophektodermale Zellen (Nichols et al., 1998). ES-Zellen bei denen Oct4-cDNA unter Tetracyclin-Kontrolle kontrollierbar ist, differenzieren zu trophektodermalen Zellen nachdem Oct4 runterreguliert wurde (Niwa et al., 2000). Dies zeigt, dass Oct4 essentiell für den Erhalt der Pluripotenz von ES-Zellen ist.

Wird Oct4 dagegen zu ca. 50% über dem Wildtyp-Niveau exprimiert, zeigt sich, dass ein signifikanter Anteil der Zellen differenziert und endo- bzw. mesodermale Marker ausprägt. In diesem artifiziellen Zustand scheint ein Kooperationspartner in limitierter Menge vorzuliegen, der zusammen mit Oct4 ES-Zell-spezifische Transkriptionsvorgänge reguliert. Entzieht man Wildtyp ES-Zellen LIF, so wird Oct4 innerhalb weniger Tage abgeschaltet und die Zellen

differenzieren. Die Differenzierung kann auch nicht mit einer Tetracycline-induzierten Oct4-Expression gestoppt werden. Das bedeutet, dass Oct4 nur zusammen mit einem oder mehreren gp130-regulierten Faktoren die Pluripotenz aufrechterhalten kann.

### 1.3.2 Sox2

Sox2 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine essentielle Rolle bei der Transkription von Oct4-Zielgenen spielt (Niwa et al., 2001). Sox2 und Oct4 haben z. B. nebeneinanderliegende Bindestellen im Enhancer-Bereich vieler Gene und stimulieren auf synergistische Weise deren Transkription (Ambrosetti et al., 2000). Als Beispiele sind zu nennen: *Fgf4* (Yuan et al., 1995), *Utf1* (Nishimoto et al., 1999), *Fbx15* (Tokuzawa et al., 2003), *Nanog* (Kuroda et al., 2005; Rodda et al., 2005) und *Lefty1* (Nakatake et al., 2006). Sox2<sup>-/-</sup> Embryos sind an Tag 3,5 noch normal entwickelt, doch an Tag 6 fehlen Oct4-positive Zellen (Avilion et al., 2003). Lässt man in der Zellkultur die innere Zellmasse auswachsen, fehlen pluripotente Zellen, doch lassen sich Zellen des Trophektoderms und des primitiven Endoderms nachweisen. Die Runterregulation (*knock-down*) von Sox2 in ES-Zellen induziert die Differenzierung in verschiedene Zelllinien, darunter Trophektoderm (Ivanova et al., 2006), was die funktionelle Bedeutung dieses Faktors für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz beweist. Allerdings zeigen sehr aktuelle Ergebnisse, dass Sox2-Defizienz durch Oct4-Überexpression kompensiert werden kann (Masui et al., 2007). Außerdem wurde in der Studie gezeigt, dass Sox2 für die Aktivierung der Oct4/Sox2-Enhancer-Bereiche entbehrlich ist, aber notwendig zu sein scheint, um Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, die Oct4-Expression beeinflussen. Es wird von den Autoren daher angenommen, dass die wesentliche Rolle von Sox2 in der Pluripotenzerhaltung darin besteht, die Oct4-Expression aufrechtzuerhalten.

### 1.3.3 Nanog

Der Transkriptionsfaktor Nanog wurde vor kurzem unabhängig von zwei Gruppen entdeckt (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Nanog ist wie Oct4 ein Homeo-Protein, doch liegt die Homologie der Nanog-Homedomäne im Vergleich zu anderen murinen Homeodomänen bei höchstens 50 %. Nanog-Expression ist auf sehr wenige Zelltypen begrenzt, darunter befinden sich auch ES-Zellen. In der Mausentwicklung startet die Expression von Nanog im Morulastadium und große Transkriptmengen findet man ebenfalls in der frühen Blastozyste. Doch bereits vor der Implantation lässt die Expression nach,

womöglich um eine unkontrollierte Proliferation der Zellen zu verhindern. Nanog-Expression bleibt nach der Einnistung des Embryos nur auf bestimmten Zellen des Epiblasts und später auf primordiale Keimzellen beschränkt (Chambers et al., 2003).

Aus der inneren Zellmasse von Nanog-defizienten (Nanog<sup>-/-</sup>) Embryonen lassen sich nur primitives endodermartige Zellen gewinnen. Wird Nanog in ES-Zellen ausgeschaltet, nehmen Nanog<sup>-/-</sup>-Zellen die typisch abgerundete Morphologie von Zellen des parietalen Endoderms an (Mitsui et al., 2003). Nanog-Expression in aggregierten ES-Zellen in Suspensionskultur verhindert ebenfalls die Differenzierung in das primitive Endoderm (Hamazaki et al., 2004). Die Aufrechterhaltung des ES-Zellstatus durch Nanog scheint also in einem Zusammenhang mit in der Unterdrückung von GATA6-Aktivität zu stehen.

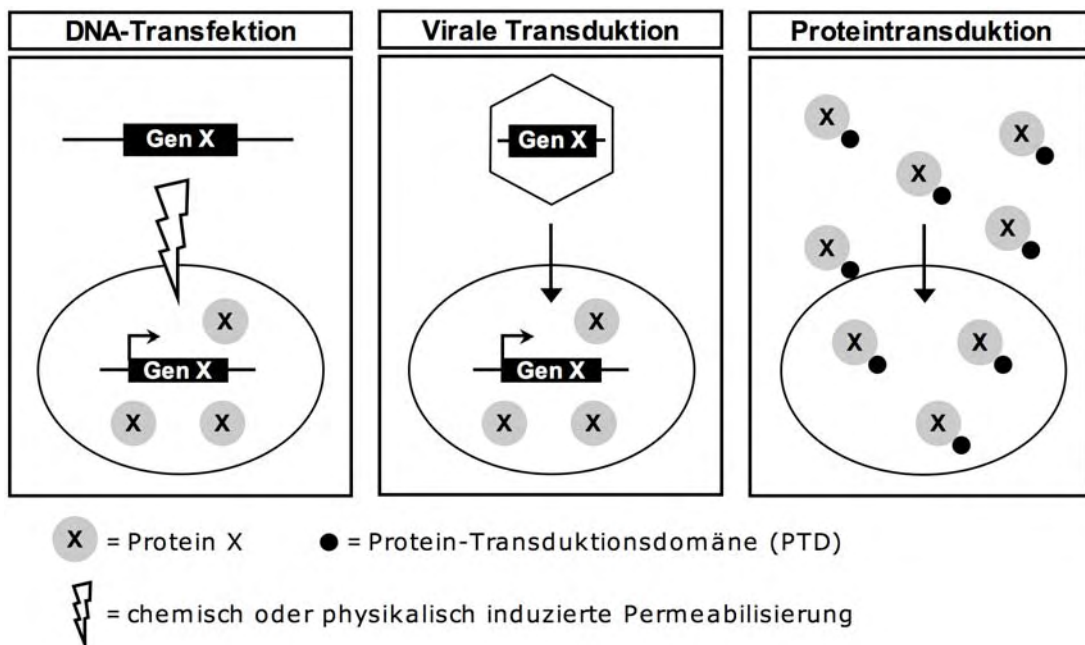
Darüber hinaus gibt es Berichte, dass die Funktion von Nanog nicht nur in der Inhibition der Differenzierung in das primitive Endoderm liegt, sondern dass das Protein auch neuronale Differenzierung inhibiert (Ying et al., 2003), die ansonsten durch den Entzug von BMP oder Serum ausgelöst wird. Zusätzlich gibt es Hinweise, die zeigen, dass Nanog die Mesoderm-Spezifikation zurückführen kann, indem es *brachyury* reprimiert, welches für den mesoderm-spezifischen T-box Transkriptionsfaktor T kodiert. T aktiviert seinerseits die Expression von Nanog, sodass eine negative Rückkopplung an der Ausbalancierung von Selbsterneuerung und mesodermaler Differenzierung beteiligt ist (Suzuki et al., 2006). Somit kann Nanog abhängig von den jeweiligen Kulturbedingungen die Differenzierung ins primitive Endoderm und die neuronale sowie mesodermale Differenzierung blockieren.

Im Gegensatz zu Oct4 und Sox2 scheint die Überexpression von Nanog für den Pluripotenzerhalt förderlich zu sein. ES-Zellen mit loxP-flankiertem konstitutiv aktivem Nanog-Expressionskonstrukt konnten für 8 – 9 Tage (2 Passagen) bei klonaler Dichte (100 Zellen/cm<sup>2</sup>) in Anwesenheit eines LIF-Inhibitors (Vernallis et al., 1997) kultiviert werden. Danach wurden diese Zellen in LIF-haltigem Medium expandiert, die Nanog-Expressionskassette über Cre-Rekombination entfernt, und in Blastozysten injiziert. Der daraus resultierende Nachwuchs zeigte zwar hohen Chimärismus (Chambers et al., 2003), doch konnte nicht gezeigt werden, dass die so behandelten Zellen zur Keimbahn der Mäuse beitragen können. Da parallel behandelte Wildtyp-ES-Zellen vollständig differenziert sind, liegt der Schluss nahe, dass Nanog in Abwesenheit von LIF die Pluripotenz dieser Zellen aufrechterhalten hat. Diese Aktivität von Nanog ist unabhängig von Stat3-Aktivierung und darüber hinaus induziert Stat3 selbst nicht die Expression von Nanog (Chambers et al., 2003). So scheinen Stat3 und Nanog unabhängig voneinander ihre Funktion auf ES-Zellen auszuüben.

Die Kombination beider Faktoren, Nanog-Überexpression und LIF/Stat3-Stimulierung, hat einen synergistischen Effekt auf die Selbsterneuerung von ES-Zellen. So werden unter diesen Bedingungen mehr undifferenzierte Kolonien gebildet und es entstehen stark kompaktierte Kolonien. (Chambers et al., 2003). Nanog erfordert die kontinuierliche Anwesenheit von Oct4, da sonst die Zellen in die trophektodermale Richtung differenzieren. Da ES-Zellen durch Nanog-Überexpression auch ohne LIF weiterhin pluripotent bleiben und weiterhin Oct4 exprimieren, scheint Nanog die Oct4-Expression beeinflussen zu können.

### 1.4 Protein-Transduktion

Eine Strategie zur funktionellen Charakterisierung eines Proteins ist neben der Deletion (*loss of function*) die Überexpression des entsprechenden Gens (*gain of function*). Um dies zu erreichen, gibt es verschiedene Methoden, die vorwiegend auf dem Transfer von Nucleinsäuren basieren: chemische oder elektrisch induzierte Transfektion, Mikroinjektion sowie verschiedene virale Vektorsysteme (Abb. 3, links und mitte). Die Gemeinsamkeit dieser unterschiedlichen Ansätze liegt darin, die genetische Information des Proteins in die Zelle zu bringen, damit diese das gewünschte Protein exprimieren kann. Bei vielen der



**Abb. 3: Konzepte zum Einbringen biologisch aktiver Proteine in Zellen.**

Um biologisch aktives Protein (hier: X) in Zellen zu bringen gibt es verschiedene Methoden, die meist auf dem Transfer von Nucleinsäuren basieren: chemische oder elektrisch induzierte Transfektion und verschiedene virale Vektorsysteme. Als Alternative zu den o. g. Techniken bietet sich die sogenannte Protein-Transduktion an. Dazu wird eine Protein-Transduktionsdomäne (PTD) an das Protein X fusioniert, um eine Zellpermeabilität zu vermitteln. Das Protein wird meist rekombinant hergestellt, ins Medium gegeben und kann in nahezu jede Zelle eindringen.

genannten Techniken treten Limitierungen auf, wie eine schlechte Transfizierbarkeit von primären Zellen, geringe Transfektionsraten, toxische und andere unerwünschte Nebeneffekte, die durch chemische oder physikalische Stimuli verursacht werden. Darüber hinaus besteht das Risiko permanenter genetischer Modifikationen durch insertionale Mutagenese. Bevor der biologische Effekt analysiert werden kann, müssen solche Zellen meist erst selektiert, bzw. isoliert werden, die tatsächlich das Protein ausreichend exprimieren. Häufig haben dann nach längerer Kultur die vormals positiven Zellen die Expression des Proteins reduziert oder gar eingestellt. Darüber hinaus lässt sich meist die Expressionsstärke schlecht regulieren, bzw. es gibt bei vielen konditionalen Systemen im nicht-induzierten Zustand Probleme mit Hintergrundaktivitäten des Proteins, welches von Interesse ist.

#### 1.4.1 Protein-Transduktionsdomänen

Eine Alternative zu den o. g. Techniken ist die sogenannte Protein-Transduktion (Abb. 3, rechts). Hier wird eine Protein-Transduktionsdomäne (PTD) an das gewünschte Protein fusioniert, um eine Zellpermeabilität zu vermitteln. Das Protein wird meist rekombinant hergestellt, ins Medium gegeben, und kann in nahezu jede Zelle eindringen, sodass eine Selektion unnötig ist (Übersicht bei Dietz und Bahr 2004; Patsch und Edenhofer, 2007).

Die Möglichkeit der Zell-Manipulation mittels Protein-Transduktion ist erst wenige Jahre bekannt, doch sind schon vielfältige Arbeiten zu dieser Thematik veröffentlicht worden. Zu Proteinen, die von Natur aus Zellmembranen überwinden können gehören pflanzliche und bakterielle Toxine (Falnes und Sandvig, 2000), Wachstumsfaktoren (Jans und Hassan, 1998), Homeoproteine (Prochiantz, 2000) sowie virale Proteine (Frankel und Pabo, 1988; Green und Lowenstein, 1988; Elliott und O'Hare, 1997). Bei vielen dieser Proteine wurde eine Protein-Transduktionsdomäne (PTD) oder sogenannte *cell penetrating peptides* (CPPs) identifiziert, die für die Transduktion essentiell sind. Die bekanntesten PTDs sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Das 16-Aminosäuren-Peptid Antp, welches aus der dritten Helix der Homeo-Domäne des Antennapedia Proteins stammt, wurde u. a. für die Internalisierung von Inhibitorpeptiden in Nervenzellen verwendet (Théodore *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1996). Die Anwendung dieser PTD ist aber beschränkt, da Antp beim Transport von Peptiden mit mehr als 100 Aminosäuren (AS) offensichtlich versagt (Übersicht bei Derossi *et al.*, 1998).

VP22 ist das Tegument Protein des Herpes Simplex Virus Typ 1. Das basische Protein hat eine Größe von 38 kDa und wurde u. a. dazu genutzt, grün-fluoreszierendes Protein (GFP)



(Elliott und O'Hare, 1997) und p53 (Phelan et al., 1998) in Zellen einzuschleusen. Beschrieben wurde auch, dass VP22 interzellulär transportiert wird, da VP22-Proteine aus transfizierten Zellen in nicht-transfizierte Zellen gelangen können. Anhand einer C-terminalen Deletionsmutante wurde ein basisches, für die Transduktion essentielles Peptid von 34 AS Länge identifiziert (Elliott und O'Hare, 1997).

Die prominenteste PTD ist TAT, ein 11-Aminosäure-langes, basisches Peptid vom Transaktivatorprotein TAT des HIV-1 (Murriel und Dowdy, 2006). Erste Arbeiten zu dieser PTD zeigten, dass das HIV-TAT-Protein (*HIV-transactivator of transcription*) in Zellen eindringt, und Transkription induzieren kann (Frankel und Pabo, 1988; Green und Loewenstein, 1988). Nachfolgende Studien identifizierten eine basische Region des Tat-Proteins, welche für die Membrangängigkeit verantwortlich ist (Fawell et al., 1994). Diese basische Region (TAT), welche die Aminosäurereste 48-57 des HIV-Tat-Proteins umfasst, wurde an den rekombinant hergestellten CDK-Inhibitor p27<sup>Kip1</sup> fusioniert (TAT-p27<sup>Kip1</sup>), welcher die Migration von Zellen induzierte (Nagahara et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die TAT-PTD verwendet, da es zu dieser Domäne die weitaus meisten erfolgreichen Berichte mit zellpermeablen Proteinen gibt (Dietz und Bahr, 2004).

PTD	Aminosäure-Sequenz	Frachtmoleküle	Referenz
Antp	RQIKIWFQNRRMKWKK	Proteinkinase-C-Inhibitor	Théodore et al., 1995
		Phospholipase-C $\gamma$ -Antagonist	Hall et al., 1996
VP22	DAATATRGRSAASRPTE	GFP	Elliot & O'Hare, 1997
	RPRAPARSASRRPVE*	p53	Phelan et al., 1998
TAT	YGRKKRRGRRR	CDK-Inhibitor p27 <sup>Kip1</sup>	Nagahara et al., 1998
		Eisenkugeln (40nm)	Lewin et al., 2000
		Liposome	Torchilin et al., 2001

**Tabelle 1: Die bekanntesten PTDs und ihre erstmaligen Anwendungen**

Zu jedem Peptid sind Beispiele für Frachtmoleküle aufgeführt, die durch Fusion mit der PTD transduzierbar wurden. Basische Aminosäuren sind fett hervorgehoben. \*Für die Transduktion essentieller Bereich des VP22-Proteins

GFP, *green fluorescent protein*

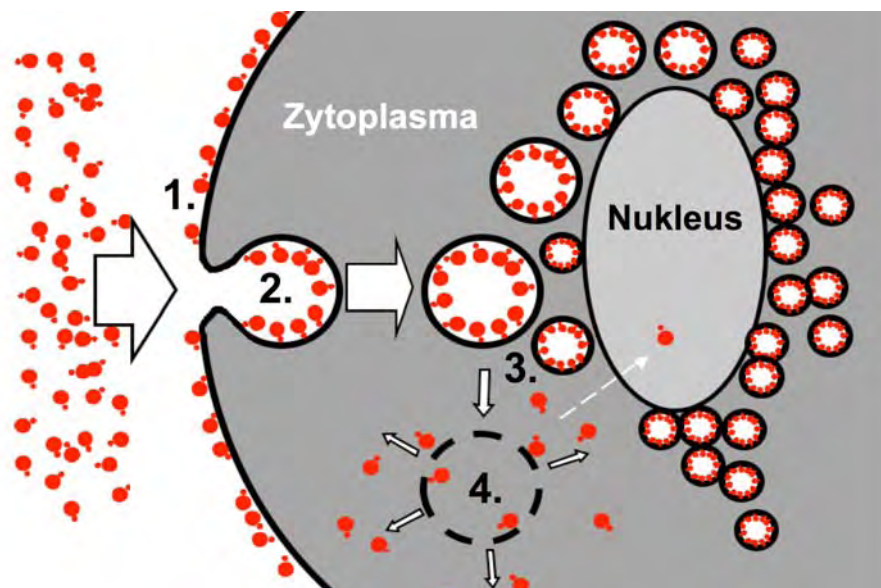
### 1.4.2 Mechanismus der PTD-vermittelten Protein-Transduktion

Der Mechanismus der Protein-Transduktion ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Ursprünglich wurde vermutet, dass eine direkte Membranpenetration stattfindet. Triebkraft

hierfür sollte der energetisch hohen Zustand des denaturiert aufgereinigten TAT-Fusionsproteins sein (Nagahara et al., 1998; Bonifaci et al., 1995). Das Fusionsprotein würde, der Theorie zufolge, nach dem Membrantransfer von molekularen Chaperonen im Zytoplasma rückgefaltet und biologisch aktiv werden (Nagahara et al., 1998). Heute geht man davon aus, dass die zelluläre Aufnahme über Makropinozytose, einer Form der Endozytose erfolgt (Wadia et al., 2004) (Schematische Darstellung in Abb. 4).

Als Initialschritt gilt die Bindung an die Zelloberfläche über elektrostatische Wechselwirkung mit den basischen PTDs. Hierbei ist die Guanidin-Gruppe der Arginine ein essentielles Strukturelement der PTDs zur Protein-Transduktion (Wender et al., 2000). Das polyanionische Heparansulfat (HS) der extrazellulären Proteoglykanmatrix spielt dabei eine Schlüsselrolle für die Bindung des PTD-Fusionproteins (Console et al., 2003; Tyagi et al., 2001). HS-Proteoglykane sind Bestandteile der extrazellulären Matrix von vielen Säugerzellen.

Die Aufnahme des PTD-Fusionsproteins erfolgt über Makropinozytose und ist unabhängig



**Abb. 4 Schematische Darstellung des Transduktionsmechanismus von Proteinen**

1.) Als Initialschritt gilt die Bindung basischer PTDs an die sauren Heparansulfat-Proteoglykane der Zelloberfläche über elektrostatische Wechselwirkungen. 2.) Nach Bindung an die Zelloberfläche werden die Fusionsproteine über Makropinozytose internalisiert. Makropinozytose ist unabhängig von der Rezeptor-vermittelten oder Clathrin-/Caveolae-abhängigen Form der Endozytose. Die Makropinosomen entwickeln sich daher nicht weiter zu Lysosomen, wie es bei anderen endozytotischen Vesikeln der Fall ist. 3.) Die mit PTD-Fusionsproteinen beladenen Makropinosomen ordnen sich häufig perinukleär an. Es ist möglich, dass sie über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgiapparat abgebaut werden (Caron et al., 2004). 4.) Der Mechanismus über den die PTD-Fusionsproteine aus den Makropinosomen in das Zytoplasma gelangen, ist allerdings noch unklar. Mehr als 99 % der aufgenommenen TAT-Fusionsproteine verbleiben in den Makropinosomen und werden nicht freigesetzt (Kaplan et al., 2005).

Adaptiert von Patsch und Edenhofer (2007)

von der Rezeptor-vermittelten oder Clathrin-/Caveolae-abhängigen Form der Endozytose (Wadia et al., 2004). Die Bildung der ca. 1 µm großen endozytotischen Membranvesikel (Makropinosomen) ist temperaturabhängig (Kaplan et al., 2005) und die Makropinosomen entwickeln sich nicht weiter zu Lysosomen, wie dies bei anderen endozytotischen Vesikeln der Fall ist. Die Beobachtung, dass sich mit PTD-Fusionsproteinen beladene Makropinosomen perinukleär anordnen, spricht dafür, dass sie über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgiapparat abgebaut werden (Caron et al., 2004). Neuere Befunde zeigen, dass die zelluläre Aufnahme, in Abhängigkeit von der PTD und der Größe des Frachtmoleküls, parallel zur Makropinozytose auch über alternative endozytotische Mechanismen erfolgt (Nakase et al., 2004; Tünnemann et al., 2006).

Wie die PTD-Fusionsproteine aus den Makropinosomen in das Zytoplasma gelangen, ist allerdings unklar. Die Identifizierung und Charakterisierung dieses Prozesses würde womöglich helfen, die Transduktion effizienter zu machen, da hier der limitierende Schritt der PTD-vermittelten Transduktion vorliegt. Es verbleiben nämlich mehr als 99 % der aufgenommenen TAT-Fusionsproteine in den Makropinosomen und werden nicht freigesetzt (Kaplan et al., 2005). Eine Strategie zum Aufbruch der Makropinosomen ist die Ko-Transduktion mit dem fusogenen Peptid dTAT-HA2 (Wadia et al., 2004). Hiermit konnte die Menge an intrazellulär freigesetztem TAT-Fusionsprotein erhöht werden. Das aus d-Aminosäuren aufgebaute dTAT-HA2 Peptid besteht aus einer TAT-PTD und den N-terminal gelegenen 20 Aminosäuren des Hemagglutininproteins (HA2) des Influenzavirus. HA2 ist ein gut charakterisiertes pH-sensitives, fusogenes Peptid, das bei niedrigem pH in der Lage ist Lipidmembranen zu destabilisieren (Skehel et al., 2001; Han et al., 2001).

### **1.4.3 Anwendung der Protein-Transduktion bei der Cre Rekombinase**

Die Cre Rekombinase ist ein zentrales Werkzeug in der modernen Säugetiergenetik, da sie zur konditionalen Mutagenese in vitro und in vivo nutzbar ist. Um Cre alternativ zu den üblichen Gentransfermethoden in Zellen einzubringen, wurde von uns (Peitz et al., 2002) und anderen (Jo et al., 2001; Joshi et al., 2002, Will et al., 2002) die Methode der Protein-Transduktion angewendet. Bei Jo et al. (2001) wurde dazu die hydrophobe Protein-Transduktionsdomäne „MTS“ (*membrane translocation sequence*) zusammen mit einem NLS verwendet. Wir konnten dagegen zeigen, dass die MTS nicht nur keinen förderlichen Einfluss auf die Protein-Transduktion hat, sondern sich durch entfernen der MTS-Domäne die Rekombinationseffizienz sogar anheben lässt. Ferner haben wir durch die Verwendung der

---

basischen PTD „TAT“ die Transduktionseffizienz um eine Größenordnung steigern können (Peitz et al., 2002). Zellpermeable Versionen von Cre induzierten die Rekombination loxP-modifizierter Allele in einer Vielzahl von kultivierten Zellen, wie Fibroblasten, primäre B- und T-Zellen sowie murinen (Peitz et al., 2002) und humanen ES-Zellen (Nolden et al., 2006). Zur Transduktion von Cre in murinen ES-Zellen wurde ein 1:1 Gemisch aus PBS und DMEM verwendet, welches aber ein für die ES-Zellkultur untypisches und ungeeignetes Medium ist. So war zu Beginn der vorliegenden Arbeit unklar, ob in herkömmlichem, FKS-haltigem ES-Zellmedium die Transduktion in ES-Zellen mit gleicher Effizienz durchführbar ist. Darüber hinaus war fraglich, ob eine Behandlung mit Cre-Protein aus bakterieller Quelle nicht mit der Keimbahn-Kompetenz muriner ES-Zellen interferiert. Diese Fragestellung basiert auf grundsätzlichen Bedenken gegenüber der Verwendung von Cre in Zellen, da verschiedene Studien zeigten, dass Cre-Aktivität toxische Effekte verursacht, z. B. erhöhten Zelltod (Baba et al., 2005), Wachstums-Inhibition bei verschiedenen Fibroblastenlinien und HeLa Zellen (Pfeifer et al., 2001; de Alboran et al., 2001) und darüber hinaus chromosomale Aberrationen in primären Fibroblasten (Loonstra et al., 2001; Silver und Livingston, 2001) und postmeiotischen Spermatozyten (Schmidt et al., 2000).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte eine transduzierbare Variante des Homeobox-Proteins Nanog hergestellt und analysiert werden, um dessen Aktivität konditional kontrollierbar zu machen. Diese Methode stellt eine Alternative zu einem, im Arbeitskreis durchgeführten, genetischen *gain-of-function*-Ansatz dar. Erkenntnisse zur Protein-Transduktion sollten anhand des etablierten transduzierbaren Cre Proteins (HTNCre; Peitz et al., 2002) vertieft werden.

Es sollte untersucht werden, welche Faktoren Einfluss auf die Transduktion haben. So galt es z. B. zu klären, inwiefern FKS die Transduktion von Proteinen beeinflusst. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die Protein-Transduktion unter normalen Kulturbedingungen eine geeignete Methode zur konditionalen Manipulation von ES-Zellen ist. Für diese Untersuchungen diene die bereits etablierte transduzierbare Cre Rekombinase (HTNCre; Peitz et al., 2002) als Modellprotein, da Rekombinaseaktivitäten nach erfolgter Transduktion leicht nachweisbar sind. Es galt weiterhin zu analysieren, inwieweit die Cre-Transduktion die Pluripotenz bzw. die Keimbahn-Kompetenz beeinflusst.

---

Das transduzierbare Nanog-Protein sollte so beschaffen sein, dass es unter physiologischen Bedingungen stabil ist, und in einer Konzentration vorliegt, die für eine biologische Aktivität ausreichend ist. Diese Nanog-Aktivität sollte anhand unterschiedlicher ES-Zelllinien demonstriert werden können. Hierbei sollte geprüft werden, inwieweit es möglich ist, die Pluripotenz in Abwesenheit von LIF aufrechtzuerhalten. Das verbliebene Entwicklungspotential sollte über Methoden wie Markerfärbungen und Differenzierungsanalysen *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Als zusätzlicher Beleg der Funktionalität sollten weitere biologische Funktionen von Nanog mit dem transduzierbaren Protein charakterisiert werden. Dazu sollte ebenfalls der Synergismus von Nanog und LIF/Stat3 näher analysiert werden. Abschließend sollte geklärt werden, ob das mit murinem Nanog etablierte Transduktionssystem auch in humanen ES-Zellen Funktionalität zeigt.

## 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, Fluka (beide Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore (Eschborn) angesetzt. Alle Lösungen wurden nach dem Ansetzen durch eine 0,2 µm Membran filtriert.

#### 2.1.2 Geräte

##### Geräte

##### Hersteller

##### 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)
-------------	------------------

##### 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)

##### Elektroporationsgerät

Gene-Pulser II	BioRad (München)
----------------	------------------



**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 Enzyme**

Restriktionsendonukleasen	NEB (Frankfurt)
Taq Polymerase	Invitrogen (Carlsbad, USA)
GoTaq Polymerase	Promega (Mannheim)
(beide Polymerasen für analytische PCRs)	
High Fidelity PCR Master Mix	Roche
(für Klonierungsarbeiten)	
M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus,	
Punkt Mutante	Promega (Mannheim)
Benzonase	Novagen (Darmstadt)
Lysozym	Sigma (München)
T4 DNA Ligase	NEB (Frankfurt)
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	Roche

**2.1.4 Antikörper***Für Zellfärbungen:*

- Anti-Oct4 (Kaninchen IgG, 1:400, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- Anti-SSEA-1 (Maus IgM, 1:80; Hybridoma Bank),
- Biotin anti-Maus IgM (1:200, DAKO)
- FITC-Avidin (1:200)
- Cy3 Ziege anti-Kaninchen IgG (1:400, Jackson Immuno Research).



---

*Für Western Blots:*

Anti-Nanog (1 : 2000, Chemicon)

Anti-Cre (1 : 2000, Babco)

Anti-penta-His Antikörper (1 : 1000, Qiagen)

Stat3 (1 : 1000, Cell Signaling Technology)

P705Stat3 (1 : 1000, Cell Signaling Technology)

Sekundäre Antikörper

anti-rabbit (1 : 5000, Cell Signaling Technology)

anti-mouse (1 : 5000, Cell Signaling Technology)

### **2.1.5 Bakterienstämme**

DH5a (Gibco BRL, Karlsruhe)

Bakterienstamm für Klonierungen

BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt)

*lon*- und *ompT*-Proteasen defizienter BL21-Stamm mit T7 RNA-Polymerase.

BL21 (DE3) GOLD (Stratagene)

*lon*- und *ompT*-Proteasen defizienter BL21-Stamm mit T7 RNA-Polymerase, welcher durch eingefügte Mutationen eine ca. 100 fache höhere Transformierbarkeit aufweist.

BL21 (DE3)pLacI (TUNER) (Novagen, Darmstadt)

*LacYZ* Deletionsmutante von *lon*- und *ompT*-Proteasen defizientem BL21-Stamm. Die Permease-Mutation (*LacY*) erlaubt eine einheitliche Aufnahme von IPTG. Dieser Stamm wurde für Expressionen von HTNCre benutzt.

---

### 2.1.6 Zelllinien

CV1-5B (Kellendonk et al., 1996)

Eine Zell-Linie aus Fibroblasten der grünen Meerkatze. Sie enthält ein einzelnes, stabil im Genom integriertes Cre-Reporterkonstrukt. Dieses Transgen enthält ein offenes Leseraster des  $\beta$ -Galaktosidasegens. Nur nach cre-vermittelter Rekombination, bei der auch ein loxP-flankiertes Neomycinresistenzgen ausgeschnitten wird, kann die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase stattfinden.

COS-7

Die Zelllinie COS-7 wurde aus Nierengewebe von Grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) gewonnen. Es handelt sich um eine etablierte Fibroblasten-Zelllinie, die aus Zellstammsammlungen bezogen werden kann und häufig in zellbiologischen Experimenten eingesetzt wird. Die Zellen wurden stabil mit einer Mutante des SV40-Virus transformiert und produzieren daher das sogenannte T-Antigen.

#### ES Zell-Linien

Oct4-GiP (Ying et al., 2002)

Transgene, hybride ES-Zelllinie (129  $\times$  MF1). Regulatorische Sequenzen des murinen Oct4 Gens kontrollieren in dieser Linie die Expression eines GFP und eines Proteins, welches Puromycin-Resistenz vermittelt. Nur pluripotente Zellen und Zellen der Keimbahn sind daher positiv für GFP und resistent gegen Puromycin.

C57B/L6

Wild Typ ES-Zelllinie

ECAT7

RF8 ES-Zellen mit LacZ Knock-In im Lokus von ECAT7 (Shinya Yamanaka et al., unpubliziert)

---

## 2.2 Molekularbiologie

### 2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Folgende Kits wurden zur Aufreinigung von Plasmiden nach Herstellerprotokoll benutzt:

*Mini-Kit* (Amersham)

Mini-Kit von Eppendorf (mit diesem Kit lassen sich deutlich längere Leseweiten beim Sequenzieren erzielen)

*Maxi-Kit* (Qiagen)

Größere Plasmid-Mengen wurden mit dem nach Herstellerprotokoll präpariert.

### 2.2.2 Elektrophorese im Agarosegel

Mit der Agarosegel-Elektrophorese werden DNA-Fragmente der Länge nach aufgetrennt und sichtbar gemacht. Das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA verhält sich in einem elektrischen Feld so, dass es sich mit einer Geschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes im Gel zur Anode bewegt. Durch Zugabe des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid kann die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Größe der DNA-Fragmente ermittelt man, indem man parallel definierte Längenstandards aufträgt und im Gel mitlaufen lässt.

0,5 – 2 % m/v (je größer das Fragment, desto höher der Prozentgehalt) Agarose (Gibco BRL, Karlsruhe) wurden durch Aufkochen in 1 x TAE gelöst und vor Zugabe von 1:10.000 Ethidiumbromid (finale Konz. = 1 µg/ml) handwarm abgekühlt. Die schließlich handwarme Agaroselösung wird in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen, wo sie durch weiteres Abkühlen aushärtet. Das Gel wird in eine Elektrophoresekammer mit 1 x TAE gelegt und die DNA mit 1/10 Ladepuffer in die Taschen gegeben.

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

10 x Ladepuffer:              100 mM Tris pH 8,0  
   30 % Glycerin

---

Spatelspitze Bromphenolblau (dunkelblau)

Spatelspitze Xylenxyanol (hellblau)

### **2.2.3 Quantifizierung von DNA**

Eine DNA-Lösung unbekannter Konzentration wurde in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert.

Dabei entspricht eine  $OD_{260}$  von 1 einer DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ . Durch Bestimmung der OD bei 280 nm kann man über den Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  die Reinheit der DNA bestimmen. Ein Verhältnis von 2 entspricht einer reinen DNA-Lösung, wobei eine Erniedrigung des Quotienten auf Kontamination durch Proteine hindeutet, da verschiedene aromatische Aminosäuren wie DNA bei 280 nm absorbieren.

### **2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten**

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau wurde die DNA in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Unter langwelligem UV-Licht wurde die erwartete Bande sichtbar gemacht und mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten. Um die DNA aus dem Agaroseblock zu isolieren, wurde das Aufreinigungskit QIAquick (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### **2.2.4 DNA-Sequenzierung**

Die während der Arbeit genutzte automatische DNA-Sequenzierung beruht auf dem Prinzip der Abbruchmethode durch fluoreszenzmarkierte Nukleotide.

Die Nukleotide werden am 3'OH-Ende mit einem für jedes Nukleotid spezifischen Fluoreszenz-Farbstoff markiert, in einer bestimmten Konzentration mit nichtmarkierten Nukleotiden gemischt und in den Reaktionsansatz zur Polymerisierung eingesetzt. Wenn nun ein markiertes Nukleotid in den Strang eingebaut wird, kann die Synthese nicht fortgeführt werden, da das nächste Nukleotid nicht mit dem 3'OH-Ende des vorangegangenen verknüpft werden kann. Gegen Ende der Reaktion wird die Wahrscheinlichkeit immer größer, dass ein längerer Strang synthetisiert wird, da schon eine gewisse Menge an markierten Nukleotiden

verbraucht ist. Die Reaktionsprodukte werden in einem Automaten aufgetrennt. Ein Laserstrahl des Sequenzierautomaten liest aus der Abfolge der fluoreszenzmarkierten Abbruchbanden die Sequenz.

Die Sequenzierreaktionen und Analysen wurden extern im Analyselabor der ZMMK in Köln durchgeführt. Es wurden daher zur Sequenzierung eines Plasmids lediglich 150 – 300 ng hochreine DNA und Primer in einem Volumen von 6  $\mu$ l vorgelegt.

### **2.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford**

Diese Art der Konzentrationsbestimmung von Proteinen beruht auf dem Prinzip, dass die saure Coomassie Brilliant Blue Lösung ihr Absorptions-Maximum nach Bildung von Komplexen mit Proteinen von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Bei einer geeigneten Protein- und Farbstoffkonzentration ist die Absorption bei 595 nm zum Proteingehalt nahezu proportional. Mit Hilfe von Proteinlösungen bekannter Konzentration kann so eine Eichkurve erstellt werden. Als Proteinstandard wurde BSA verwendet. Der Test wurde in 1 ml-Einmalküvetten durchgeführt, wobei die Extinktion nach 10 min Inkubation bei 595 nm bestimmt wurde. Die Probenmenge wurde so gewählt, dass die OD<sub>595</sub> zwischen 0,1 und 0,2 lag. Daraufhin wurde der Wert mit der Anfangssteigung der Eichkurve verrechnet und so die Proteinkonzentration der Ausgangslösung bestimmt

### **2.2.6 SDS-PAA-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung**

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) werden die aufzutrennenden Proteine zunächst mit SDS denaturiert und Disulfidbrücken mit  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert. SDS lagert sich an die Polypeptidketten und verleiht dem Komplex eine negative Ladung. Die Zahl der SDS-Moleküle ist der Länge einer Peptidkette annähernd proportional. So werden die Proteine aufgrund ihres nahezu konstanten Ladungs-Masse-Verhältnisses in dem porösen Polyacrylamidgel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt.

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden zwei unterschiedlich hoch vernetzte Polyacrylamidgele mit unterschiedlichen pH-Werten übereinander geschichtet. Das obere, weitmaschige Sammelgel dient zur Konzentrierung der Proteine. Im darunter liegenden engmaschigen Trenngel werden die Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend

aufgetrennt. Durch den unterschiedlichen Vernetzungsgrad und die pH-Diskontinuität erhält man so besonders scharfe Banden im Trenngel. Diese Methode diene u. a. der Quantifizierung der Expression der rekombinanten Proteine und zur Abschätzung der Reinheit von Proteinpräparationen.

2 x Probenpuffer:            6 % SDS  
                                  20 % Glycerin  
                                  1 Spatelspitze Bromphenolblau  
                                  6 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### *Herstellung des SDS-Gels*

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und vor der Polymerisierung mit Isopropanol überschichtet. Dann wurde der Isopropanol entfernt und das Sammelgel über das Trenngel geschichtet. Vor dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde ein Kamm bis auf 0,5 cm an das Trenngel eingesteckt. Das Gel wurde in eine Laufkammer eingespannt und mit 1 x Laemmli-Puffer überschichtet und anschließend wurden die im Probenpuffer für 3 – 5 min aufgekochten und zentrifugierten Proteinproben in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese wurde bei 200 V für 45 min mit einer Mini-PROTEAN III cell (BIO-RAD, München) durchgeführt.

Sammelgel (2 ml):            1,4 ml H<sub>2</sub>O  
                                  0,33 ml 30 % Acrylamidlösung  
                                  0,25 ml 1 M Tris (pH 6,8)  
                                  0,02 ml 10 % SDS  
                                  0,02 ml 10 % APS  
                                  0,002 ml TEMED

Trenngel (12%ig, 5 ml):    1,7 ml H<sub>2</sub>O  
                                  2,0 ml 30 % Acrylamidlösung  
                                  1,3 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)  
                                  0,05 ml 10 % SDS  
                                  0,05 ml 10 % APS  
                                  0,002 ml TEMED

---

10 x Laemmlipuffer (1 l): 30,3 g Tris  
144,2 g Glycin  
10 g SDS

#### *Anfärben von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen*

Die PAGE-Gele wurden 3 x 5 Minuten in dest. H<sub>2</sub>O gewaschen um das SDS zu entfernen. Anschließend wurde das Gel für mindestens eine Stunde oder über Nacht in einer kolloidalen Coomassie-Färbelösung (Gel Code Blue Stain Reagent, PIERCE) behandelt. Zum Entfärben wurde das Gel für mindestens eine Stunde oder über Nacht mit dest. H<sub>2</sub>O inkubiert. Mit dem Gel Dry System (Invitrogen) wurde das Gel luftgetrocknet und konserviert.

#### **2.2.7 Western-Blot**

Die zu analysierende Proteinprobe wurde per SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer semi-dry blot Apparatur (Biometra) auf eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) transferiert. Dazu schichtet man drei in Western-Transferpuffer getränkte Filterpapiere (Whatman) blasenfrei übereinander auf die Apparatur gefolgt von der Transferpuffer-befeuchteten NC-Membran, auf diese wiederum das Gel und schließlich legt man nochmals drei in Transferpuffer getränkten Filterpapiere auf den Stapel. Der Deckel wird vorsichtig auf den Stapel gedrückt. Dann wird ein Strom angelegt, der proportional zur Größe des Gels berechnet ist (1,5 mA/cm<sup>2</sup> Gel). Die Proteine wandern im Strom zur Anode hin und bleiben an der Membran hängen. Die Dauer des Transfers lag zwischen 15 und 35 min, anschließend wurde die Membran direkt weiterverwendet. Um unspezifische Bindung von Antikörpern (AK) zu verhindern, wurde die NC-Membran für mind. 45 min bei RT in Blockierlösung inkubiert. Daraufhin wurde der primäre AK für 45 min bei RT zugegeben. Um ungebundene primäre AK zu entfernen, wurde dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Dann wurde der Blot mit dem zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörper für 30 min inkubiert und anschließend dreimal mit TBS-T und einmal mit TBS für 5 min gewaschen. 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 (Bio-Rad) eingefangen und vom Programm QuantityOne (Version 4.5.2; Bio-Rad) als TIFF-Dateien gespeichert.

Western-Transferpuffer :    5 % (v/v) 10 x Laemmlipuffer  
                                  10 % (v/v) Methanol  
                                  mit H<sub>2</sub>O auffüllen

TBS:                            150 mM NaCl  
                                  10 mM Tris-Cl  
                                  pH 7,5

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

TBS-Tween/Triton:            150 mM NaCl  
                                  0,01 % (v/v) Triton X-100  
                                  0,05 % (v/v) Tween 20  
                                  20 mM Tris-Cl  
                                  pH 7,5

#### *„Strippen“ eines Western-Blots*

Um die spezifische Bindung unterschiedlicher AK an Proteinen zu testen, ist es möglich vor der Inkubation mit einem zweiten primären AK den ersten primären AK zu entfernen („Strippen“ der Membran). Das Entfernen des ersten primären AK ist notwendig, da dieser die Bindung eines weiteren AK verhindern kann.

Man wäscht zuerst den Blot kurz in PBS inkubiert ihn dann für 30 min bei 50 °C unter gelegentlichem Schwenken in einem Stripping-Puffer. Danach wird der Blot zweimal in großen Volumina PBS-T und einmal in PBS bei RT gewaschen. Anschließend kann der Blot wie nach einem Proteintransfer behandelt werden.



---

Stripping-Puffer:	2 % SDS
	62,5 mM Tris-Cl, pH 6,7
	frisch zugeben:
	100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol (100 % entspricht 14,1 M)

### 2.2.8 RT-PCR

Die RNA aus Zellen wurde mit dem SV Total RNA Isolation System (Promega) nach Herstellerangaben isoliert. Die RNA wurde anschließend mit dem Enzym M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus, Punkt Mutante (Promega) nach Herstellerangaben zu cDNA umgeschrieben, nur die Synthese-Temperatur wurde von 42°C auf 48°C angehoben. Die PCR Reaktion wurden mit der GoTaq Polymerase (Promega) durchgeführt.

#### *Verwendete Primer*

Oct4-F: 5' - AGTGGAAAGCAACTCAGAGGG

Oct4-R: 5' - GGTTCTCATTGTTGTCGGCTT

Nanog-F: 5' - AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG

Nanog-R: 5' - CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG

Rex-1-F: 5- CGTGTAACATACACCATCCG

Rex-1-R: 5' - GAAATCCTCTTCCAGAATGG

GATA6-F: 5' - GCAATGCATGCGGTCTCTAC

GATA6-R: 5' - CTCTTGGTAGCACCAGCTCA

TTR-F: 5' - CTCACCACAGATGAGAAG

TTR-R: 5' - GGCTGAGTCTCTCAATTC

GAPDH-F: 5'-ACGACCCCTTCATTGACCTCAACT

GAPDH-R: 5'-ATATTTCTCGTGGTTCACACCCAT

### 2.2.9 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Analysen wurden mit einem FACSCalibur Gerät (BD Biosciences) durchgeführt. Die Daten-Analyse erfolgte mit der CellQuest Acquisition Software (BD Biosciences).

### 2.2.10 Southern-Blot

Mit der Southern Blot Hybridisierung können spezifisch Nukleotid-Sequenzen unter DNA-Fragmenten nachgewiesen werden, die über Gelelektrophorese aufgetrennt wurden.

#### *Auftrennen und Blotten der genomischen DNA*

Genomische DNA wurde 24 – 48 h mit 100 U des entsprechenden Restriktionsenzym bei 37 °C verdaut und anschließend in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde unter UV-Licht zusammen mit einem Lineal photographiert und anschließend 20 min in 0,25 M HCl depuriniert. In dieser Zeit wurde der Kapillartransfer vorbereitet, d. h., es wurde über eine Wanne mit 0,4 M NaOH eine Glasplatte gelegt. Auf diese wurden mehrere Lagen im NaOH-getränkte Whatmanpapier (mit Kontakt zum Reservoir) als Unterlage für das Gel platziert. Auf das Gel wurde die Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) gelegt und blasenfrei geglättet. Die Membran wurde mit einem weiteren angefeuchteten Whatmanpapier abgedeckt. Als Triebkraft für den Transfer wurden zuletzt zwei Päckchen trockenes Apurapapier auf den Stapel gelegt und mit einer Glasplatte und einem leichten Gewicht (ca. 500 g) fixiert. Nach 14 – 20 h wurde der Blot abgebaut, die Membran eine Minute in 2 x SSC gewaschen und zwischen zwei Whatmanpapieren direkt für 20 – 30 min bei 80 °C inkubiert, um die DNA kovalent mit dem Nylonmaterial zu fixieren.

#### *Radioaktive Markierung*

Die Membran mit der fixierten genomischen DNA wurde mit 2 x SSC angefeuchtet, mit einem dünnen Plastiknetz auf der DNA-Seite eingerollt (zur gleichmäßigen Verteilung der Lösungen) und in eine Hybridisierungsröhre gegeben. In die Röhre wurde 25 ml einer auf 70 °C vorgewärmten Prähybridisierungslösung gegeben und die Membran wurde für mind. 4 h bei 65 °C prähybridisiert.

*Herstellung der radioaktiven Sonde:*

Reaktionsansatz (25  $\mu$ l):     x  $\mu$ l Templat (50 ng)  
                                       4  $\mu$ l Random Nonamer Primer  
                                       mit H<sub>2</sub>O auf 16,5  $\mu$ l auffüllen  
                                       zus. 3 min aufkochen, dann unverzüglich 3 min auf Eis geben  
                                       2,5  $\mu$ l dNTP's (alle Nukleotide, außer ATP)  
                                       2,5  $\mu$ l Bca Best Puffer  
                                       2,5  $\mu$ l  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-markiertes ATP (= 2,5  $\mu$ Ci)  
                                       1  $\mu$ l Bca-Polymerase (Klenow-Fragment; Takara)

Der Reaktionsansatz wurde 30 – 60 min bei 56 °C inkubiert und durch Zugabe von 100  $\mu$ l TE die DNA-Polymerase-Reaktion abgestoppt. Der Ansatz wurde dann auf einer mit TE-Puffer äquilibrierten Zentrifugationssäule mit Sepharosematrix (MicroSpin S-200HR, Pharmacia) durch Größenausschlusschromatographie von überschüssigem radioaktivem ATP und anderen freien Nukleotiden befreit. Die im Durchfluss enthaltene markierte Sonde wurde nun kurz für 3 min im kochenden Wasserbad denaturiert und unverzüglich im Eisbad für 3 min abgekühlt, damit sie nicht renaturiert. Die radioaktive Sonde wurde der Prähybridisierungslösung zugesetzt und die Membran in dieser Lösung für 12 – 16 inkubiert.

Prähybridisierungslösung:    1 M NaCl  
                                       50 mM Tris-Cl pH 7,5 – 8  
                                       10 % Dextransulfat  
                                       1 % SDS  
                                       250  $\mu$ g/ml sonifizierte DNA aus Lachsspermien

*Detektion radioaktiver Signale*

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Membran (abhängig von der Stärke mit der die Sonde bindet) mit 2 x ,1 x und 0,5 x SSC + 0,1 % SDS bei 65 °C gewaschen um unspezifisch hybridisierte DNA-Sonde zu entfernen. Die Membran wurde in eine Folie eingeschweißt und die Detektion erfolgte bei – 80 °C durch einen Biomax MS Film (Kodak). Der Film wurde maschinell entwickelt.

20 x SSC:                        3 M NaCl  
                                       0,3 M Na<sub>3</sub>Citrat  
                                       pH 7,0

### 2.2.11 Klonierung der Expressionsplasmide

#### *H6-TAT-NLS-Flpe*

Für die Klonierung des H6-TAT-NLS-Flpe-Plasmids wurde aus dem publizierten Vektor pTriEx-HTNCre (Peitz et al., 2002) mit HindIII und XhoI ein Fragment herausgeschnitten und der Restvektor mit einem PCR-Amplifikat von Flpe ligiert. Das PCR-Produkt wurde zuvor mit HindIII und SalI geschnitten und konnte so gerichtet in den linearisierten Vektor eingefügt werden. Der resultierende Vektor wird als pTriEx-HTNFlpe bezeichnet.

Verwendete Primer für Flp-Amplifikat:

5'-Primer: 5'-TTAAGCTTGCCCAAGAAGAAGAGGAAGGT

3'-Primer: 5'-AAAGTCGACTAGGGCGCGCCTATGCGTCTATTTATGTAGGATGAAAG

#### *Nanog-Plasmide*

Die genetische Information für die Peptid-Anhänge der unterschiedlichen Nanog-Fusionsproteine wurde über PCR-Primer an die Nanog cDNA angehängt. Die Primer wurden so entworfen, dass sich das Start-ATG in die NcoI-Schnittstelle des parentalen pTriEx1.1 Plasmids integrieren ließ. Der C-terminale Bereich des rekombinanten Proteins wurde über die XhoI Schnittstelle in den Vektor eingefügt.

Verwendete Primer:

#### H6-TAT-NLS-Nanog

5'-Primer: 5'TCAGTAAGCTTGAAGAAGAAGAGGAAGGTGAGTGTGGGTCTTCCTGG

3'-Primer: 5'TCAGTCTCGAGTCATATTTACCTGGTGGAG

#### H6-TAT-Nanog

5'-Primer: 5'CTGAAACTAGTGTGGGTCTTCCTGGTCC

3'-Primer: 5'TCAGTCTCGAGTCATATTTACCTGGTGGAG

#### TAT-NLS-Nanog-H6

5'Primer:CTGAACCATGGGCGCTCGCAAGAAACGTCGCCAACGTCGCCGTCCGCCT  
AAAAAAAAGAGGAAAGTGAGTGTGGGTCTTCCTGGTC

3'Primer:5'CATGCTCGAGTTAGTGATGGTGATGGTGATGACCGCCTATTTACCTG  
GTGGAGTCAC

TAT-Nanog-H6

5':CTGAACCATGGGCGCTCGCAAGAAACGTCGCCAACGTCGCCGTCCGCCTAGTG  
TGGGTCTTCCTGGTCC

3'Primer:5'CATGCTCGAGTTAGTGATGGTGATGGTGATGACCGCCTATTTACCTG  
GTGGAGTCAC

NLS-Nanog-TAT-H6

5'Primer:CTGAACCATGGGCGCTAAAAAAGAGGAAAGTGAGTGTGGGTCTTCCT  
GGTC

3'Primer:CATGCTCGAGTTAGTGATGGTGATGGTGATGACCGCCAGGCGGACGGCG  
ACGTTGGCGACGTTTCTTGCGTATTTACCTGGTGGAGTCAC

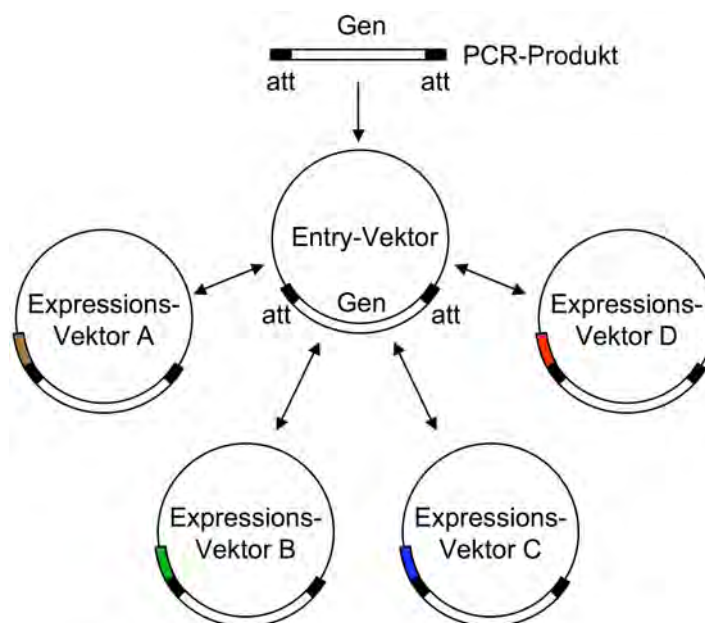
Nanog-TAT-H6

5'Primer: CTGAACCATGGGCGCTAGTGTGGGTCTTCCTGGTCC

3'Primer:CATGCTCGAGTTAGTGATGGTGATGGTGATGACCGCCAGGCGGACGGCG  
ACGTTGGCGACGTTTCTTGCGTATTTACCTGGTGGAGTCAC

*Gateway-Klonierung*

Bei dem Gateway-System (Invitrogen) handelt es sich um eine effiziente Klonierungstechnologie, die auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Phagen  $\lambda$  beruht. Es wird zuerst ein Eingangsvektor hergestellt von dem ausgehend das Gen von Interesse in alle gewünschten Expressionsvektoren kloniert werden kann.



**Schematische Darstellung der Gateway-Strategie**

Die Klonierung besteht im Wesentlichen aus drei Schritten:

### *1. Herstellung eines attB-PCR-Produkts*

Das Gen von Interesse muss zuerst mit attB-Rekombinationsstellen versehen werden. Diese bestehen aus 25 Basenpaaren und werden durch eine PCR mit Primern, an das zu exprimierende Gen fusioniert.

### *2. Erzeugung eines Entry-Vektors*

Im zweiten Schritt besteht wird das im sogenannten Donor-Vektor enthaltenen ccdB-Gen gegen das PCR-Produkt ausgetauscht. Das ccdB-Gen codiert ein für herkömmliche Klonierungsstämme toxisches Genprodukt. Das Rekombinationsprodukt wird transformiert und nur solche Bakterien überleben, die Vektoren ohne ccdB-Gen tragen. Zusammen mit der Antibiotika-Resistenz wird eine doppelte Selektion durchgeführt was die Grundlage für eine hohe Klonierungseffizienz ist. Die entstandenen Klone sind meist zu 99 % positiv für eine erfolgreiche Intergration des Gens von Interesse.

### *3. Erzeugung des Expressions-Vektors*

Der dritte Schritt besteht aus der Reaktion zwischen dem Eingangsvektor und dem Ziel-Vektor zur Herstellung des Expressionsvektors. Der Ziel-Vektor enthält ebenfalls das ccdB-Gen. Um erneut eine doppelte Selektion zu ermöglichen, trägt der Ziel-Vektor eine andere Antibiotika-Resistenz als der Eingangsvektor. Auch hier tragen nach der Selektion mehr als 99 % der Klone den gewünschten Expressionsvektor.

*Verwendete Primer zur Herstellung des attB-PCR-Produkts für TAT-Nanog:*

5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAAAACCTGTATTTCCAGGGCC  
CTAGGAAGAAACGTCGCCAACGTCGCCGTCCGCCTAAAAAGAAACGTAAAGTGA  
CTAGTGTGGGTCTTCCTGGTCC

3'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTACTCGAGTTAGTGATGGTGATG  
GTGATGACCGTCGACTATTTACCTGGTGGAGTCAC

*Verwendete Donorvektoren:*

pDest16; pTH1; pTH2; pTH3; pTH5; pTH6; pTH7; pTH8; pTH10; pTH18 (Hammarström et al., 2002; Woestenenk et al., 2003).

Die Klonierungsreaktionen wurden wie vom Hersteller (Invitrogen, Carlsbad) empfohlen durchgeführt.

---

## 2.3 Präparation rekombinanter Proteine

### 2.3.1 Proteinexpression

#### *HTNCre und HTNFlpe*

Im Folgenden wird eine typische Protein-Expression im Maßstab von 6 Liter Kulturvolumen beschrieben.

Von einer Glycerin-Kultur oder von einer Agarplatte wurden ca. 150 ml LB mit 1 % Glukose und 50 µg/ml Carbenicillin (beim TUNER BL21 (DE3) pLacI Stamm zusätzlich: 34 µg/ml Choramphenicol) mit dem Expressionsstamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 6 Liter auf 37 °C vorgewärmtes TB-Medium mit 1 % Glukose, 100 µg/ml Ampicillin (und ggfs. 34 µg/ml Choramphenicol) wurden auf drei sterile 5-Liter-Erlenmeyerkolben mit Schikane verteilt, 1 : 50 mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C mit 125 U/min geschüttelt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 1,5 wurde die Protein-Expression mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach ca. 2 h Induktion wurden die Bakterien bei 4 °C mit 6000 g für 15 min abzentrifugiert, der Überstand wurde vollständig abgossen, das Pellet im Trockeneis/Ethanol-Bad eingefroren (10 min) und bei – 20 °C gelagert.

#### *Nanog-Proteine*

Zur bakteriellen Überexpression, wurden Übernachtskulturen (LB mit 0.5% Glucose und 50 µg/ml Carbenicillin) mit frisch transformierten BL21 (DE3) GOLD Zellen (Stratagene) angeimpft und über Nacht bei 30°C im Schikanekolben kultiviert. Am nächsten Tag wurden Expressionskulturen (TB mit 0,5% Glucose und 100 µg/ml Ampicillin) 1 : 50 mit den Übernachtskulturen angeimpft, bei 37°C im Schikanekolben kultiviert und bei einer OD<sub>600</sub> von 1,5 mit 0,5 mM IPTG für 1h induziert. Die Pellets wurden eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

### 2.3.2 Native Affinitäts-Chromatografie von HTNCre

Das tiefgefrorene Bakterienpellet wurde in 10 ml Phosphatpuffer (PTB) pro Liter Expressionskultur resuspendiert. Zu dieser homogenen Suspension wurde Lysozym (Sigma-Aldrich) mit einer finalen Konzentration von 1 mg/ml gegeben. Die Lösung wurde für 15 – 30 min bei RT auf einem Magnetrührer gerührt bis sie viskos wurde. Zur Viskositätssenkung

wurde die Endonuklease Benzonase (Novagen) im Verhältnis 1:1000 (v/v) hinzu gegeben und für 15 – 30 min bei RT gerührt. Der Ansatz wurde auf Eis gekühlt und sonifiziert (1,5 min mit einem Zyklus von 5 Sekunden bei 45 % Leistung). Danach wurde ein gleiches Volumen an TSB (*tataric salt buffer*) hinzu gegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Der Puffer verhindert, dass das HTNCre später im Glycerinstock präzipitiert. Anschließend wurde das Zelllysate in einer Ultrazentrifuge (SS34 Rotor, Kendro) für 30 min mit 30.000 g bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig in 50 ml Falcongefäße überführt und mit 2 ml Nickel-Agarose-Matrix (Ni-NTA, Qiagen) pro Liter Expressionskultur versetzt und für 30 – 60 min bei 4°C vorsichtig geschüttelt. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Präparation im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Nach der Inkubation wurde die Suspension auf eine 20 ml Säule (Biorad) gegeben, deren Fritte die Nickel-Agarose-Matrix zurückhält. Es folgten zwei Waschstritte mit Waschpuffer in einem fünffachen Volumen des Säulenbetts. Eluiert wurde das HTNC mit Elutionspuffer in einem zwei- bis dreifachen Volumen des Säulenbetts. Kam es aufgrund noch ungelösten Proteins zu einer Trübung des Eluats wurde bis zur Klärung der Lösung weiterer Elutionspuffer zugegeben. Das Eluat wurde bis zur Dialyse auf Eis gelagert.

*10 x PTB (Phosphatpuffer):*

500 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

50 mM Tris

pH 7.8

*Waschpuffer:*

500 mM NaCl

1 x PTB

10 mM Imidazol

*TSB (Tartrat-Puffer):*

2 M Natrium-Tartrat

1 x PTB

20 mM Imidazol

*Elutionspuffer:*

500 mM NaCl

1 x PTB

250 mM Imidazol

### 2.3.3 Native Affinitäts-Chromatografie von HTNFlpe

Das tiefgefrorene Bakterienpellet wurde in 10 ml Lysepuffer pro Liter Expressionskultur resuspendiert. Zu dieser homogenen Suspension wurde Lysozym (Sigma-Aldrich) mit einer finalen Konzentration von 1 mg/ml gegeben. Die Lösung wurde für 15 – 30 min bei RT auf



einem Magnetrührer gerührt bis sie stark viskos wurde, so dass sie einer Gallerte glich. Zur Viskositätssenkung wurde die Nuklease Benzonase (Novagen) im Verhältnis 1:600 (v/v) zugegeben und für 15 – 30 min bei RT gerührt. Der Ansatz wurde mit dem gleichen Volumen NaCl-Puffer vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 2 min mit einem Zyklus von 5 Sekunden bei 50 % Leistung auf Eis sonifiziert. Anschließend wurde das Zellysate in einer Zentrifuge (SS34 Rotor, Kendro) für 30 min mit 30.000 g bei 4°C pelletiert. Die lösliche Fraktion (klarer Überstand) wurde vorsichtig in 50 ml Falcongefäße überführt, mit 1 ml einer Nickel-Agarose-Matrix (Ni-NTA, Qiagen) pro 10 ml Lysepuffer versetzt und für 30 – 60 min bei 4°C vorsichtig geschwenkt. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach der Inkubation wurde die Suspension auf eine 20 ml Säule (Biorad) gegeben, deren Fritte die Nickel-Agarose-Matrix zurückhält. Es folgten zwei Waschschritte mit vierfachen Volumen des Säulenbetts wobei das Säulenbett der Hälfte des verwendeten Volumens an Ni-NTA entspricht (50%ige Suspension). Mit dem vierfachen Säulenbett-Volumen Elutionspuffer wurde das rekombinante Flpe-Protein eluiert. Bei Trübungen der Eluatfraktion durch unvollständig gelöstes Protein wurde bis zur Klärung weiterer Elutionspuffer zugegeben. Das Eluat wurde bis zur Dialyse auf Eis gelagert.

*Lysepuffer (10 x PTB)*

500 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

50 mM Tris

pH 7.8

*Elutionspuffer:*

750 mM NaCl

1 x PTB

250 mM Imidazol

*NaCl- Puffer:*

2 M NaCl

1 x PTB (s. o.)

20 mM Imidazol

*Waschpuffer:*

500 mM NaCl

1 x PTB

10 mM Imidazol

### 2.3.4 Native Affinitäts-Chromatografie von Nanog-Proteinen

Zur Aufreinigung wurden die eingefrorenen Bakterien eines Liters Expressionskultur in 20 ml Lysepuffer aufgenommen. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach vollständigem Resuspendieren wurde die Suspension für den Zellaufschluss 20 min mit Lysozym (1 mg/ml final) und anschließend zur Senkung der Viskosität mit Benzonase (unspezifische Nuklease (Novagen), 25 U/ml final) behandelt. Unlösliches Material im Lysat wurde durch einen Zentrifugationsschritt (35.000 g, 30 min, 4°C) entfernt. Der lösliche Überstand wurde dann 1 h mit 1 ml Ni-NTA Suspension (*slurry*) (Qiagen) pro Liter initialer Bakterien-Kultur inkubiert. Das Säulenmaterial wurde in eine Plastiksäule (Econo-Pac, Bio-Rad) gegossen und zweimal mit 4 Bettvolumina Waschpuffer gewaschen. Zum Eluieren des Proteins wurden 8 Bettvolumina Elutionspuffer auf die Säule gegeben.

Lysepuffer: 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM Tris, pH 7,8

Waschpuffer: 10 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM Tris, pH 7,8

Elutionspuffer: 250 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM Tris, pH 7,8

### 2.3.5 Überführung von HTNCre in Glyzerinpuffer

Zum Pufferaustausch wurden die Proteine bei 4°C im Kühlraum dialysiert. Alle verwendeten Glasgeräte sowie Medien wurden vorgekühlt. Es wurde ein Dialyseschlauch mit einer mittleren Ausschlussgröße von 5 kDa (Roth, Karlsruhe) auf die erforderliche Größe zurechtgeschnitten und kurz mit MPW und dann mit Dialysemedium durchgespült. Das zu dialysierende Volumen wurde in den Schlauch gefüllt und dieser in ein Becherglas mit Dialysemedium gegeben. Dialysiert wurde meist gegen einen 50 – 100-fachen Überschuss an Dialysemedium. Dabei wurde zweimal nach mindestens einer Stunde das Medium gewechselt und der letzte Dialyseschritt wurde über Nacht durchgeführt. Zur Beschleunigung der Diffusionsvorgänge wurde das Dialysemedium mit einem Magnetrührer gemischt.

Die Eluatfraktion mit HTNCre wurde zunächst für 5 min bei 5000 g und 4°C zentrifugiert, um den Elutionspuffer von Präzipitaten zu befreien. Anschließend wurde dieser über Nacht gegen einen Hochsalzpuffer dialysiert. In diesem ist HTNCre bis zu einer Konzentration von 4 mg/ml löslich. Danach wurde das Dialysat des Hochsalzpuffers zweimal gegen einen 50 %igen

---

Glycerinpuffer dialysiert. Der erste Dialyseschritt dauert einige Stunden und der zweite Dialyseschritt über Nacht. Die Dialyse gegen den Glycerinpuffer konzentriert die HTNCre-Lösung um den Faktor 3,5 auf. Der Glycerinstock wird bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Lösung wird zur Transduktion direkt ins gewünschte Medium gegeben und dann sterilfiltriert.

Hochsalzpuffer:

600 mM NaCl

20 mM HEPES

pH 7,4

Glycerinpuffer:

500 mM NaCl

50 % (v/v) Glycerin

20 mM HEPES

pH 7,4

### **2.3.6 Überführung von HTNFlpe in stabilisierenden Puffer**

Die Eluatfraktion mit HTNFlpe wurde zunächst für 5 min bei 5000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, um den Elutionspuffer von Präzipitaten zu befreien. Der Zentrifugationsschritt dient dem Abtrennen von unlöslichen Bestandteilen. Der erste Dialyseschritt erfolgte gegen das hundertfache Volumen an FCB-Puffer für mindestens eine Stunde. Es wurde ein zweites Mal gegen das hundertfache Volumen an FCB-Puffer dialysiert, diesmal über Nacht. Am Folgetag wurde das Dialysat über Ultrafiltration konzentriert und dazu in 15 ml Ultrafiltrationseinheiten (10.000 MWCO, Vivascience) überführt. Diese Filter besitzen eine Membran, welche Moleküle bis zu einer Größe von 10 kDa passieren lässt. Durch Zentrifugation mit 3500 U/min bei  $4^{\circ}\text{C}$  (Heraeus Megafuge 1.0R) wurde die Ultrafiltration des Puffers beschleunigt. Das Volumen wurde um 80 % reduziert und die Konzentration des rekombinanten Flpe-Proteins um den Faktor 5 erhöht, sodass final die Konzentration meist 100 – 120  $\mu\text{M}$  betrug. Die Stocklösung wurde sterilfiltriert (0,2  $\mu\text{m}$ ), in Kryoröhrchen allquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Lösung wird zur Transduktion direkt ins gewünschte Medium gegeben, zentrifugiert und dann die Protein-Konzentration mit Bradford-

Reagenz bestimmt.

FCB (*Flp concentration buffer*):

2 mM NaCl

1 mM DTT

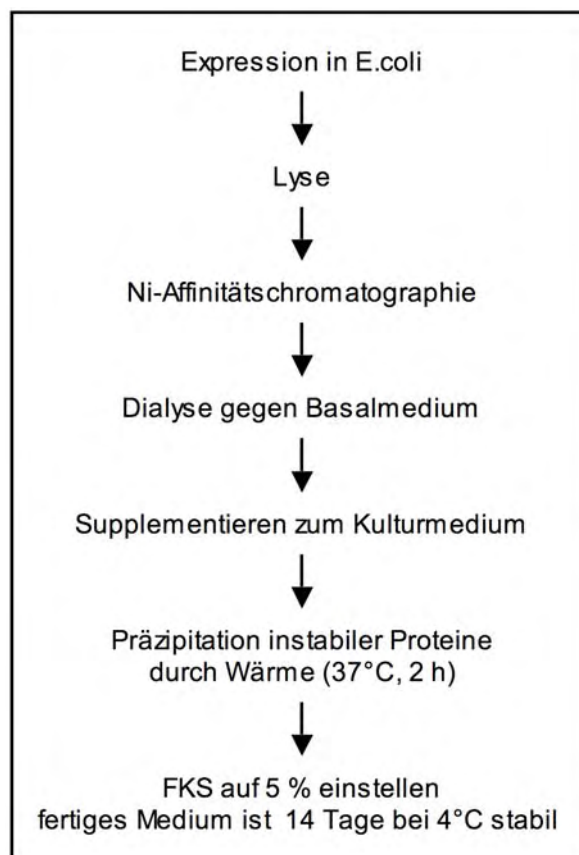
1 mM EDTA

5 % (v/v) Glycerin

50 mM HEPES

pH 7,4

### 2.3.7 Herstellung des Nanog-TAT Transduktionsmediums



Ablauf der Herstellung des Mediums zur Nanog-Proteintransduktion

Die eluierte Fraktion mit Nanog-TAT-Protein wurde zweimal für mindestens 1 h gegen PBS und anschließend über Nacht gegen K.O.-DMEM (Invitrogen) dialysiert. Die ersten beiden Dialyseschritte können auch gegen K.O.-DMEM erfolgen, doch PBS ist eine preisgünstigere

---

Alternative. Nach der Dialyse wurde das Dialysat zentrifugiert (30 min, 6000 g, 4°C) und steril filtriert (0,2 µm). Anschließend wurde es im Verhältnis 1 : 1 mit zweifach-supplementierten Medium (Zusammensetzung: s. u.) gemischt und für 2 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert um die maximal mögliche Nanog-TAT-Konzentration bei 37°C einzustellen. Das Medium wurde dann wieder zentrifugiert und steril filtriert um es von Präzipitaten zu befreien. Schließlich wurde die FKS-Konzentration auf 5 % final eingestellt. Das so fertig gestellte Medium hatte eine Konzentration von ca. 100 nM. Es wurde bei 4°C gelagert und für maximal zwei Wochen verwendet.

*Zweifach-supplementiertes Medium (100ml)*

- 94 ml Advanced DMEM (Invitrogen)
- 2 ml FCS
- 1 ml ITS-Supplement (Invitrogen)
- 2 ml L-Glutamin (Stocklösung: 200 mM)
- 1 ml nicht-essentielle Aminosäuren (Invitrogen)
- 0,2 ml β-Mercaptoethanol (Stocklösung: 100 mM)

### **2.3.8 Herstellung des LIF-Inhibitors**

Der LIF-Inhibitor hLIF-05 (Vernallis et al., 1997; Expressionsvektor wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt) wurde von COS-7 Fibroblasten hergestellt und ins Medium sekretiert. Dazu wurden 6 konfluente T75 Flaschen mit COS-7 Zellen trypsinisiert und in 3,2 ml HBS Puffer aufgenommen. Aliquots von 800 µl wurden mit 120 µg Plasmid elektroporiert (200 V, 500 µFd). Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die Zellen mit je 10 ml Medium versetzt und in 15 cm-Platten ausgesät in denen bereits 20 ml Medium vorgelegt wurde. Am nächsten Tag wurde das alte Medium durch 25 ml frisches ersetzt. Nach 3 weiteren Tagen wurde das mit hLIF-05 konditionierte Medium steril filtriert und in Aliquots bei - 80°C eingefroren. Der Aktivitätstest wird im Ergebnisteil beschrieben.

---

### 2.3.9 Herstellung und Ansetzen von dTAT-HA2

Die Herstellung des Peptid dTAT-HA2 wurde von der Firma Invitrogen durchgeführt. Das Peptid besteht aus D-Aminosäuren und hat folgende Aminosäuresequenz:

RQRRKKRGGDIMGEWGNEIFGAIAGFLG

Das lyophilisierte Peptid wurde in Reinstwasser mit 1 mM DTT aufgenommen und auf eine Konzentration von 500  $\mu$ M eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## 2.4 Immunhistochemie und Färbungen

### 2.4.1 Immunhistochemie

Für Immuno-Färbungen von Embryoid-Körperchen wurden in Paraffin eingebettete Schnitte in einem Färbeautomaten (DakoCytomation) nach Herstellerangaben mit folgenden Antikörpern gefärbt: Maus Anti-Cytokeratin (Chemicon), Maus Anti- $\alpha$ -Desmin and Kaninchen Anti-Human  $\alpha$ -1-Fetoprotein (beide von DakoCytomation). Zur Visualisierung der Antikörperbindung wurde das EnVision System (DakoCytomation) mit HRP-konjugierten sekundären Antikörpern gegen Maus und Kaninchen benutzt mit Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen. Für Immuno-Färbungen wurden die Zellen zuerst für 10 min bei RT mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Für Doppelfärbungen wurden die fixierten Zellen sukzessive mit folgenden Antikörpern behandelt: anti-SSEA1 (Maus IgM, 1:80; Hybridoma Bank), Biotin anti-Maus IgM (1:200, DAKO) in Kombination mit FITC-Avidin, anti-Oct4 (Kaninchen IgG, 1:400, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), Cy3 Ziege anti-Kaninchen IgG (1:400, Jackson Immuno Research). Zur intrazellulären Färbung wurde 0,1 % Triton zu den Antikörper-Lösungen gegeben. Die DNA des Zellkerns wurde mit DAPI angefärbt. Zum Nachweis von Alkaline Phosphatase Aktivität wurden das Alkaline Phosphatase Substrate Kit III (Vector Laboratories, Inc.) nach Herstellerangaben benutzt (gibt blaues Reaktionsprodukt). In einigen Experimenten wurde die Alkaline Phosphatase Aktivität mit dem Alkaline Phosphatase Detection Kit (Chemicon) nachgewiesen (rotes Reaktionsprodukt).

## 2.4.2 X-Gal-Färbung

Die  $\beta$ -Galaktosidase wird wegen ihrer unkomplizierten Handhabung und ihrem eindeutigen Nachweis in vielen Systemen als Reporterprotein genutzt.

Das Enzym setzt ein synthetisches Substrat (X-Gal, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galaktosid) zu einem blauen Farbstoff um, der in den Zellen leicht zu erkennen ist. Beim Transgen der Fibroblasten ist an das Enzym noch ein NLS (Kernlokalisierungssignal) fusioniert. Dadurch wird der Großteil des Enzyms im Zellkern aufkonzentriert, sodass sich ausschließlich der Zellkern blau anfärbt.

Auf die fixierten und gewaschenen Zellen wurde frisch angesetzte X-Gal-Färbelösung gegeben und für 24 h bei 37 °C inkubiert.

X-Gal-Färbelösung:            5 mM  $K_3(Fe^{III}(CN)_6)$   
                                      5 mM  $K_4(Fe^{II}(CN)_6)$   
                                      2 mM  $MgCl_2$   
                                      1 mg/ml X-Gal (Stocklösung in DMSO, c = 40 mg/ml)  
                                      gelöst in PBS

## 2.5 Zellkultur

### 2.5.1 Fibroblasten

CV1-5B-, COS-7-Fibroblasten und murine, embryonale Fibroblasten (MEFs) wurden in folgendem Medium kultiviert: DMEM (high glucose) mit 10% FCS, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, Natrium Pyruvat, 2 mM L-Glutamin. Die Zellen wurden alle 3 – 4 passagiert und alle 2 Tage das Medium gewechselt.

### 2.5.2 Murine embryonalen Stammzellen

Embryonale Stammzellen der Maus wurden in mit Gelatine beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Die Kultur-Medien hatten folgende Zusammensetzung: Basalmedium mit 15% FCS, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, Natrium-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin and 100  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol and 1000 U/ml LIF (Chemicon). Als Basalmedium diente DMEM (high glucose) oder KnockOut DMEM (beide von Invitrogen). Für serumreduzierte Kulturen wurde

Advanced DMEM (Invitrogen) mit 5% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol and 1000 U/ml LIF genutzt. Für serumfreie Kulturen wurde N2B27 Medium (Ying et al., 2003) nach folgender, modifizierter Zusammensetzung benutzt: DMEM-F12 und Neurobasalmedium (1:1 Mischung) supplementiert mit: 1 x B27, 50  $\mu$ g/ml BSA (Fraktion V), 100  $\mu$ g/ml Apo-Transferrin, 25  $\mu$ g/ml Insulin, 6 ng/ml Progesteron, 16  $\mu$ g/ml Putrescin, 30 nM Natrium-Selenit, 2 mM Glutamin, 150  $\mu$ M Monothioglycerin, 10 ng/ml BMP-4 und 1000 U/ml LIF.

Die Zellen wurden alle 2 – 4 Tage mit Trypsin (Invitrogen) oder Trypsin-ähnlichem Enzym (TrypLE, Invitrogen) abgelöst, vereinzelt und auf neue Kulturplatten ausgesät. Zur Cryokonservierung wurden die Zellen mit in einer Mischung aus 90% FKS mit 10 % DMSO versetzt und langsam in einer Styropor-Box eingefroren.

### 2.5.3 Humane embryonalen Stammzellen

Das Kulturmedium der humanen ES-Zellen wurde täglich erneuert. Alle drei bis sechs Tage wurden die humanen ES Zellen passagiert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen, und die Zellen wurden für 45 Minuten mit 1mg/ml Kollagenase IV (0,5ml pro Well) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kollagenase mit 1ml hES Zellmedium pro Well verdünnt, und die Kolonien wurden von der Zellkulturplatte abgespült oder vorsichtig mit der Spitze einer 5ml-Zellkulturpipette abgekratzt. Die Zellsuspension wurde für 3 Minuten bei 800rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml humanes ES-Zellmedium aufgenommen. Die hES Zellaggregate wurden mit einer 1000  $\mu$ l-Eppendorfpipette resuspendiert, bis nur noch kleine Aggregate sichtbar waren. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:1 bis 1:3 in hES Zellmedium auf mitotisch inaktivierte Fibroblasten ausplattiert. Nach spätestens einer Woche wurden die humanen ES-Zellen wieder umgesetzt.

*Kulturmedium für humane ES-Zellen:*

20% Knockout-Serum Replacement

1% Nicht-essentielle Aminosäuren

1mM L-Glutamin

0,1mM 2-Mercaptoethanol

4ng/ml FGF-2

gelöst in Knockout-DMEM



---

*Konditioniertes Medium*

50 ml humanes ES-Zellmedium mit 4ng/ml FGF-2 pro  $10^6$  mitotisch inaktivierte Fibroblasten  
Nach 24 h Inkubation im Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> erfolgt die Abnahme und Filtration des Mediumüberstands. Die Lagerung findet bei -20°C statt. Vor Gebrauch erneute Zugabe von 4ng/ml FGF-2.

**2.5.4 Embryoidkörper und Teratombildung und Blastozysten-Injektion**

Oct4-GiP ES Zellen wurden für 12 Passagen LIF-frei in der Anwesenheit des LIF-Inhibitors hLIF-05 und Nanog-TAT kultiviert. Kontroll-Zellen ohne Nanog-TAT differenzierten innerhalb von vier Passagen und stellten die Proliferation ein. Zwei Tage vor Aggregation der Zellen wurde 1µg/ml Puromycin zur Kultur gegeben um andifferenzierte Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden dann vereinzelt und die Suspensionskulturen wurden für 2 Wochen in LIF-freiem ES Zellmedium in Petri-Schalen kultiviert. Für die Teratom-Bildung wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt, nur dass die Zellen für Zellen für 11 Passagen ohne LIF mit Nanog-TAT behandelt wurden. Danach wurde zu diesem Medium LIF wieder gegeben um die Zellen zu expandieren um  $1 \times 10^6$  Zellen in eine SCID-beige Maus zu injizieren. Nach 8 Wochen wurden das entstandene Teratom aus der Maus entfernt, mit 4% PFA fixiert und mit Hematoxylin und Eosin zur histologischen Untersuchung gefärbt. Zur Herstellung chimärer Mäuse wurden die Oct4-GiP ES Zellen für 8 Passagen ohne LIF, aber mit LIF-Inhibitor und Nanog-TAT kultiviert. Kontrollkulturen sind auch in diesem Fall innerhalb der ersten 4 Passagen differenziert. Nach der 8. Passage wurden die Zellen in normalem ES Zellmedium expandiert und in C57BL/6 Blastozysten injiziert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Genetische Manipulation mit transduzierbarer Cre Rekombinase

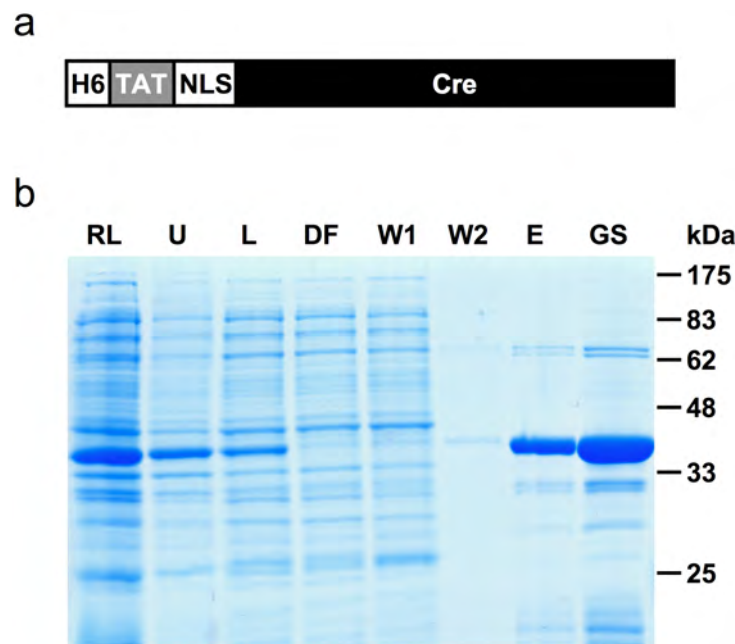
Zur Etablierung eines transduzierbaren Nanog-Proteins wurden zunächst weitere Erkenntnisse zur Protein-Transduktion in ES-Zellen gewonnen. Hierzu wurde eine zellpermeable Cre Rekombinase (Peitz et al., 2002) verwendet, da sich nach erfolgter Transduktion die biologische Aktivität einer Rekombinase über Methoden wie Southern-Blots oder Reporter-gen-Aktivierung zuverlässiger nachweisen lässt, als die Aktivität eines Transkriptionsfaktors wie Nanog. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war noch unklar, ob die überwiegend mit Fibroblasten etablierte Protein-Transduktion effizient mit ES-Zellen in herkömmlichem, FKS-haltigem ES-Zellmedium durchführbar ist. Darüber hinaus musste geklärt werden, ob eine Behandlung mit rekombinantem Cre-Protein die Pluripotenz bzw. Keimbahn-Kompetenz muriner ES-Zellen beeinflusst.

#### 3.1.1 Verbesserte Präparation des transduzierbaren Cre Proteins

Das rekombinante Cre-Fusionsprotein HTNCre (Peitz et al., 2002) besteht neben der Wildtyp-Cre Rekombinase, aus einem N-terminalen 6 x Histidin-*tag* (H6), einer TAT-Domäne und einem Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*; NLS)(Abb. 5a).

Die sechs Histidine ermöglichen eine einfache Nickel-Ionen-Affinitätschromatografie, und die NLS-Sequenz soll den Zugang des bakteriellen Proteins zum Zellkern eukaryotischer Zellen erleichtern. Das TAT-Peptid ist eine stark basische Protein-Transduktionsdomäne mit dessen Hilfe das Protein effizient in Zellen translozieren kann (siehe Einleitung). Durch die beschriebenen Anhänge erhöht sich das Molekulargewicht des Fusionsproteins von ca. 38 kDa (Wildtyp Cre) auf ca. 43 kDa. Das vorgestellte Konstrukt H6-TAT-NLS-Cre wird im Folgenden mit HTNCre abgekürzt.

Die Expression und Aufreinigung von HTNCre ist bereits beschrieben (Peitz et al., 2002), doch im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde das Präparationsprotokoll für HTNCre optimiert. Zuvor musste für nahezu jedes einzelne Experiment HTNCre-Protein frisch präpariert werden, was mit beträchtlichem Aufwand verbunden war, da das Protein gegen Basalmedien dialysiert werden musste, um toxisches Imidazol des Chromatographie-Puffers zu entfernen, und um die Osmolarität der Lösung auf physiologisches Niveau zu bringen.



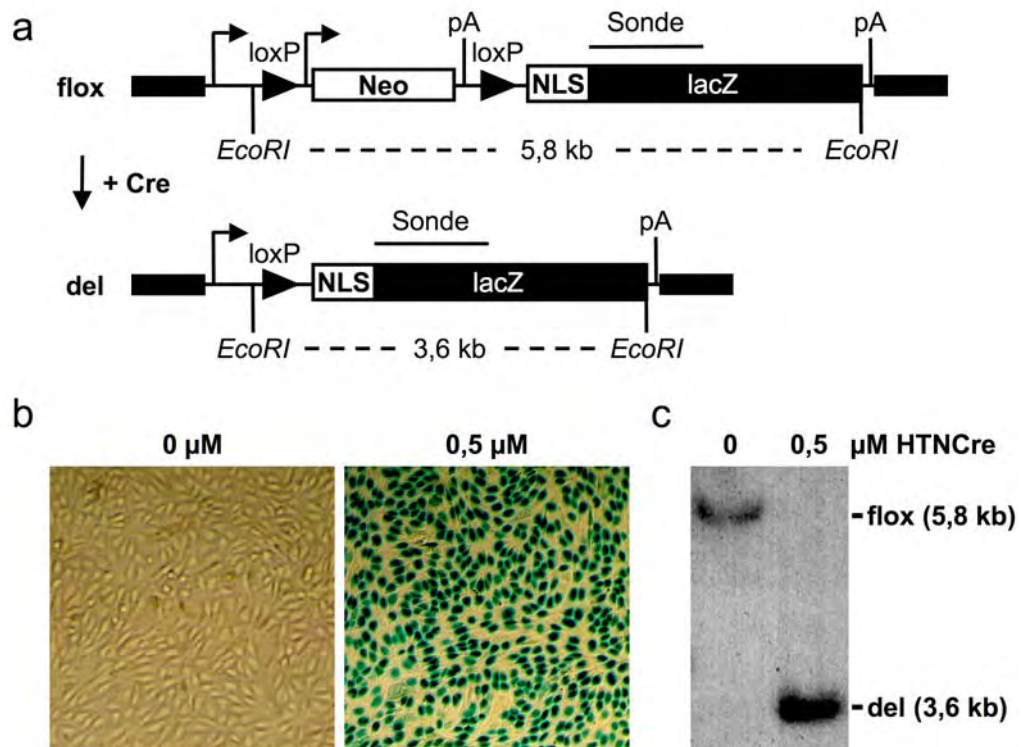
**Abb. 5: Aufbau und Reinigung des transduzierbaren Cre-Fusionsproteins HTNCre**

**a)** Aufbau von HTNCre (Peitz et al., 2002). **b)** Das gezeigte Konstrukt wurde in *E. coli* transformiert, die Expression induziert, die lösliche Proteinfraktion einer Ni(II)-Affinitätschromatographie unterzogen und das Eluat in einen lagerfähigen Glycerinpuffer überführt. Fraktionen des Reinigungsverlaufs wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie angefärbt. In jede Spur wurden 2,5  $\mu$ l Probe aufgetragen. H6, sechs Histidine zur Nickel-Ionen-Affinitätschromatographie; NLS (nuclear localization signal des Simian Virus 40 large-T antigens), für verbesserten Import des Proteins in den Zellkern; TAT, basische Protein-Transduktions-Domäne, verstärkt Zellpermeabilität; RL, Rohlysat (Gesamtprotein); U, unlösliche Fraktion; L, lösliche Fraktion; DF, Säulen-Durchfluss; W, Waschfraktion; E, Elutionsfraktion (120  $\mu$ M); GS, Glycerinstock (450  $\mu$ M)

Dabei ging zusätzlich mehr als die Hälfte des gereinigten Proteins durch Präzipitation verloren. Zur Umgehung verlustreicher Dialyseschritte und zur vereinfachten Lagerung wurde das Protein in einen gepufferten, 50%igen Glycerinstock überführt. In Abb. 5b ist eine charakteristische Aufreinigung des Proteins aus bakteriellem Lysat zu sehen. Man sieht in der Fraktion des Eluats (120  $\mu$ M) und des konzentrierten Glycerinstocks (450  $\mu$ M) auf der erwarteten Laufhöhe von ca. 43 kDa eine dominante Bande, wohingegen unter- und oberhalb dieser Bande nur schwache Doppelbanden zu erkennen sind (Laufhöhen ca. 30 bzw. ca. 70 kDa). Western-Blot-Analysen mit einem anti-Cre-Antikörper zeigten, dass nur die dominante Bande von dem Antikörper detektiert wird (Peitz et al., 2002). In dem Glycerinstock liegt das Cre-Protein nun hochkonzentriert (200 – 450  $\mu$ M) bei - 20°C in flüssigem Zustand vor und ist unter diesen Bedingungen nach eigenen Beobachtungen mindestens 3 Jahre lagerfähig. Die für das jeweilige Experiment benötigte Proteinmenge kann exakt entnommen und in das entsprechende Zellkultur-Medium nahezu verlustfrei verdünnt werden. Nach erfolgter Sterilfiltrierung lässt sich das Medium mit dem verdünnten Protein sofort verwenden. Durch das optimierte Präparationsprotokoll wurde die Anwendung der Cre-Transduktion deutlich vereinfacht und somit routinetauglicher.

### 3.1.2 Charakterisierung der Cre-Protein-Transduktion mit Cre-Reporterfibroblasten

Um vereinfacht die Cre-Protein-Transduktion charakterisieren zu können, wurden etablierte Reporter-Fibroblasten verwendet (Kellendonk et al., 1996). Bei diesen Zellen handelt es sich um die CV1-5B-Linie welche sich von Nierenzellen der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) ableitet (Jensen et al., 1964) In diese Zellen wurde eine Kopie eines lacZ-basierten Cre-Reporter-Transgens stabil integriert. Der schematische Aufbau dieses Konstruktes ist in Abb. 6a dargestellt. Durch Cre-vermittelte Rekombination wird das Neomycin-Resistenzgen deletiert (d. h. das Neomycin-Phosphotransferase-Gen) und das neu entstandene Leseraster ermöglicht die Transkription des LacZ-Gens, welches für das  $\beta$ -Galaktosidase-Enzym kodiert. Dieses Enzym wurde zur Anreicherung im Zellkern mit einem Kernlokalisationsignal (NLS) versehen. Der Nachweis der Rekombination in einer Zelle kann nun indirekt über eine X-Gal-Färbereaktion erbracht werden. In Abb. 6b. findet man beispielhaft X-Gal-gefärbte Reporterzellen nach einer Inkubation von 0,5  $\mu$ M HTNCre für 16 h im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen. Man sieht deutlich, dass in der Kontrollpopulation keine blau



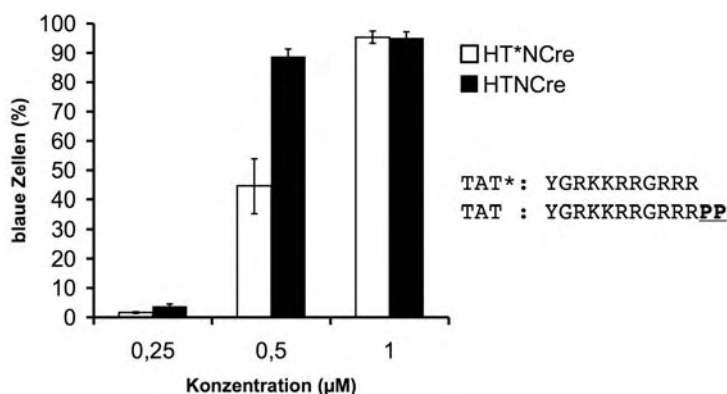
**Abb. 6: Korrelation von Phäno- und Genotyp der Cre-Reporter-Fibroblasten**

**a)** Aufbau des Reporterkonstruktes der Cre-Reporter-Fibroblasten (Kellendonk et al., 1996). Ein loxP flankiertes Neomycin-Resistenzgen (*flox*) mit einer poly-Adenylierungsstelle (pA) verhindert die Transkription des NLS-LacZ-Gens. Nach Cre-vermittelter Deletion (*del*) wird das NLS-LacZ-Gen transkribiert. **b)** Die Fibroblasten wurden für 16 h mit 0,5  $\mu$ M HTNCre behandelt, und nach weiteren 24 h unter Standard-Bedingungen mit X-Gal auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gefärbt. **c)** Die Reporterzellen wurden wie in b) behandelt, die genomische DNA mit EcoRI verdaut und mit einer LacZ-Sonde eine Southern-Blot-Hybridisierung durchgeführt. Gezeigt ist der Röntgenfilm des Experiments.

gefärbte Zelle erkennbar ist. Bei den HTNCre-behandelten Zellen haben dagegen fast alle Zellen einen blau gefärbten Kern, das Zytoplasma ist stets ungefärbt. Eine Southern-Blot-Analyse gleichartig transduzierter Zellen zeigt, dass der Phänotyp der Reporterzellen mit dem Genotyp korreliert (Abb. 6c). Bei den unbehandelten Zellen ist nur eine Bande bei 5,8 kb für das loxP-flankierte Allel sichtbar. Bei den mit HTNCre behandelten Zellen dagegen ist auf dieser Höhe kein Signal zu erkennen, sondern nur bei einer Größe von 3,6 kb, was dem deletierten Locus entspricht.

### 3.1.3 Zusätzliche Proline an der TAT-PTD erhöhen Transduktionseffizienz

Die in der Literatur beschriebene Protein-Transduktionsdomäne TAT hat meist folgende Aminosäure-Sequenz: YGRKKRRGRRR. Beim Wildtyp-Protein *HIV transactivator of transcription*, aus welchem die TAT-Domäne isoliert wurde, schließen sich C-terminal der TAT-Sequenz noch zwei Proline an, die einen Einfluss auf diese Sekundärstruktur des Peptids haben und seine Translokations-Eigenschaften beeinflussen könnten. Daher wurde seinerzeit bei dem Konstrukt HTNCre die TAT-Domäne mit den beiden Prolinen versehen (Peitz, 2002). Um den tatsächlichen Einfluss der Proline auf die Transduktion beurteilen zu können, wurde eine Variante des HTNCre Proteins hergestellt bei der die beiden Proline entfernt wurden. Dieses Protein wurde als HT\*NCre bezeichnet. Die beiden Cre-Varianten wurden anhand der Cre-Reporter-Fibroblasten miteinander verglichen. In Abb. 7 ist die graphische Quantifizierung des Experiments zu sehen, bei dem steigende Cre-Konzentrationen für 16 h zu den Zellen gegeben wurden. Bei 0,25  $\mu\text{M}$  ist zwar die Rekombinationsrate mit 1,6 % (HT\*NCre) bzw. 3,7 % (HTNCre) generell noch gering, doch die Variante ohne Proline zeigt bereits eine um ca. 50 % reduzierte Effizienz. Deutlicher wird der Unterschied mit der doppelten Menge an Cre-Protein (0,5  $\mu\text{M}$ ). Bei dieser Konzentration führt das HTNCre-



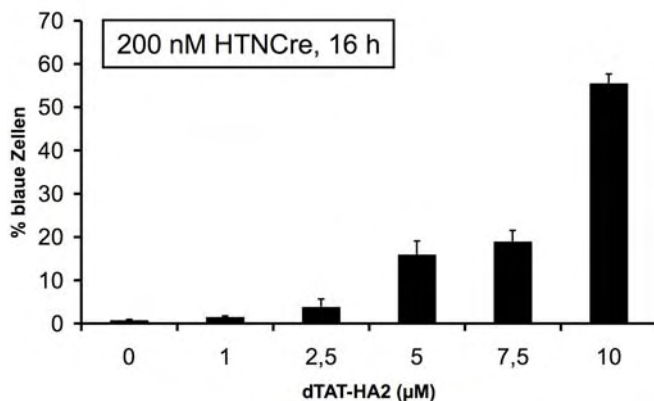
**Abb. 7: Erhöhte Transduktionseffizienz durch zusätzliche Proline in der TAT-PTD**

Vergleich zweier TAT-Varianten fusioniert an Cre. Bei der Version „TAT\*“ fehlen die zwei Proline des TAT-Wildtyp-Proteins. CV1-5B Reporter-Fibroblasten wurden für 16 h wie im Diagramm angegeben behandelt. Die Zellen wurden dann für 24 h unter Standard-Bedingungen weiter kultiviert, mit X-Gal gefärbt und der Anteil  $\beta$ -Galaktosidase-positiver Zellen ausgezählt. (n = 3)

Protein mit den zusätzlichen Prolinen bei fast allen Zellen zur Rekombination, wohingegen HT\*NCre nur bei knapp der Hälfte der Zellen Rekombination vermitteln kann.

### 3.1.4 Steigerung der Transduktions-Effizienz mit dem fusogenen Peptid dTAT-HA2

Im Verlauf dieser Doktorarbeit erschien eine Publikation, in welcher berichtet wurde, dass durch eine Ko-Transduktion mit dem fusogenen dTAT-HA2 Peptid makropinozytotische Einschlüsse aufgebrochen werden und die Menge an intrazellulär freigesetztem TAT-Fusionsprotein erhöht werden kann (Wadia et al., 2004). Das dTAT-HA2 Peptid ist eine Fusion aus einer TAT-PTD und den N-terminalen 20 Aminosäuren einer Untereinheit des Hemagglutininproteins (HA2) vom Influenzavirus. HA2 ist ein gut charakterisiertes pH-sensitives, fusogenes Peptid, das bei niedrigem pH Zelllipidmembranen destabilisiert. Dieses chemisch synthetisierte Peptid wurde auf seine Funktionalität hin untersucht. Dazu wurde eine nicht-sättigende Bedingung mit einer HTNCRE-Konzentration von 0,2  $\mu\text{M}$  gewählt, welche nach einer 16-stündigen Inkubation bei weniger als 1 % der Reporter-Fibroblasten zur Rekombination führt. Zu dem HTNCRE-haltigen Medium wurden steigende Konzentrationen des Peptids zugegeben (zwischen 1 und 10  $\mu\text{M}$ ) (Abb. 8). Die Zugabe von 1 bzw. 2,5  $\mu\text{M}$  dTATHA2 erhöhte die Effizienz um einen Faktor von ca. 2 bzw. 4. Eine weitere Erhöhung auf 5 bzw. 7,5  $\mu\text{M}$  führte zur Rekombination in 16 % bzw. 19 % der Zellen. Im Vergleich zu den Kontroll-Zellen konnte bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine Steigerung um den Faktor 60 erzielt werden (ca. 55 % Rekombination). Bei Konzentrationen über 5  $\mu\text{M}$  konnte beobachtet werden, dass die Zellen in den untersuchten Kulturschalen weniger dicht gewachsen sind als bei geringeren dTAT-HA2-Mengen.

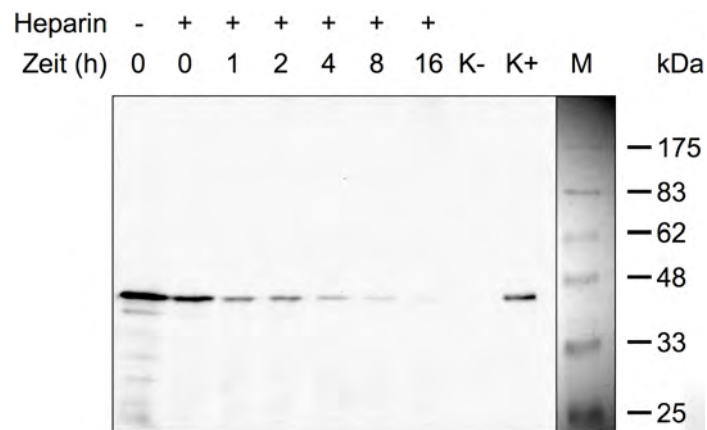


**Abb. 8:**  
**Erhöhung der Protein-Transduktionseffizienz mit dTAT-HA2**

Das fusogene Peptid dTAT-HA2 soll durch Aufbruch makropinozytotischer Einschlüsse die Menge an intrazellulär freigesetztem TAT-Fusionsprotein erhöhen (Wadia 2004). Um die Funktionalität des Peptids zu testen, wurden davon steigende Konzentrationen bei konstanter HTNCRE-Konzentration für 16 h zu den Cre-Reporter-Fibroblasten gegeben. Die Zellen wurden dann für 24 h unter Standard-Bedingungen weiter kultiviert, mit X-Gal gefärbt und der Anteil  $\beta$ -Galaktosidase-positiver Zellen ausgezählt. (n = 3)

### 3.1.5 Stabilität von HNTCre in der Zelle

Um zu analysieren, wie lange das Protein in den Zellen stabil ist, wurden CV1-5B Zellen für eine Stunde mit 2  $\mu\text{M}$  HTNCre behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten das Gesamtprotein der Zellen präpariert. An der Zelloberfläche haftendes Cre-Protein wurde entfernt, indem die Zellen mit der Protease Trypsin behandelt und anschließend noch mit einer 0,5 % Heparinlösung gewaschen wurden. Diese Art der Behandlung entfernt zu mehr als 95 % extrazellulär gebundenes Protein (Kaplan et al., 2005). Die Lysate von je  $2 \times 10^5$  Zellen wurden mittels Western Blot unter der Verwendung eines anti-Cre Antikörper analysiert (Abb. 9). Die Cre-spezifische Bande zum Zeitpunkt 0 h ist ohne den Heparin-Waschschritt intensiver als bei der behandelten Probe. Bereits zum Zeitpunkt 1 h bzw. 2 h hat sich das Signal für Cre stark abgeschwächt, und reduziert sich gleichmäßig weiter bis zum Zeitpunkt 16 h, an welchem kaum noch Cre-Protein im Zelllysate detektierbar ist.

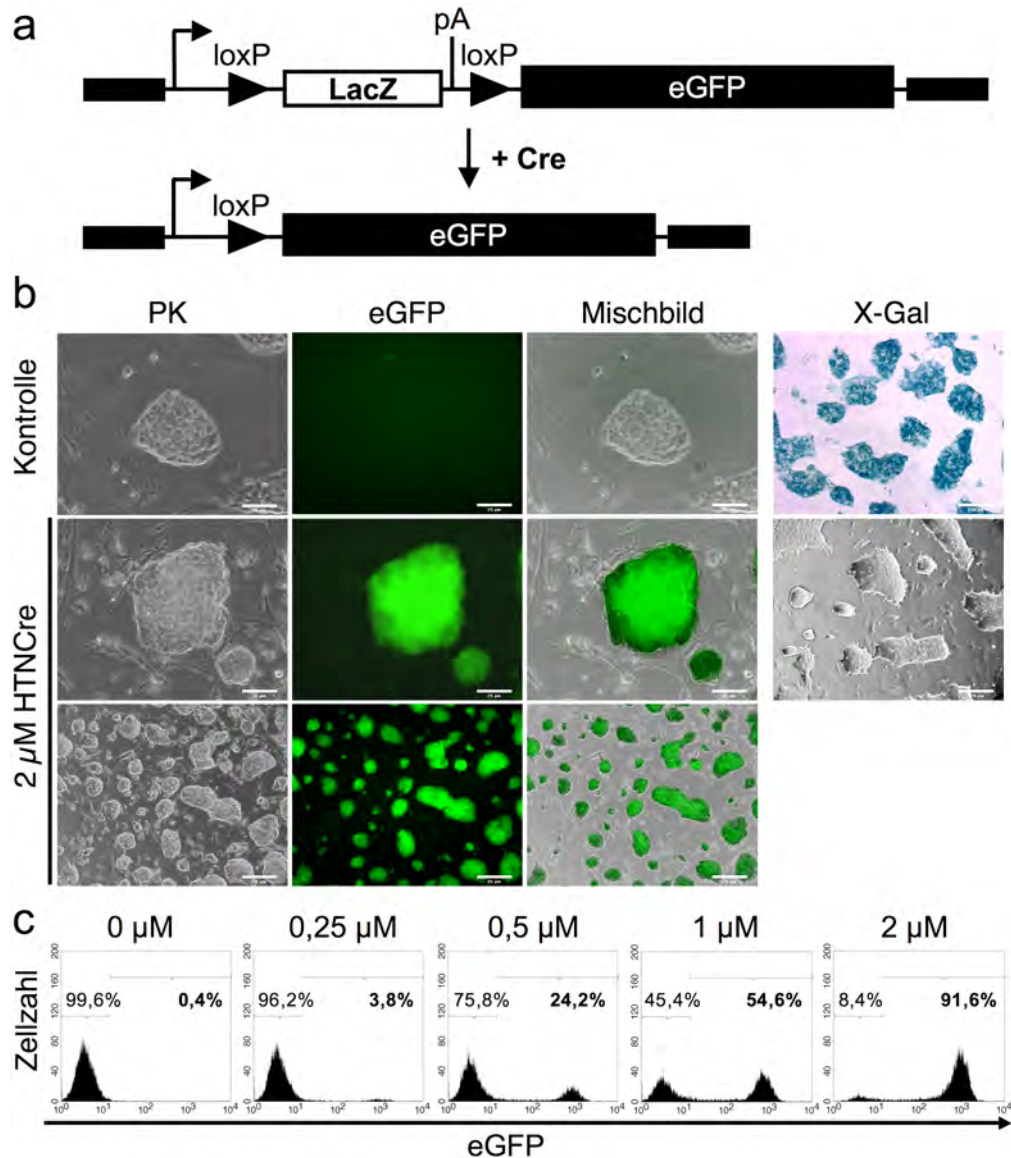


**Abb. 9: Abbau von HTNCre nach der Transduktion**

CV1-5B Reporterzellen wurden für 1 h mit 2  $\mu\text{M}$  HTNCre in PBS/DMEM behandelt, und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transduktionsende das Gesamtprotein der Zellen präpariert. An der Zelloberfläche haftendes Cre-Protein wurde mit einer Trypsininkubation und darauf folgendem Waschen mit einer 0,5%igen Heparinlösung entfernt. Die Lysate von je  $2 \times 10^5$  Zellen wurden mittels Western Blot unter der Verwendung eines anti-Cre Antikörpers analysiert. K-, unbehandelte Zellen; K+, 20 ng HTNCre Protein; M, vorgefärbter Protein-Marker

### 3.1.6 Transduktion von Cre Protein in murine embryonale Stammzellen

Im Folgenden wurde die Cre-Protein-Transduktion mit embryonalen Stammzellen der Maus charakterisiert. Dazu wurde zunächst in Zusammenarbeit mit Dipl.-Biol. Simone Haupt im eigenen Arbeitskreis die Z/EG ES-Zelllinie (Novak et al., 2002) verwendet, welche ein Cre-abhängiges Doppelreporter-Gen trägt. Ein ubiquitärer Promotor steuert LacZ-Expression vor und eGFP-Expression nach Cre-vermittelter Rekombination (Abb. 10 a). Die Zellen wurden



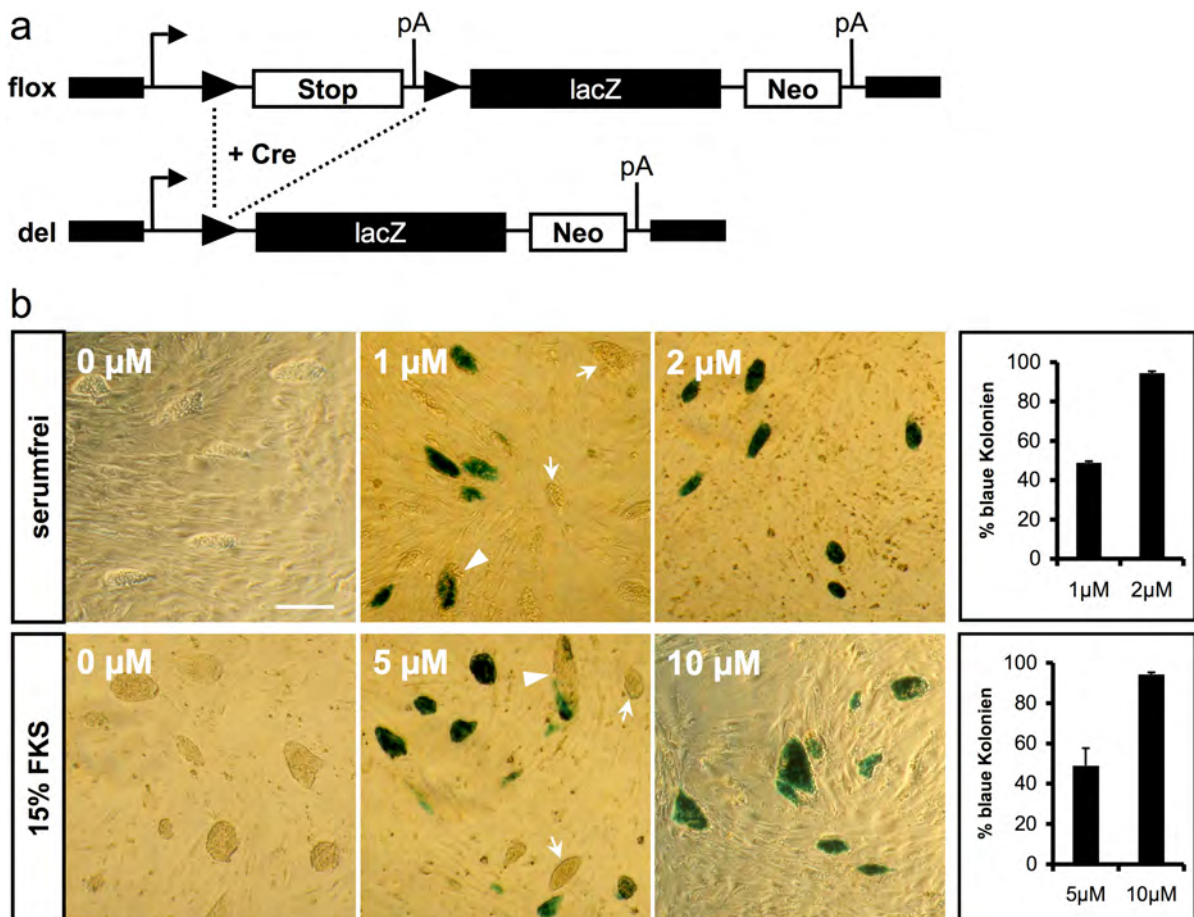
**Abb. 10: Effiziente HTNCre-vermittelte Rekombination in Z/EG Reporter-ES-Zellen.**

**a)** Schematische Darstellung des Z/EG Doppelreporterkonstrukts. Die Z/EG ES-Zelllinie (Novak et al., 2002) trägt ein Cre-abhängiges Doppelreportergen. Ein ubiquitärer Promotor steuert LacZ-Expression vor und eGFP-Expression nach Cre-vermittelter Rekombination **b)** Validierung der Cre-Rekombination mittels Analyse der Reporter-gen-Aktivitäten in Kontrollzellen und HTNCre-behandelter Zellen. Z/EG ES-Zellen wurden für 5 Stunden ausgesät und in serumfreien PBS/DMEM Medium (1:1) für 16 h mit 2  $\mu$ M HTNCre behandelt. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen über Fluoreszenz-Mikroskopie und X-Gal Färbung analysiert. **c)** Durchflusszytometrische Analyse HTNCre-behandelter Z/EG ES-Zellen. Die Zellen wurden für 16 h mit steigenden Konzentrationen HTNCre wie angegeben behandelt und nach weiteren 48 h analysiert. In jedem Histogramm wird der Prozentsatz eGFP-negativer (links) und eGFP-positiver Zellen (rechts) wiedergegeben. PK, Phasenkontrast; pA, poly-Adenylisierungsstelle. (Durchgeführt in Zusammenarbeit mit Simone Haupt; Haupt et al., 2007)



vor dem Experiment vereinzelt und auf MEF-Zellen ausgesät. Fünf Stunden später wurden verschiedene Konzentrationen HTNCRE in serumfreiem Medium für 16 h zu den ES-Zellen gegeben. Die Mehrheit HTNCRE-behandelter ES-Zellen zeigten bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  eGFP-Expression (Abb. 10b). Durchflusszytometrische Analysen zeigten eine strikte Konzentrations-Abhängigkeit der Cre-Transduktion. Halbmaximale Aktivität konnte mit einer HTNCRE-Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  erreicht werden und mehr als 90 % Rekombination mit einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  (Abb. 10c) (Haupt et al., 2007).

Im Weiteren wurde die FKS-Abhängigkeit der Protein-Transduktion anhand der Reporter-ES-Zelllinie MS4pAM (Zhang et al., 1996) analysiert, welche nach Cre-vermittelter Rekombination  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert (Abb. 11a). Es wurden verschiedene Konzentrationen HTNCRE (1 und 2  $\mu\text{M}$  bzw. 5 und 10  $\mu\text{M}$ ) für 16 h zu den Zellen gegeben.



**Abb. 11: Hocheffiziente Rekombination mit HTNCRE in murine ES-Zellen**

**a)** Aufbau des Reporterkonstruktes: Ein Transkriptionsstopp ist loxP flankiert und verhindert die Transkription des LacZ-Gens (*flox*). Nach Cre-vermittelter Deletion (*del*) haben die Zellen den Transkriptionsstopp verloren, und das LacZ-Gen kann abgelesen werden (Zhang et al., 1996). **b)** Die Reporterzellen wurden fünf Stunden nach dem Aussäen in serumfreiem PBS/DMEM oder ES-Zellmedium für 16 h mit verschiedenen Konzentrationen HTNCRE behandelt, und nach 3 Tagen mit X-Gal auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gefärbt. Die Pfeilspitzen markieren beispielhaft Kolonien, die nur teilweise gefärbt wurden, ungefärbte Kolonien sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Zahl der Kolonien die vollständig oder teilweise blau (X-Gal-positiv) waren wurde bestimmt, und ihr Anteil an der Gesamtzahl der Kolonien in den Diagramme wiedergegeben. (n = 3); pA, poly-Adenylierungsstelle; Skalierung, 100  $\mu\text{m}$

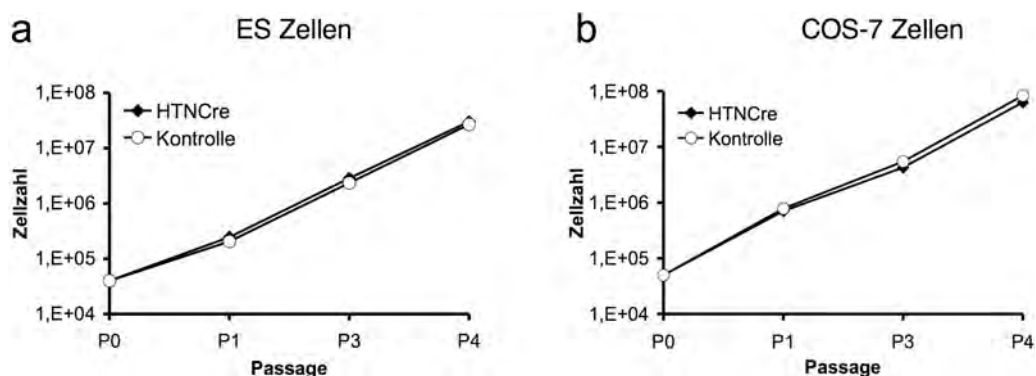
Dazu wurden zwei verschiedene Medien verwendet: ein serumfreies DMEM/PBS-Gemisch (1 : 1) und herkömmliches ES-Zellmedium mit 15 % FKS. Die Experimente wurden über die Quantifizierung  $\beta$ -Gal positiver Kolonien ausgewertet, dabei wurden auch nur teilweise gefärbte Kolonien mit einer „Mosaikstruktur“ als  $\beta$ -Gal-positiv eingestuft. Die mit serumfreiem Medium ermittelten Werte bestätigen die bei Z/EG-ES-Zellen erzielten Rekombinationsergebnisse. So sind bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M in dem PBS-DMEM Medium die Hälfte der ES-Zellkolonien  $\beta$ -Gal-positiv. Bei 2  $\mu$ M sind über 90 % der ES-Zellkolonien positiv gefärbt. Bei der Cre-Transduktion in ES-Zellmedium mit 15 % FKS wird deutlich, dass die HTNCre-Konzentration um den Faktor 5 erhöht werden muss, um Rekombinations-Resultate wie unter serumfreien Bedingungen erzielen zu können (Abb. 11b).

### 3.1.7 Cre-Transduktion unter Erhalt der Proliferation und chromosomaler Stabilität

Vor kurzem wurde berichtet, dass Cre-Aktivität in Zellen toxische Effekte wie Wachstums-Inhibition und chromosomale Aberrationen verursacht (Baba et al., 2005; de Alboran et al., 2001; Loonstra et al., 2001; Pfeifer et al., 2001; Schmidt et al., 2000; Silver und Livingston, 2001). In diesem Zusammenhang wurde der Fragestellung nachgegangen, welche Auswirkungen diesbezüglich die HTNCre-Transduktion auf somatische und ES-Zellen hat.

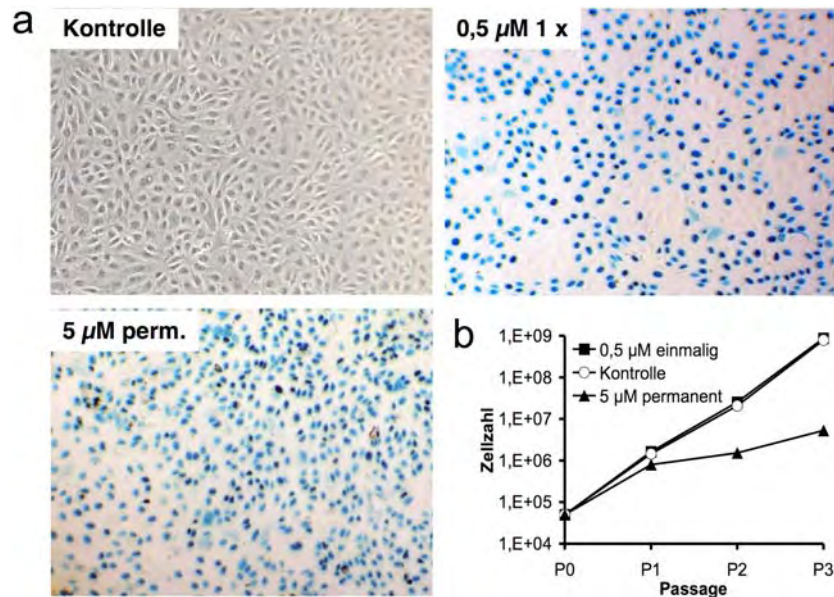
#### *Einfluss von HTNCre-Transduktion auf die Proliferation*

Zunächst wurde das Proliferationsverhalten nach erfolgter Transduktion näher analysiert.



**Abb. 12: Unveränderte Proliferation von Zellen nach Cre-Transduktion**

**a)** ES-Zellen wurden für 16 h mit 10  $\mu$ M HTNCre in ES-Zellmedium behandelt und zwei Tage später passagiert. Für die folgenden 4 Passagen wurde die kumulative Zellzahl ermittelt. **b)** COS-7 Fibroblasten wurden für 16 h mit 0,5  $\mu$ M HTNCre in PBS/DMEM behandelt und zwei Tage später passagiert. Die Zellen wurden subkonfluent kultiviert und die kumulative Zellzahl bestimmt.



**Abb. 13: Permanente Cre-Transduktion reduziert die Proliferation**

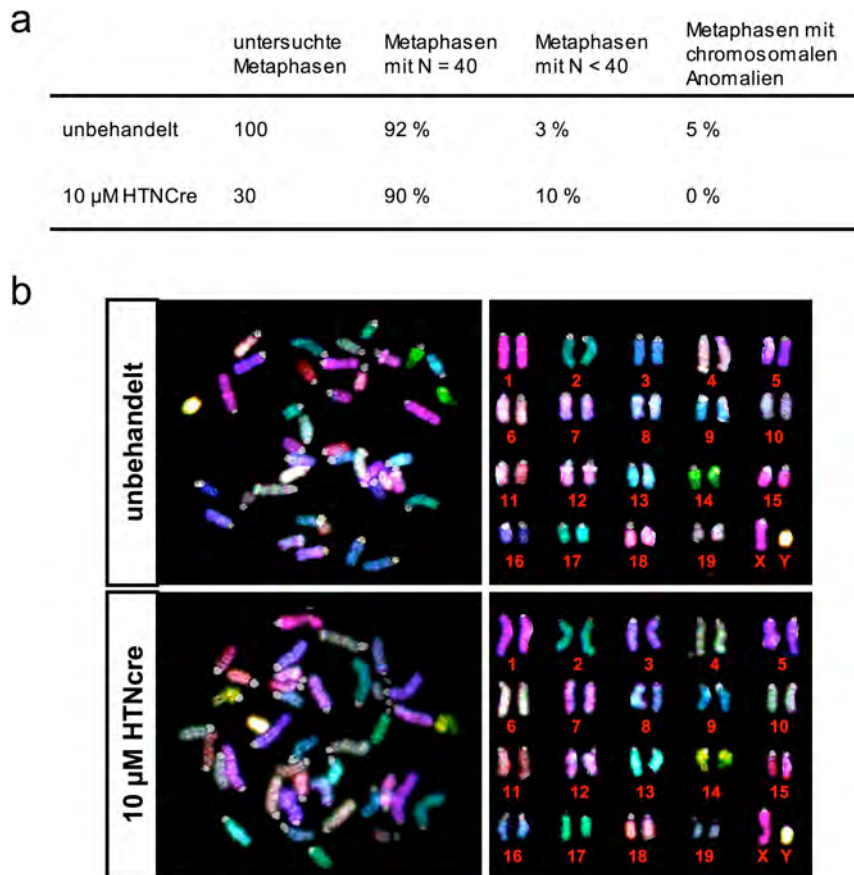
**a)** CV1-5B Reporterzellen wurden einmalig für 16 h mit 0,5 µM HNTCre behandelt oder für drei Passagen mit 5 µM HTNCre in Fibroblastenmedium mit 10 % FKS inkubiert. Anschließend wurde mit X-Gal auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gefärbt. **b)** Zellen, behandelt wie in a), wurden subkonfluent kultiviert und die kumulative Zellzahl bestimmt.

Frisch ausgesäte ES-Zellen (Oct4-GiP; Ying et al., 2002) bzw. COS-7 Fibroblasten wurden für 16 h mit HTNCre behandelt (10 µM in ES-Zellmedium bzw. 0,5 µM in serumfreien Medium). Nach weiteren zwei Tagen wurden die Zellen gesplittet und mit definierter Zelldichte ausgesät. Für die folgenden vier Passagen unter subkonfluenten Bedingungen wurden die kumulativen Zellzahlen bestimmt (Abb. 12a,b). Weder bei den ES-Zellen noch bei den Fibroblasten war ein Unterschied in der Proliferation festzustellen.

Das oben beschriebene Experiment wurde mit den CV1-5B Fibroblasten wiederholt, und auch hier konnte nach einer Cre-Behandlung die höchste Rekombinationseffizienzen induziert (Abb. 13a), kein Proliferationsunterschied festgestellt werden (Abb. 13b). Zusätzlich wurden die Zellen dauerhaft mit 5 µM HTNCre in Standard-Medium inklusive 10 % FCS kultiviert. In diesem Fall wurden ebenfalls fast alle Zellen rekombiniert (Abb. 13a) doch war die Proliferation im Vergleich zu Kontrollzellen drastisch verlangsamt: nach 3 Passagen lag die kumulative Zellzahl mehr als 2 Größenordnung unter der unbehandelten Zellen.

#### *Chromosomale Analyse Cre-transduzierter ES-Zellen*

Um, eventuell durch HTNCre verursachte, chromosomale Veränderungen aufspüren zu können, wurde eine umfassende Chromosomen-Analyse von HTNCre-transduzierten murinen ES-Zellen durchgeführt. Für diese Untersuchung wurden praxisorientierte Transduktions-Parameter gewählt, die zu über 90 % Rekombinationseffizienz führen (siehe Abb. 11b, Kapitel 3.1.6). Dazu wurden ES-Zellen für 18 h mit 10 µM HTNCre in normalem ES-



**Abb. 14: Stabiler Genotyp von ES-Zellen nach HTNCre Transduktion**

**a)** Murine ES-Zellen wurden für 18 h mit 10  $\mu$ M HTNCre in normalem ES-Zellmedium behandelt, expandiert und die Metaphasen-Chromosomen präpariert. Per Auge wurden einzelne Metaphasen untersucht und der Karyotyp bestimmt. **b)** Multi-Farben Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs-Analyse („Multi-FISH“) unbehandelter ES-Zellen bzw. ES-Zellen, die mit 10  $\mu$ M HTNCre für 18 h behandelt wurden. 30 solcher Multi-FISH Analysen wurden jeweils durchgeführt und waren ohne Befund.

Zellmedium behandelt, expandiert und die Metaphasen-Chromosomen präpariert. Die einzelnen Metaphasen wurden analysiert und zwei Kategorien zugeordnet: normale Chromosomenzahl oder abnormale Anzahl. 90 % der ES-Zellen, die mit HTNCre behandelt wurden hatten einen normalen Karyotyp, N = 40 (Abb. 14a). Nur 10 % der Metaphasen von Cre-behandelten ES-Zellen waren aneuploid; in jedem dieser Fälle fehlte ein Chromosom. Die Metaphasen von unbehandelten Kontrollzellen zeigten einen ähnlichen Anteil normaler Karyotypen (92 %). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass kleinere chromosomale Umlagerungen mit der oben genannten Methode übersehen wurden, ist eine Multi-Farben Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs-Analyse („Multi-FISH“) von der Firma Chrombios (Raubling, Deutschland) durchgeführt worden (Abb. 14b). Alle 30 so untersuchten Metaphasen Cre-behandelter ES-Zellen zeigten eine normale Chromosomen-Färbung ohne detektierbare Aberrationen. Es wurden in Cre-transduzierten Zellen keine Chromatidbrüche oder Translokationen beobachtet.

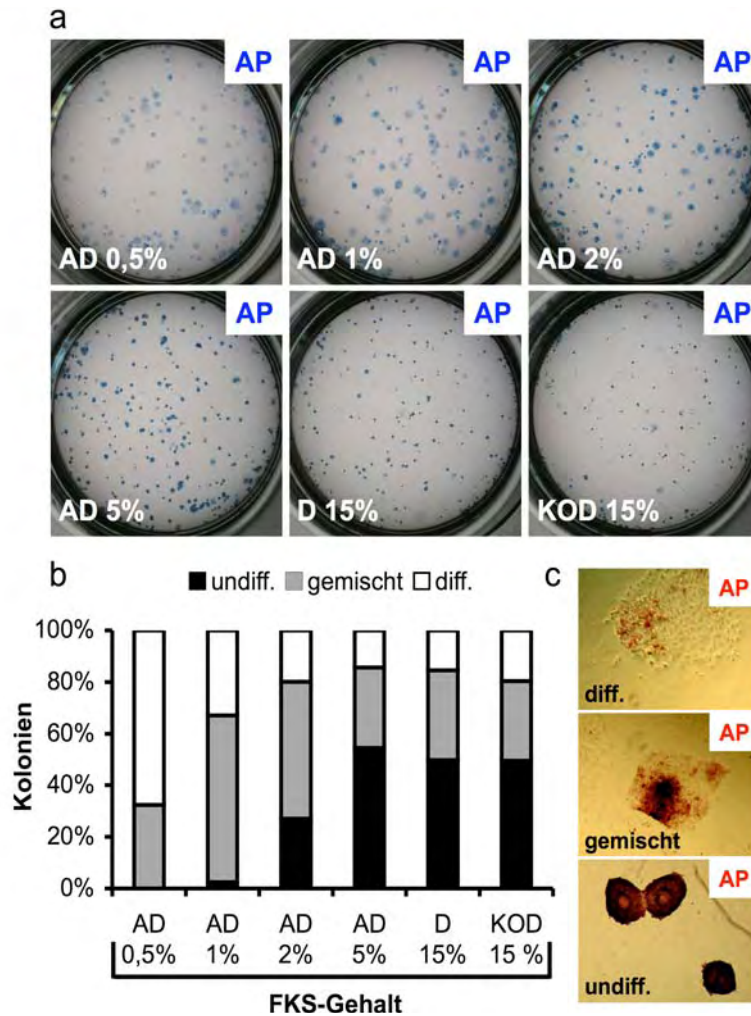
### 3.1.8 Erhalt der Pluripotenz von ES-Zellen nach Cre-Transduktion

Als endgültiger Test auf mögliche Toxizitäten durch die Cre-Transduktion, sollte geprüft werden, ob HTNCre-behandelte ES-Zellen ihr vollständiges Differenzierungspotential, d. h. ihre Pluripotenz, beibehalten und weiterhin zu Zellen der Keimbahn differenzieren können. Dieser Fragestellung wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hubert Schorle (Pathologie, Uniklinik Bonn) nachgegangen. Es wurden gefloxtete ROSAbetaMER ES-Zellen für 18 h mit 10  $\mu$ M HTNCre behandelt, expandiert und drei rekombinierte Klone in Balb/c Blastozysten injiziert. Die resultierenden Nachkommen wurden mit Balb/c Mäusen verpaart. Zwei der drei parentalen Klone führten zu chimären Tieren von denen mehrere 100% Keimbahn-Transmission aufwiesen (Peitz et al., 2007).

Somit wurde gezeigt, dass sich die Cre-Transduktion in ES-Zellen mit normalem ES-Zellmedium durchführen lässt, und dass dabei maximale Rekombinationseffizienzen erzielt werden können. Es waren keine toxischen Nebeneffekte durch die Behandlung mit dem HTNCre-Protein nachweisbar. Weder bei der Proliferation, noch beim Karyotyp der behandelten ES-Zellen konnten Veränderungen festgestellt werden. Auch die Pluripotenz der ES-Zellen blieb trotz stringenter Transduktionsbedingungen vollständig erhalten.

### 3.1.9 Herstellung eines serumreduzierten ES-Zellmediums

Da sich serumfreies PBS/DMEM (1:1), insbesondere in der Abwesenheit von Fütterzellen, zur längeren Kultur von ES-Zellen nicht eignet, wurden die Cre-Transduktionsversuche unter Pluripotenzerhalt in normalem ES-Zellmedium mit Serum durchgeführt (siehe oben). In den Versuchen wurde offensichtlich, dass sich FKS inhibierend auf die Protein-Transduktion auswirkt. Diese Inhibition kann zwar durch eine Konzentrationserhöhung des zu transduzierenden Proteins kompensiert werden, doch steigt so der präparative Aufwand. Wie im weiteren Verlauf dieser Arbeit deutlich wurde, ist solch eine Maßnahme mit einem schlechter löslichen Protein wie dem transduzierbaren Nanog nicht möglich (siehe Kapitel 3.2.3). Um unter Erhalt der ES-Zellintegrität maximale Transduktionseffizienzen gewährleisten zu können, wurde alternativ zum herkömmlichen ES-Zellmedium ein serumreduziertes Medium geschaffen. Zu diesem Zweck wurde eine DMEM-Variante verwendet, die bereits mit Insulin, Transferrin und Selenit supplementiert ist (*Advanced DMEM*, Invitrogen). Diesem Medium wurden steigende Konzentrationen FKS zugefügt, und sein Einfluss auf ES-Zelleigenschaften beurteilt. Dazu wurden die Zellen in klonaler Dichte



**Abb. 15: Reduktion von transduktions-inhibierendem FKS im ES-Zellmedium**

Murine ES-Zellen (Oct4-GiP, zuvor in ES-Zellmedium mit DMEM und 15 % FKS kultiviert) wurden in klonaler Dichte (60 Zellen/cm<sup>2</sup>) in unterschiedlichen Zellmedien mit verschiedenen FKS-Konzentrationen auf Gelatine ausgesät und für 6 Tage darin kultiviert. **a)** Anschließend wurden die Zellen auf AP-Aktivität gefärbt (blaues AP-Reaktions-Produkt), und **b)** der Anteil der undifferenzierten, gemischten und differenzierten Kolonien bestimmt. **c)** Beispiele für die vorgenommenen Kategorisierungen (hier mit rotem AP-Reaktions-Produkt).

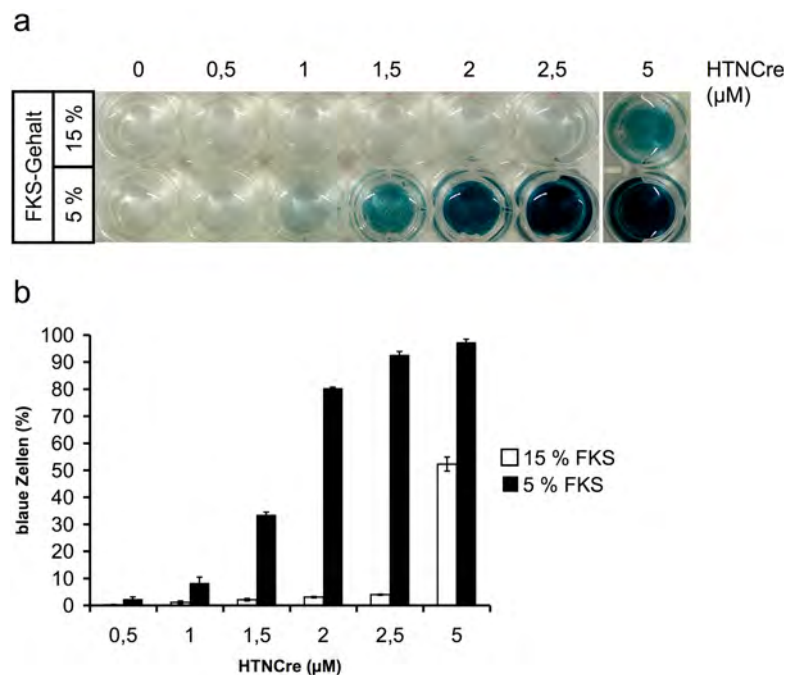
AD, *Advanced DMEM* (DMEM supplementiert mit Insulin, Transferrin und Natrium-Selenit; Invitrogen); D, klassisches DMEM (Invitrogen); KOD, *KnockOut DMEM* (für ES-Zellen optimiertes DMEM; Invitrogen)

(60 Zellen/cm<sup>2</sup>) in den Medien ausgesät und nach 6 Tagen auf Alkalische Phosphatase-Aktivität gefärbt (Abb. 15a). Mit dieser Färbung lässt sich zuverlässig der Differenzierungsstatus von ES-Zellen prüfen, da eine starke Expression Alkalischer Phosphatase ein Charakteristikum undifferenzierter ES-Zellen ist (Pease et al., 1990). Anschließend wurde der Anteil der undifferenzierten, gemischten und differenzierten Kolonien bestimmt (Abb. 15b,c). Als Kontrollmedien dienten herkömmliches DMEM und ein optimiertes DMEM für ES-Zellkultur (*KnockOut DMEM*, Invitrogen), beide mit der FKS-Standardkonzentration von 15 %. Bei dem Vergleich zeigt sich, dass eine Konzentration von 5 % FKS in Advanced DMEM zu einem etwas höheren Anteil an AP-positiven Kolonien führt, als bei den beiden Standardmedien mit der dreifachen Menge FKS. Zudem wird auf der Übersichtsabbildung deutlich, dass die Kolonien im Advanced Medium mit 5 % FKS im

Mittel einen größeren Durchmesser haben, als in den Kontrollmedien (Abb. 15a). Dieser Medienvergleich wurde ebenfalls mit C57BL/6 ES-Zellen durchgeführt und führte zu sehr ähnlichen Ergebnissen (nicht gezeigt).

### 3.1.10 Gesteigerte Transduktionseffizienz in serumreduziertem ES-Zellmedium

Um den Einfluss der FKS-Reduktion zu überprüfen, wurde die Protein-Transduktionseffizienz in serumreduziertem Advanced ES-Medium (5 % FKS) mit der in herkömmlichem ES-Zellmedium (15 % FKS) verglichen. In den Medien wurden steigende Cre-Konzentrationen für 16 h zu den Cre-Reporterfibroblasten gegeben und die Rekombination quantifiziert. (Abb. 16). Es zeigt sich, dass für eine halb-maximale Rekombinations-Effizienz Konzentrationen zwischen 1,5 und 2  $\mu\text{M}$  im serumreduzierten Advanced ES-Medium ausreichend sind. Im normalen ES-Medium ist für dieselbe Effizienz ungefähr die dreifache Menge HTNCre-Protein notwendig.



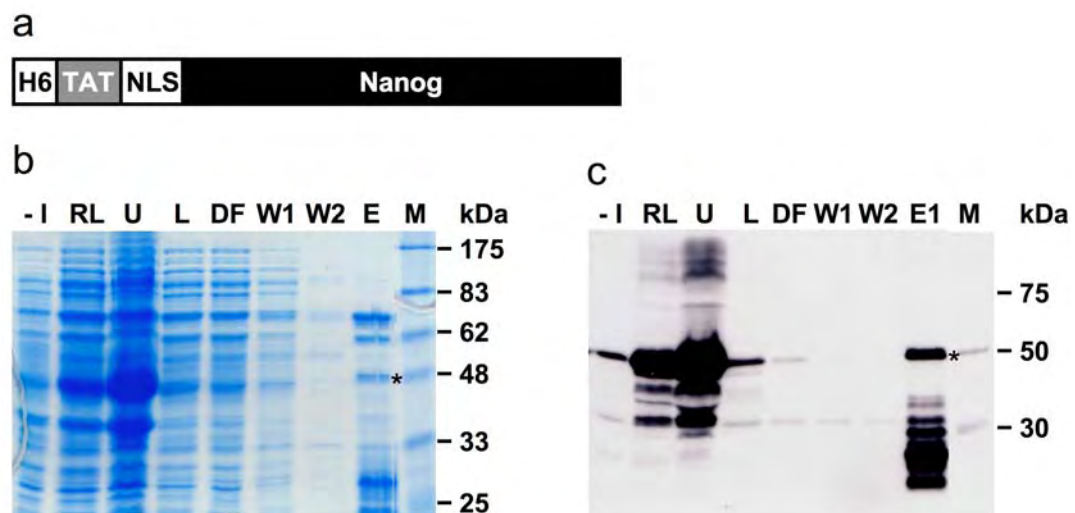
**Abb. 16: Cre-Transduktionstest mit FKS-reduziertem ES-Zellmedium**

Die Transduktion von HTNCre wurde mit dem serumreduzierten Advanced ES-Zellmedium (5 % FKS) und herkömmlichem ES-Zellmedium (15 % FKS) auf CV1-Reporterfibroblasten getestet. Das Protein wurde in den jeweiligen Medien für 16 h zu den Zellen gegeben. Diese wurden 24 h nach Ende der Transduktion auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gefärbt. **a)** Übersichtsfoto des beschriebenen Experiments. **b)** Quantifizierung der  $\beta$ -Gal-positiven Zellen. (n = 3)

## 3.2 Etablierung eines transduzierbaren Nanog Proteins

### 3.2.1 TAT-Nanog mit N-terminalem H6-tag zeigt geringe Löslichkeit und Reinheit

Zur Herstellung eines transduzierbaren Nanog Proteins wurde basierend auf den Erfahrungen mit den transduzierbaren Proteinvarianten von Cre und Flpe (Kapitel 3.4) analog ein Vektor mit einem H6-Tag, einer TAT-Domäne sowie eine Kernlokalisationssequenz (NLS) am N-Terminus hergestellt (H6-TAT-NLS-Nanog; Fig. 17a).



**Abb. 17: Aufbau und Reinigung eines TAT-modifizierten Nanog-Fusionsproteins**

**a)** Aufbau des rekombinant hergestellten Nanog-Fusionsproteins. **b)** Das gezeigte Konstrukt wurde in *E. coli* exprimiert und die lösliche Proteinfraction einer Affinitätschromatographie unterzogen. Fraktionen des Reinigungsverlaufs wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie anfärbt. **c)** Western-Blot-Analyse der Fraktionen der Protein-Reinigung mit anti-pentaHis-Antikörper. Das Sternchen markiert die Laufhöhe des vollständigen Proteins. In jede Spur wurden 2,5 µl Probe aufgetragen. H6, Sechs Histidine; NLS (*nuclear localization signal*); TAT, Protein-Transduktionsdomäne; -I, Lysat nicht induzierter Bakterien; RL, Rohlysate (Gesamtprotein); U, unlösliche Fraktion; L, lösliche Fraktion; DF, Säulen-Durchfluss; W, Waschfraktion; E, Elutionsfraktion; M, Marker (Größenstandard)

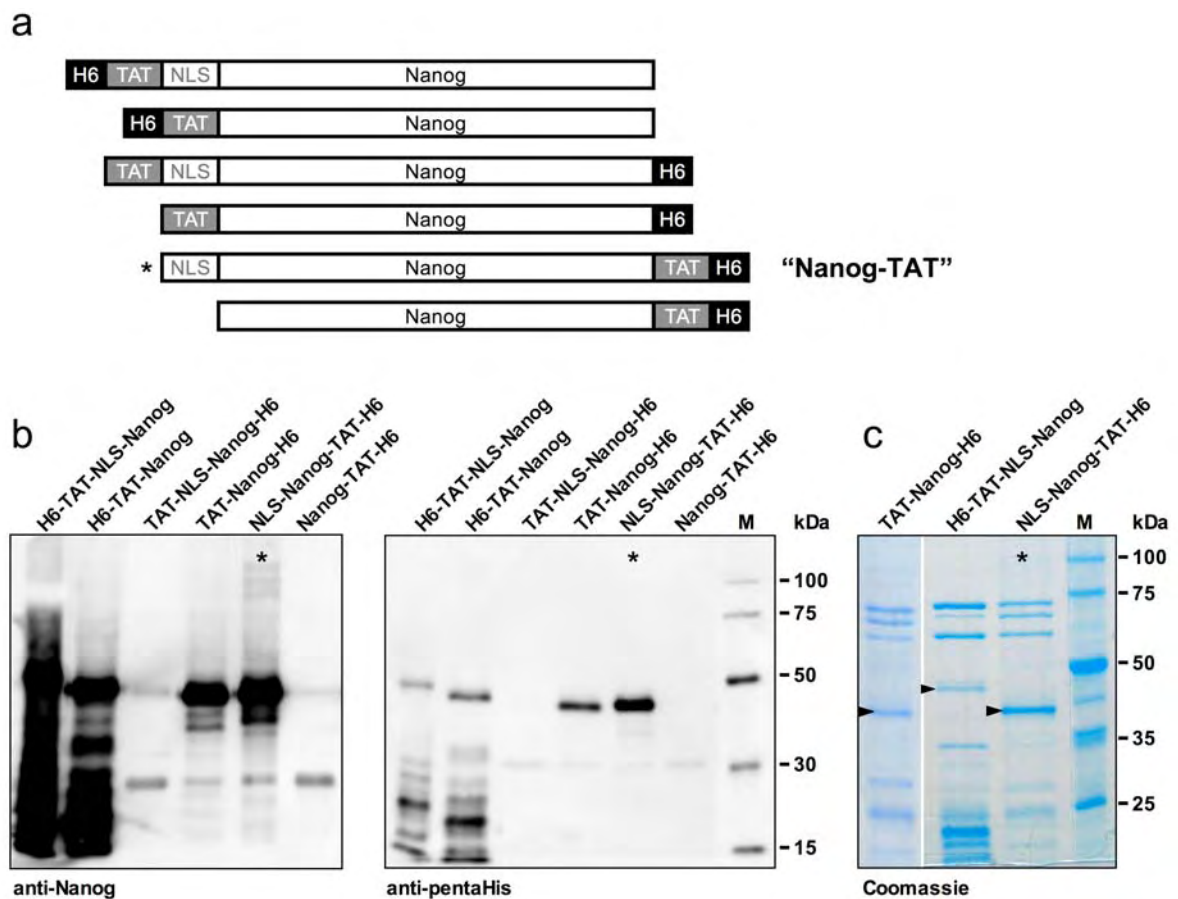
*E. coli* wurden mit dem Konstrukt transformiert, die Expression induziert und das Bakterienlysate einer Affinitäts-Chromatographie unterzogen. Die SDS-PAGE-Analyse und ein Western Blot mit anti-pentaHis-Antikörper zeigte, dass das Protein exprimiert wurde und dass es sich nur moderat anreichern ließ. Die theoretische Größe von H6-TAT-NLS-Nanog beträgt ca. 38 kDa. Die experimentell bestimmte Größe des Volllänge-Proteins betrug dagegen ca. 50 kDa, obwohl zuvor mit der Sequenzierung des Expressions-Konstrukts der korrekte Aufbau des Konstrukts bestätigt wurde. Im Coomassie-Gel sind, im Gegensatz zu den analog aufgebauten transduzierbaren Cre- und Flpe-Proteinen, mehrere überrepräsentierte Zusatzbanden zu sehen, insbesondere mit einer Laufhöhe zwischen 60 und 70 kDa bzw. unter 30 kDa (Abb. 17b). Die kleineren Kontaminationen wurden in einem Western-Blot vom anti-pentaHis-Antikörper erkannt, die größeren nicht (Abb. 17c). Zusammengefasst zeigte sich,



dass das H6-TAT-NLS-Nanog-Protein im Vergleich zu HTNCRE bzw. HTNFlpe deutlich schlechter anzureichern ist.

### 3.2.2 Optimierung TAT-fusionierten Nanog-Proteins

Aufgrund der limitierten Anreicherung von H6-TAT-NLS-Nanog wurde versucht, ein Nanog-Fusionsprotein mit verbesserten Aufreinigungs- und Löslichkeitseigenschaften zu generieren. Dazu wurden verschiedene Varianten des rekombinanten Proteins kloniert (Abb. 18a). Die funktionellen Domänen wurden in ihrer Position variiert, und z. B. der H6-tag an den C-Terminus verlegt, damit bei der Reinigung nur vollständig translatierte Proteine an die Ni-



**Abb. 18: Analytische Aufreinigung verschiedener TAT-fusionierter Nanog-Varianten**

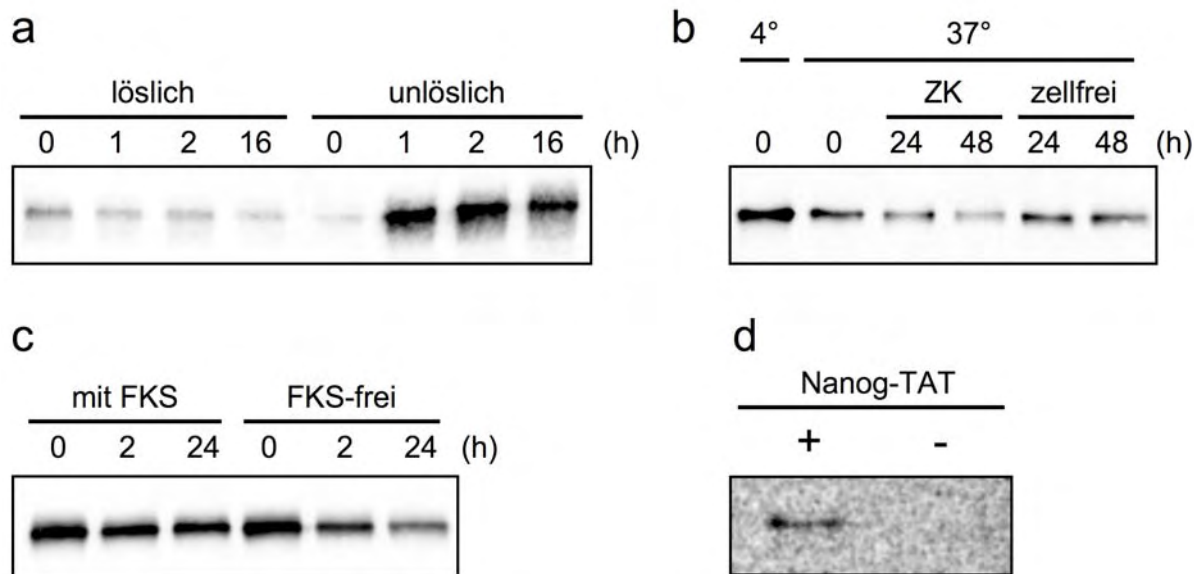
**a)** Aufbau der alternativen Nanog-Varianten. Die Domänen wurden in ihrer Position variiert bzw. das NLS entfernt. **b)** Die verschiedenen Konstrukte wurden in *E. coli* transformiert und die lösliche Proteinfraction des Lysats einer Affinitätschromatographie unterzogen. Eluat-Fractionen der Reinigungen wurden mittels Western Blot analysiert. Der linke Blot wurde mit anti-Nanog-Antikörper, und der rechte Blot mit anti-pentaHis-Antikörper als primärem Antikörper behandelt. Laufunterschiede der Proteine sind einerseits auf die An- oder Abwesenheit der NLS-Sequenz (ca. 1 kDa) zurückzuführen. Andererseits können die unterschiedlichen Ladungsverteilungen an den Proteinen ebenfalls zu einem veränderten Laufverhalten im elektrischen Feld führen. **c)** SDS-PAGE der Eluatfraktion: Vergleich des ursprünglichen Konstrukts H6-TAT-NLS-Nanog mit den optimierten Konstrukten. Das Dreieck markiert die Laufhöhe des Volllänge-Proteins. In jede Spur wurden 2,5 µl Probe aufgetragen. Das Sternchen markiert das optimierte Konstrukt NLS-Nanog-TAT-H6, („Nanog-TAT“), welches für diese Arbeit ausgewählt wurde, um es in Zellkultur-Experimenten näher zu charakterisieren.

Säulen binden können. Die Konstrukte wurden in *E. coli* transformiert und versucht, die rekombinanten Proteine über Ni-(II)-Affinitätschromatographie anzureichern. Die jeweiligen Eluatfraktionen wurden mit einem Western Blot analysiert (Abb. 18b). Hierzu wurden ein anti-Nanog- sowie ein anti-pentaHis-Antikörper verwendet. Die Analyse der Blots zeigt, dass bei Konstrukten mit C-Terminaler H6-Domäne die Antikörper keine deutlichen Kontaminationsbanden unterhalb des Volllänge-Proteins detektieren. Bei zwei Konstrukten (TAT-NLS-Nanog-H6 und Nanog-TAT-H6) gab es nur sehr schwache Signale mit dem anti-Nanog-Antikörper. Bei zwei anderen Varianten (TAT-Nanog-H6 und NLS-Nanog-TAT-H6) mit C-Terminaler H6-Domäne gab es ein deutliches Antikörper-Signal, allerdings war es bei der Eluatfraktion von NLS-Nanog-TAT-H6 deutlich stärker. Um Kontaminationen zu indentifizieren, die der Antikörper nicht anzeigen kann, wurden die beiden letztgenannten Konstrukte mittels SDS-PAGE-Analyse mit dem ursprünglichen Konstrukt (H6-TAT-NLS-Nanog) verglichen (Abb. 18c). So wird deutlich, dass sich die beide neuen Varianten besser anreichern lassen, und dass NLS-Nanog-TAT-H6 mit höherer Ausbeute bzw. Reinheit zu gewinnen ist. Es treten lediglich im hochmolekularen Bereich zwischen 60 – 70 kDa Kontaminationen auf, die wahrscheinlich auf mitangereicherte bakterielle Proteine zurückzuführen sind. Aufgrund der verbesserten biochemischen Eigenschaften wurde NLS-Nanog-TAT-H6 für die weitere Charakterisierung in der Zellkultur ausgewählt. Im Folgenden wird dieses Konstrukt verkürzt als „Nanog-TAT“ bezeichnet.

Mit einem EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) konnte nachgewiesen werden, dass rekombinantes Nanog-TAT spezifisch an DNA mit einer Nanog-Bindesequenz (Pan und Pei, 2005) bindet; Ergebnis von Dipl.-Biol. Bernhard Müntst (in: Peitz et al.; unter Begutachtung). Eine hochkonzentrierte Lösung zur Aufbewahrung wie bei HTNCre oder HTNFlpe, ließ sich bislang von Nanog-TAT nicht herstellen, da das Protein unabhängig von der Pufferzusammensetzung bei höheren Konzentrationen zur Aggregation neigt.

### 3.2.3 Eigenschaften von Nanog-TAT unter Zellkulturbedingungen

Da Nanog kontinuierlich kultivierten Zellen zugeführt werden soll, wurde seine Stabilität und Löslichkeit unter Zellkultur-Bedingungen getestet. Das eluierte Protein wurde nach der Chromatographie gegen DMEM dialysiert, um toxisches Imidazol zu entfernen, und um eine physiologische Salzkonzentration einzustellen. Bei diesem Schritt fiel bereits ein großer Teil des Proteins aus. Das Dialysat wurde dann um fehlende Supplemente für die ES-Zellkultur ergänzt (siehe Material und Methoden). Die maximale Löslichkeit von Nanog-TAT in ES-



**Abb. 19: Eigenschaften von Nanog-TAT unter Zellkultur-Bedingungen**

**a)** Nanog-TAT-Eluat wurde gegen DMEM dialysiert und das Dialysat mit Advanced ES-Zellmedium gemischt und der FKS-Gehalt auf 5 % eingestellt. Dieses Medium wurde für eine, zwei oder 16 h bei 37°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die lösliche bzw. unlösliche Fraktion wurde mit einem Western Blot gegen Nanog-Protein analysiert. **b)** Nanog-TAT-Medium wurde wie in **a)** beschrieben angesetzt (0 h, 4°C), und anschließend durch zweistündige Inkubation bei 37°C die maximale Löslichkeit eingestellt (Zeitpunkt 0 h, 37°C). Dieses Medium wurde für weitere 24 bzw. 48 h in Zellkultur-Kulturschalen mit und ohne Fibroblasten-Zellen inkubiert. **c)** Vergleich der Stabilität von Nanog-TAT in serumhaltigen und serumfreien ES-Zellmedium (N2B27-Medium; Ying et al., 2003). **d)** Fibroblasten wurden für 3 h mit Nanog-TAT-haltigem ES-Zellmedium (ca. 100 nM) oder mit normalem ES-Zellmedium behandelt. Anschließend wurden Kernextrakte präpariert und über einen Western Blot mit anti-Nanog-Antikörper analysiert.

Zellmedium beträgt ca. 500 nM bei einer Temperatur von 4°C und sinkt auf ca. 100 nM bei 37°C hauptsächlich aufgrund von Präzipitation. Nach dieser Anpassung an die höhere Temperatur bleibt ungefähr 50 % des Proteins nach 48 h *in vitro* erhalten bzw. nach 24 h, wenn das Protein mit CV1-5B-Fibroblasten ko-inkubiert wird (Abb. 19a,b). Ein ähnlicher Stabilitätstest wurde mit einem völlig serumfreien ES-Zellmedium gemacht, welches aus definierten Komponenten besteht (N2B27-Medium; Ying et al., 2003)(Abb. 19c). In diesem Medium stabilisiert sich Nanog-TAT allerdings nicht nach 2 h, sondern der Anteil an löslichem Protein sinkt weiter ab, was auf die Bildung von Präzipitaten zurückzuführen ist, welche auch in der Kulturschale vorzufinden sind.

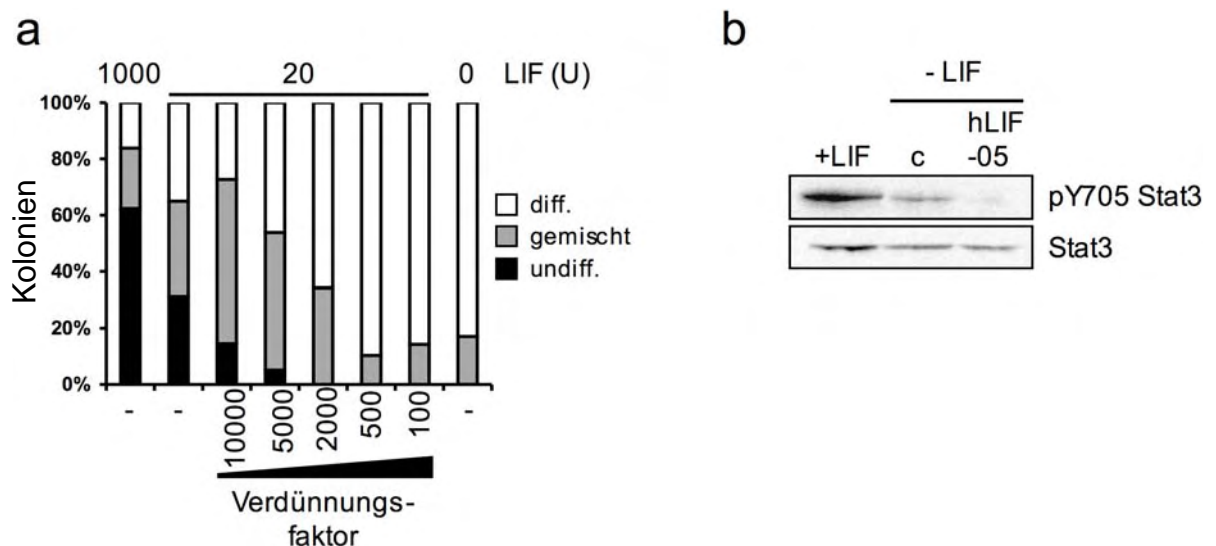
Um die Membranpermeabilität von Nanog-TAT zu überprüfen, wurde das Protein in ES-Zellmedium für 3 h zu CV1-5B-Fibroblasten gegeben und anschließend wurden die Kernextrakte über Western Blot mit anti-Nanog-Antikörper untersucht (Abb. 19d). Nur das Kernlysate behandelte Zellen zeigte ein Signal, bei unbehandelten Zellen ließ sich kein Nanog nachweisen.

### 3.3 Biologische Aktivität von Nanog-TAT

Nachdem die vorangegangenen Versuche gezeigt haben, dass Nanog-TAT an die Nanog-Bindesequenz bindet, unter Zellkulturbedingungen hinreichend stabil ist und in den Zellkern von Fibroblasten gelangen kann, wurde versucht, eine biologische Aktivität des Proteins festzustellen. Da die genetische Überexpression von Nanog einen relativ einfach zu charakterisierenden Phänotyp induziert, nämlich die Selbsterneuerung von ES-Zellen in Abwesenheit von LIF-Stimulation (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003), wurde mit diesem Zelltyp die Nanog-Proteintransduktion analysiert.

#### 3.3.1 Aktivitätstest des LIF-Inhibitors hLIF-05

Da MEFs LIF sekretieren und so die Selbsterneuerung von ES-Zellen fördern (Chambers 2004), wurden die ES-Zellen für Experimente mit Nanog-TAT ohne Fütterzellen kultiviert. Um zusätzlich auszuschließen zu können, dass endogenes LIF, sekretiert von ES-Zellen oder differenzierenden Zellen, mit den Ergebnissen der Nanog-Transduktionsversuche interferiert, wurde ein LIF-Inhibitor eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine antagonistisch wirkende Variante des LIF-Proteins bei dem 9 Aminosäuren substituiert wurden (hLIF-05; Vernallis et al., 1997). Bei dieser Mutante ist die Affinität zum LIF-Rezeptor erhalten geblieben, aber die



**Abb. 20: Aktivitätstest des LIF-Inhibitors hLIF-05**

Der LIF-Inhibitor hLIF-05 (Vernallis, et al., 1997) wurde in transfizierten COS-7 Zellen exprimiert und ins Medium sekretiert. Dieses konditionierte Medium wurde mit ES-Zellmedium verdünnt, welches bereits 20 Einheiten (*units*) LIF/ml enthielt. Zum Vergleich wurde Standard-Medium mit 1000 Einheiten LIF/ml sowie Medium ohne LIF eingesetzt. **a)** ES-Zellen wurden auf Gelatine in klonaler Dichte ( $50 - 100$  Zellen/cm<sup>2</sup>) in diesen Medien ausgesät und nach 6 Tagen der Anteil der undifferenzierten, gemischten und differenzierten Kolonien bestimmt. Zur Einteilung dieser Kategorien siehe Abb. 15, Kapitel 3.1.9. **b)** ES-Zellen wurden in hoher Dichte ( $10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>) für 24 h mit 1000 Einheiten LIF/ml, ohne LIF bzw. ohne LIF mit LIF-Inhibitor hLIF-05 (Verdünnung 1 : 500) kultiviert. Anschließend wurde das Lysat von  $2 \times 10^5$  Zellen über Western Blot mit einem anti-phospho-Stat3 Antikörper (Tyrosin 705) der Phosphorylierungsstatus von Stat3 untersucht (oben). Die Proben wurden in einem weiteren Blot mit einem Antikörper gegen Stat3 behandelt (unten).

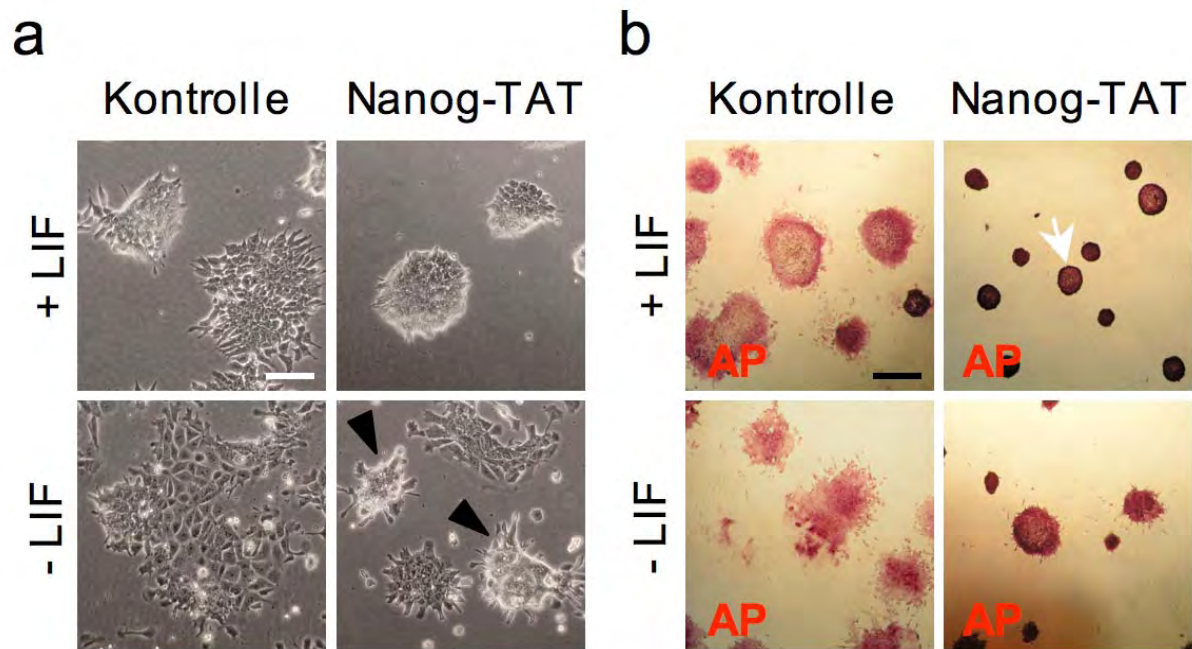
Affinität zur Signaltransduktionseinheit gp130 ist aufgehoben worden. Eine Hetero-Oligomerisierung der drei Faktoren ist so nicht mehr möglich und der LIF/Stat3 Signalweg wird nicht aktiviert. hLIF-05 blockiert auf diese Weise die Aktivität aller bekannter LIF-Rezeptorliganden (Vernallis et al., 1997; Chambers et al., 2003).

Der für hLIF-05 kodierende Vektor wurde in COS-7 Zellen transfiziert, damit die Zellen das Protein in das Medium sekretieren. Um festzustellen, ob das konditionierte Medium eine LIF-antagonisierende Wirkung hat, wurde es mit ES-Zellmedium verdünnt, das geringe Mengen LIF enthielt (20 Einheiten (*units*) LIF/ml). In einem Zellkulturexperiment wurde getestet, welche Verdünnung notwendig ist, um die Aktivität der 20 Einheiten LIF/ml zu blockieren. Hierzu wurden ES-Zellen auf Gelatine in klonaler Dichte (60 Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät, und nach 6 Tagen der Anteil der undifferenzierten, gemischten und differenzierten Kolonien bestimmt (Abb. 20a). Mit 20 Einheiten LIF/ml ist im Vergleich zum Standard-Medium mit 1000 Einheiten der Anteil undifferenzierter Kolonien um 50 % reduziert. Die Zugabe der COS-7 Überstände reduziert den Anteil undifferenzierter Kolonien weiter, bis bei einer Verdünnung von 1 : 500 das Niveau der LIF-freien Kontrolle erreicht ist und fast alle Kolonien vollständig differenziert sind. Um die Wirkung des Inhibitors zusätzlich auf molekularer Ebene zu testen, wurde die Phosphorylierung von Stat3 analysiert. Hierzu wurden ES-Zellen in hoher Dichte (10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>) für 24 h mit 1000 Einheiten LIF/ml, ohne LIF bzw. ohne LIF mit LIF-Inhibitor hLIF-05 (Verdünnung 1 : 500) kultiviert. Anschließend wurde der Phosphorylierungsstatus von Stat3 mittels Western Blot untersucht. (Abb. 20b) In der LIF-entzogenen Kultur wurde eine schwache Phosphorylierung von Stat3 festgestellt. Diese Hintergrundaktivierung kann aber durch die Zugabe des Inhibitors hLIF-05 nahezu vollständig blockiert werden. Folglich wurde in dieser Arbeit in allen LIF-freien ES-Zellexperimenten der LIF-Inhibitor mit einer Verdünnung von 1 : 500 eingesetzt.

### 3.3.2 Differenzierungs-Inhibition muriner ES-Zellen durch Nanog-TAT

#### *Versuche zur biologischen Aktivität von Nanog-TAT mit Wildtyp-ES-Zellen*

Zur Analyse einer biologischen Aktivität von Nanog-TAT wurden zunächst Wildtyp ES-Zellen (C57BL/6) verwendet, die auf Gelatine-beschichteten Platten kultiviert wurden. Unter diesen Bedingungen differenzierten unbehandelte Kontrollzellen ohne LIF mit LIF-Inhibitor innerhalb weniger Tage und entwickelten meist eine primitiv-endodermale Morphologie. So war nach 3 Tagen LIF-Entzug keine undifferenzierte Kolonie mehr nachweisbar (Abb. 21a, links unten). Selbst in der Anwesenheit von LIF war teilweise spontane Differenzierung zu



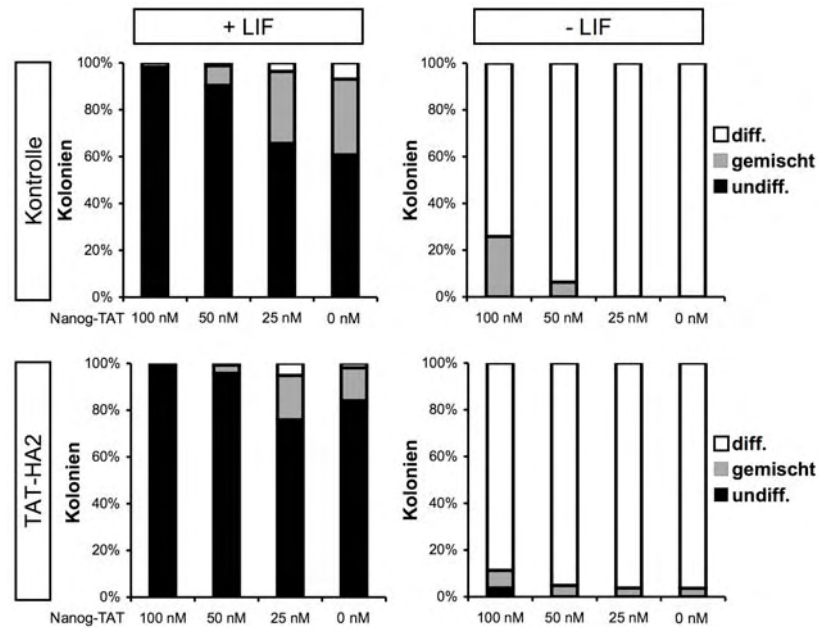
**Abb. 21: Wirkung von Nanog-TAT auf Wildtyp-ES-Zellen (C57BL/6)**

**a)** C57BL/6 ES-Zellen wurden in Medien, die der Beschriftung entsprechend supplementiert waren, auf Gelatine ausgesät, und nach 3 Tagen wurden die Zellen im Phasenkontrast fotografiert. Die Konzentration von Nanog-TAT betrug ca. 100 nM. Unter LIF-freien Bedingungen (inkl. LIF-Inhibitor) bildeten sich nur mit Nanog-TAT kolonieartige Zellhaufen (schwarze Pfeilspitzen) **b)** C57BL/6 ES-Zellen wurden in normalem ES-Medium mit LIF ausgesät und nach 24 h wie angegeben behandelt. Die Konzentration von Nanog-TAT betrug ca. 100 nM. Die Zellen wurden nach weiteren 3 Tagen fixiert und auf Alkalische Phosphatase-Aktivität gefärbt. Auffallend sind die stark angefärbten und kompaktierten Kolonien (weißer Pfeil) in Anwesenheit von Nanog-TAT und LIF. AP, Alkalische Phosphatase; Skalierung, a) 50  $\mu\text{m}$ , b) 100  $\mu\text{m}$

beobachten (Abb. 21a, links oben). Dagegen wiesen Nanog-TAT-behandelte Zellen (Konzentration von Nanog-TAT: ca. 100 nM) in der Abwesenheit von LIF eine deutlich reduzierte Differenzierung auf, sodass sich unter diesen Bedingungen teilweise undifferenzierte Kolonien ausbilden konnten. Darüber hinaus führte die Kombination von Nanog-TAT und LIF dazu, dass die spontane Differenzierung der ES-Zellen im Vergleich zur Kontrolle nahezu vollständig unterbunden wurde (Abb. 21a).

Ein Charakteristikum von undifferenzierten ES-Zellen ist eine starke Expression von Alkalischer Phosphatase (Pease et al., 1990). In einem ähnlich angesetzten Experiment wie in Abb. 21a) lässt sich zeigen, dass die undifferenzierte Morphologie mit erhöhter Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den ES-Zellen korreliert (Abb. 21b). Hier wurden die Zellen in normalem ES-Zellmedium ausgesät und anschließend mit Nanog-TAT behandelt. Es fallen insbesondere die stark angefärbten und kompaktierten Kolonien (Abb. 21b, weißer Pfeil) in Anwesenheit von Nanog-TAT und LIF auf.

Zur Quantifizierung des morphologischen Effekts von Nanog-TAT wurden die Zellen in klonaler Dichte auf Gelatine ausgesät und für 5 Tage mit dem Protein behandelt. Anschließend wurde der Anteil der undifferenzierten, gemischten und differenzierten Kolonien bestimmt (Abb. 22). Auch bei diesem Experiment zeigte sich, dass Nanog-TAT



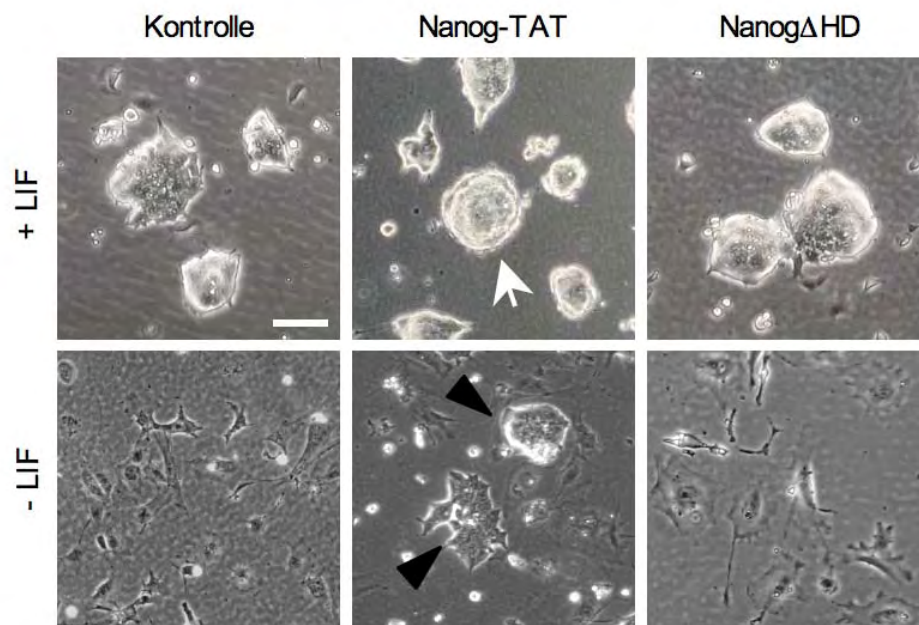
**Abb. 22: Quantifizierung der Differenzierungs-Inhibition von Nanog-TAT auf Wildtyp-ES-Zellen**

C57BL/6 ES-Zellen wurden auf Gelatine in Medium mit LIF ausgesät (500 Zellen pro Vertiefung einer 12-Lochplatte) und nach 5 h zu den angegebenen Medien gewechselt. 5 Tage später wurde der Anteil der undifferenzierten, gemischten und differenzierten Kolonien bestimmt. Zur Einteilung dieser Kategorien siehe Abb. 15, Kapitel 3.1.9. Die Konzentrationen von Nanog-TAT sind unter der Abszisse angegeben. TAT-HA2 wurde mit 5  $\mu$ M eingesetzt.

konzentrationsabhängig inhibierend auf die spontane Differenzierung wirkt. So stieg der Anteil undifferenzierter ES-Zellen in der Anwesenheit von Nanog-TAT von 60 % (Kontrolle) auf über 95 %. Auch bei LIF-Entzug ist ein Differenzierungs-inhibierender Effekt messbar. Die LIF-entzogene Kontrollkultur ist hier vollständig differenziert, und der Anteil gemischter ES-Zellkolonien stieg unter Nanog-TAT-Behandlung von 0 % (Kontrolle) auf ca. 25 %. Es konnten allerdings selbst mit der maximal möglichen Konzentration von 100 nM keine undifferenzierten Kolonien mehr gefunden werden. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen und eine Steigerung des Nanog-induzierten Effekts zu erzielen, wurde das Experiment parallel mit 5  $\mu$ M TAT-HA2 durchgeführt (Abb. 22). Interessanterweise steigerte in Anwesenheit von LIF allein die Zugabe des Peptids den Anteil undifferenzierter Kolonien von 60 % (Kontrolle) auf über 80 %. Die Supplementierung mit Nanog-TAT steigerte den Anteil auf 100 %, d. h. es konnte keine spontane Differenzierung mehr festgestellt werden. In der Abwesenheit von LIF führte die Peptidzugabe zu einem minimalen Anteil von Mischkolonien. Mit der Zugabe von Nanog-TAT konnte dieser Anteil kaum erhöht werden, doch bei einer Konzentration von 100 nM konnten vereinzelt undifferenzierte Kolonien gefunden werden. Das Mischen von Nanog-TAT und TAT-HA2 erwies sich allerdings als problematisch, da es zur Bildung von Präzipitaten kam, die sich auf den Boden der Kulturschale festsetzen und einen störenden Einfluss auf das Zellwachstum ausübten.

### Charakterisierung von Nanog-TAT mit Oct4-Reporter-ES-Zellen

Im Folgenden sollte einerseits sichergestellt werden, dass die Nanog-TAT-induzierte Inhibition der Differenzierung embryonaler Stammzellen nicht auf eine ES-Zelllinie beschränkt ist, und andererseits sollte diese Aktivität näher charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde die gut etablierte ES-Zelllinie Oct4-GiP (Ying et al., 2002) verwendet. Oct4-GiP-Zellen verfügen über ein Transgen mit regulatorischen Sequenzen des Oct4-Promotors, welche die Expression von GFP und einem Puromycin-Resistenzgen kontrollieren. Die Expression beider Gene korreliert miteinander, da sie über eine IRES-Sequenz (*internal ribosomal entry site*) verbunden sind. Das Transgen soll aufgrund der Oct4-Promotorelemente nur in pluripotenten Zellen und Zellen der Keimbahn aktiv sein (Ying et al., 2002; Yeom et al., 1996). Zur Entfernung spontan-differenzierter Zellen und zur Standardisierung der Ausgangsbedingungen, wurden die Zellen mindestens eine Woche vor jedem Experiment mit Puromycin kultiviert. Nach LIF-Entzug differenzierten die Zellen innerhalb von 2 – 4 Passagen vollständig und konnten nicht weiter expandiert werden. Nur wenn Nanog-TAT zu den Zellen gegeben wurde, formten sich wiederholt bei jeder Passage kleine, einschichtige Kolonien (Abb. 23). Wurde diesen Nanog-transduzierten Zellen Nanog-TAT wieder entzogen, differenzierten sie nach 3 – 4 Passagen, wenn sie nicht mit LIF



**Abb. 23: Effekt von Nanog-TAT auf Oct4-GiP-Zellen (129 x MF1)**

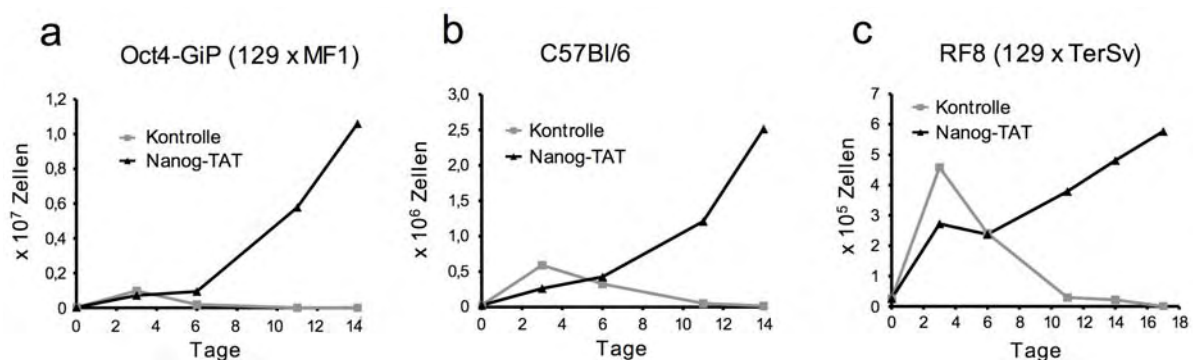
a) Oct4-GiP ES-Zellen (Ying et al., 2002) wurden auf Gelatine in den angegebenen Medien ausgesät und nach 3 Passagen im Phasenkontrast fotografiert. Hier wurde zusätzlich als Kontrolle ein Nanog-Protein ohne Homeodomäne (hergestellt von Dipl.-Biol. Bernhard Müntz aus unserer Arbeitsgruppe) mitgetestet. Die Konzentration beider Proteine betrug ca. 100 nM. Bei den LIF-entzogenen Kulturen sind in Anwesenheit von Nanog-TAT kleine, vorwiegend einschichtige Kolonien zu erkennen (schwarze Pfeilspitze). In Anwesenheit von LIF und Nanog-TAT haben die Zellen eine kompaktierte Morphologie (weißer Pfeil). Skalierung, 50  $\mu$ m



stimuliert wurden. Dieser biologische Effekt konnte nicht mit einem Kontrollprotein (Nanog $\Delta$ H $\Delta$ D) induziert werden. Nanog $\Delta$ H $\Delta$ D wurde von Dipl.-Biol. Bernhard Münst aus unserer Arbeitsgruppe zu Verfügung gestellt und enthält weder Homeo- noch Transduktionsdomäne. Bei Zugabe von Nanog-TAT und LIF zusammen bildeten sich wieder bevorzugt kompakte, undifferenzierte Kolonien, die sich zum Teil von der Kulturschale ablösten. Bei Nanog $\Delta$ H $\Delta$ D-behandelten Zellen ließen sich diese Morphologien nicht beobachten (Abb. 23).

### 3.3.3 Proliferation LIF-entzogener ES-Zellen in Anwesenheit von Nanog-TAT

Um zu überprüfen, ob Nanog-TAT bei anderen ES-Zellen ebenfalls einen Proliferationseffekt induziert, wurde die Proliferation von drei verschiedenen ES-Zelllinien untersucht: Oct4-GiP, (Ying et al., 2002); C57BL/6, (Inzuchtlinie) und RF8 (Meiner et al., 1996). Die Zellen wurden für mindestens 14 Tage LIF-entzogen und mit Nanog-TAT kultiviert. Bei jeder Passage wurde die Zellen gezählt und die kumulative Zellzahl bestimmt (Abb. 24a-c). In allen drei Fällen führte die Zugabe von Nanog-Protein zu einer fortgesetzten Proliferation, während die unbehandelten Kontrollzellen nicht weiter expandiert werden konnten. Unterschiede sind lediglich in der Proliferationsdynamik festzustellen. Die Oct4-GiP-Zellen proliferierten am schnellsten im Nanog-Medium, die RF8-Zellen hingegen sind am schwächsten expandiert. Hier betrug die Verdopplungszeit der Population ungefähr eine Woche, bei den Oct4-GiP und C57BL/6 Zellen dagegen ca. 2 – 3 Tage.

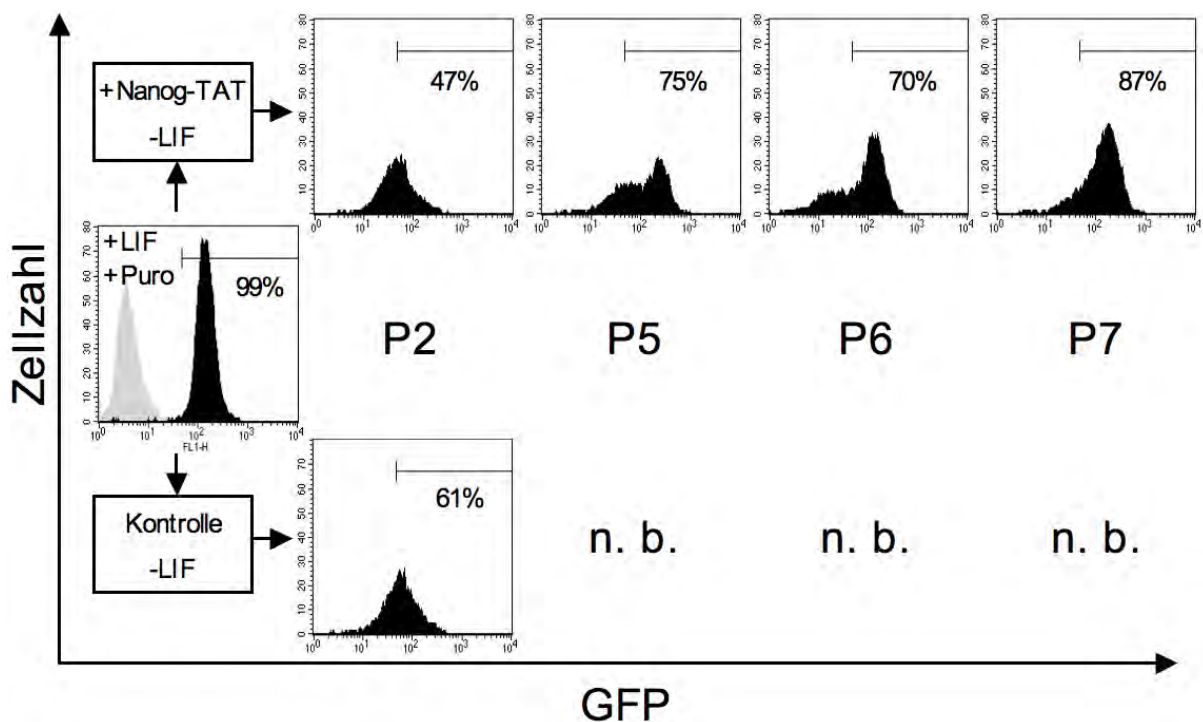


**Abb. 24: Proliferation von Nanog-TAT behandelten ES-Zellen unter LIF-Entzug**

Drei unterschiedliche ES-Zelllinien wurden für mehrere Passagen ohne LIF mit Nanog-TAT kultiviert. Bei jeder Passage wurde die Zellen gezählt und die kumulative Zellzahl ermittelt. **a)** Oct4-GiP ES-Zellen (129 x MF1); **b)** C57BL/6 Zellen; **c)** RF8 Zellen (129 x TerSv).

### 3.3.4 Durchflusszytometrische Analyse Nanog-TAT-behandelter Oct4-GiP ES-Zellen

Zur genaueren Charakterisierung der Nanog-TAT-behandelten, LIF-entzogenen ES-Zellen und zur Bestimmung des Anteils Oct4-positiver Zellen, wurden Oct4-GiP Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurde über mehrere Passagen der Expressionsstatus des Oct4-Transgens anhand der GFP-Fluoreszenz erfasst. Vor Beginn des Experiments wurden differenzierte Zellen mit Puromycin gegenselektiert. Die Zellen wurden dann für mehrere Passagen ohne LIF mit oder ohne Nanog-TAT kultiviert und die GFP-Fluoreszenz in der Population mittels FACS-Analyse bestimmt (Abb. 25). Bei Passage 2 ist kein wesentlicher Unterschied zwischen Nanog-TAT-behandelten und Kontrollzellen auszumachen. In der Kontrollkultur sind ungefähr ein Viertel mehr GFP-positive Zellen. Zwischen Passage 2 und Passage 5 war die Zellzahl für eine FACS-Analyse zu gering, bzw. die Kontrollzellen sind differenziert und konnten nicht weiter expandiert werden. Bei den höheren Passagezahlen (5 – 7) hat sich bei den Nanog-TAT-behandelten Zellen eine Population mit hoher GFP-Intensität angereichert. So betrug bei Passage 7 der Anteil GFP-positiver Zellen 87 % (Abb. 25).

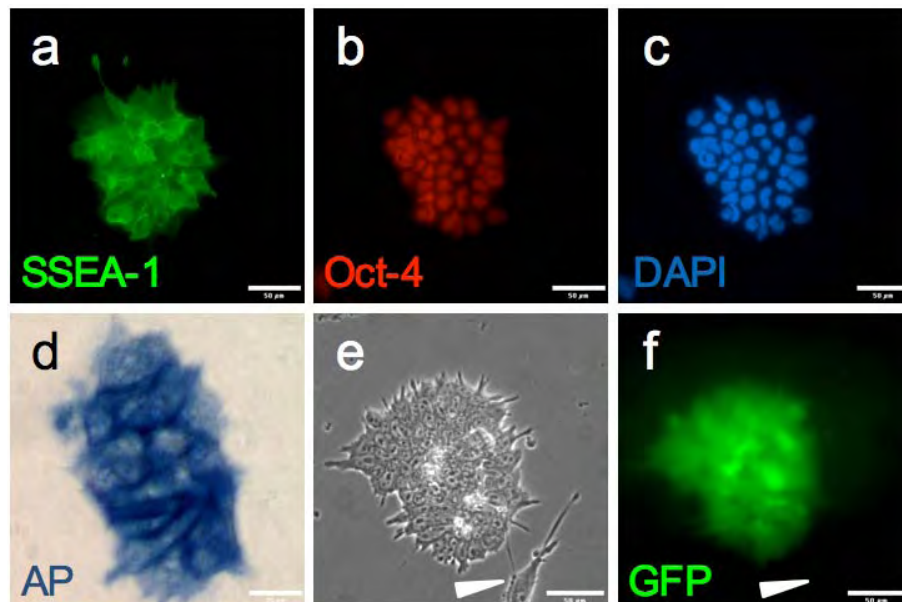


**Abb. 25: FACS-Analyse von Nanog-TAT behandelten Oct4-GiP ES-Zellen unter LIF-Entzug**

Oct4-GiP ES-Zellen (Ying et al., 2002) tragen ein Transgen mit einer regulatorischen Sequenz des Oct4-Promotors welche die Expression von GFP und einer Puromycin-Resistenz reguliert. Vor Beginn des Experiments wurden differenzierte Zellen über Puromycin-Selektion entfernt. Die Zellen wurden dann von Passage 2 bis 7 ohne LIF mit oder ohne Nanog-TAT kultiviert, und die GFP-Fluoreszenz in der Population mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Prozentzahl in den Histogrammen gibt den Anteil an GFP-positiven Zellen an. Schwarz, Oct4-GiP Zellen; grau, C57Bl/6 wt Zellen  
n.b., nicht bestimmbar (Zellen haben Proliferation eingestellt); P, Passagenzahl

### 3.3.5 Immunhistochemische Marker-Analyse

Für die weitere Charakterisierung der LIF-frei expandierten Nanog-TAT Kulturen wurden sie bei Passage 8 (entspricht etwa einem Monat Kultur) auf die Anwesenheit verschiedener Pluripotenzmarker gefärbt (Abb. 26). Die für die Nanog-TAT-Behandlung charakteristischen, einschichtigen Kolonien waren positiv für die ES-Zellmarker SSEA-1 (Solter und Knowles, 1978; Gooi et al., 1981), Oct4 (Nichols et al., 1998) und Alkalische Phosphatase (Pease et al., 1990) (Abb. 26 – d). Darüber hinaus zeigten die Zellen eine intensive GFP-Fluoreszenz, wobei morphologisch differenziert erscheinende Zellen tatsächlich GFP-negativ waren (Abb. 26e, f, Pfeilspitze).

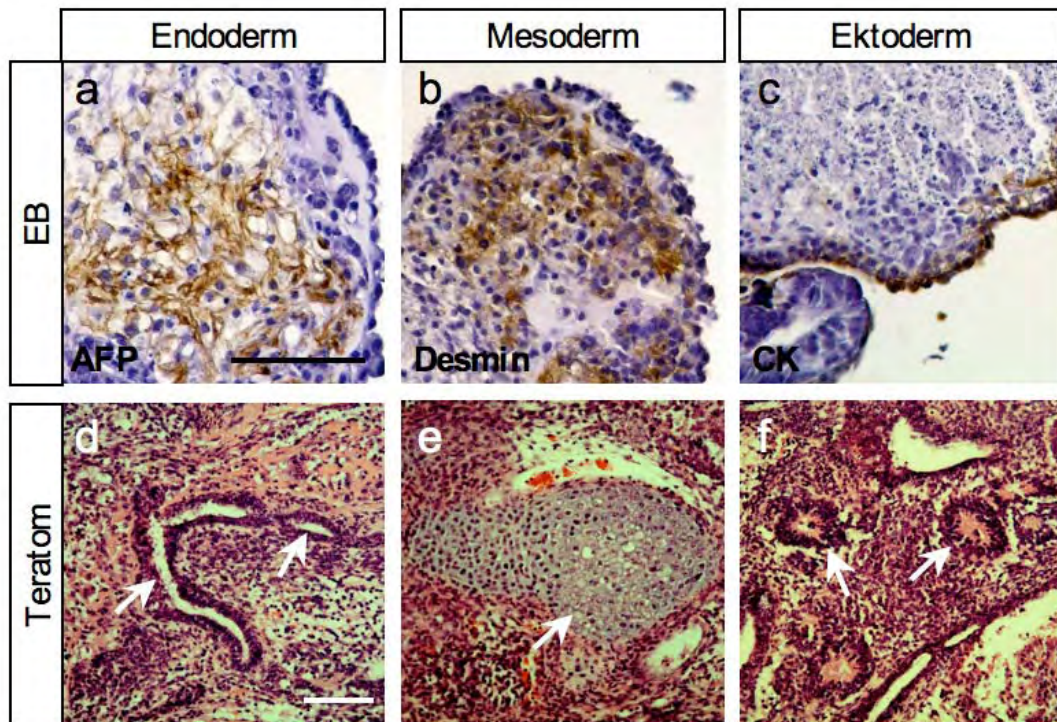


**Abb. 26: Charakterisierung von Nanog-TAT behandelten ES-Zellen**

Oct4-GiP ES-Zellen wurden für 8 Passagen mit Nanog-TAT in LIF-freiem Medium kultiviert. Kontrollzellen ohne Nanog-TAT sind in diesem Zeitraum vollständig differenziert. **a) – d)** Die Zellen wurden auf die Pluripotenzmarker SSEA-1, Oct-4 und Alkalische Phosphatase gefärbt. **e)** Phasenkontrast einer typischen Kolonie. **f)** Fluoreszenzbild der Kolonie aus e). Die differenzierte Zelle (weiße Pfeilspitze) zeigt keine GFP-Fluoreszenz. AP, Alkalische Phosphatase; Skalierung, alle 50  $\mu\text{m}$ , nur AP: 25  $\mu\text{m}$

### 3.3.6 *In vitro*-Differenzierung Nanog-TAT-behandelter ES-Zellen

Um das Entwicklungspotential der Nanog-TAT-behandelten ES-Zellen zu prüfen, wurde getestet, inwieweit sie in einem Differenzierungsmodell noch Zellen aller drei Keimblätter ausbilden zu können. Hierzu wurden Oct4-GiP ES-Zellen benutzt, die 12 Passagen mit Nanog-TAT in LIF-freiem Medium kultiviert wurden. Unbehandelte Kontrollzellen sind in diesem Zeitraum vollständig differenziert. Die Zellen der Nanog-TAT-Kultur wurden in Suspension aggregiert und die Zellhaufen bildeten innerhalb von 14 Tagen



**Abb. 27: Pluripotenzanalyse von Nanog-TAT behandelten ES-Zellen**

Oct4-GiP ES-Zellen wurden für 12 Passagen mit Nanog-TAT in LIF-freiem Medium kultiviert. Kontrollzellen ohne Nanog-TAT sind in diesem Zeitraum vollständig differenziert. **a) – c)** Die Zellen wurden in Suspensionskultur aggregiert, und die entstandenen Embryoid-Körperchen wurden nach 2 Wochen auf die drei Keimblattmarker Alpha-1-Fetoprotein (AFP; Endoderm), Desmin (Mesoderm) und Cytokeratin (CK; Ektoderm) gefärbt. **d) – f)** Oct4-GiP ES-Zellen wurden für 8 Passagen mit Nanog-TAT in LIF-freiem Medium kultiviert. Die Zellen wurde dann wieder mit LIF versetzt und expandiert. Nach Injektion in immundefiziente SCID-beige Mäuse ( $10^6$  Zellen/Tier) konnten Tumore (Teratome) isoliert werden. Bei der histologischen Charakterisierung ließen sich verschiedene Strukturen wie Drüsengewebe (Endoderm), Knorpelgewebe (Mesoderm) und primitives Neuroepithel (Ektoderm) identifizieren. Die relevanten Strukturen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Skalierung, 200  $\mu$ m

Embryoidkörperchen (EBs) aus. Schnitte dieser EBs ließen sich positiv färben auf die drei Keimblattmarker Alpha-1-Fetoprotein (AFP; Endoderm), Desmin (Mesoderm) und Cytokeratin (CK; Ektoderm) (Abb. 27a – c).

### 3.3.7 Differenzierungspotential *in vivo*

#### *Teratombildung*

Eine Möglichkeit zum Pluripotenznachweis *in vivo* ist die Teratombildung. Hierzu werden ES-Zellen in immundefiziente SCID-beige Mäuse injiziert, und die gebildeten Tumore (Teratome) werden auf die Anwesenheit von differenziertem Gewebe untersucht. Nach Injektion von pluripotenten Zellen sollten sich repräsentative Strukturen aller drei Keimblätter nachweisen lassen. Das Differenzierungspotential Nanog-TAT-behandelter Oct4-GiP ES-Zellen sollte auch auf diese Weise überprüft werden. Dazu wurden die ES-Zellen nach 8

Passagen ohne LIF und mit Nanog-TAT wieder in LIF-haltiges Medium gegeben, expandiert und anschließend in SCID-beige Mäuse injiziert. Bei der histologischen Charakterisierung der Teratome ließen sich verschiedene differenzierte Strukturen, wie Drüsengewebe (Endoderm), Knorpelgewebe (Mesoderm) und primitives Neuroepithel (Ektoderm), finden (Abb. 27d – f).

### *Blastozysten-Injektion*

Mit dem letztlich aussagekräftigsten Versuch zum Pluripotenznachweis, der Blastozysten-Injektion, sollte geklärt werden, inwieweit Nanog-TAT das Potential der Zellen erhält, sich an der Entwicklung eines ganzen Organismus beteiligen zu können. Dazu wurden Oct4-GiP-Zellen für 8 Passagen in Abwesenheit von LIF mit Nanog-TAT kultiviert, anschließend wieder in normalem LIF-supplementierten ES-Zellmedium expandiert und in C57BL/6 Blastozysten injiziert. Aus dieser Injektionsrunde mit 120 transferierten Blastozysten sind 19 Nachkommen hervorgegangen (Abb. 28a,b). Die Schwanzspitzen der Mäuse wurden über



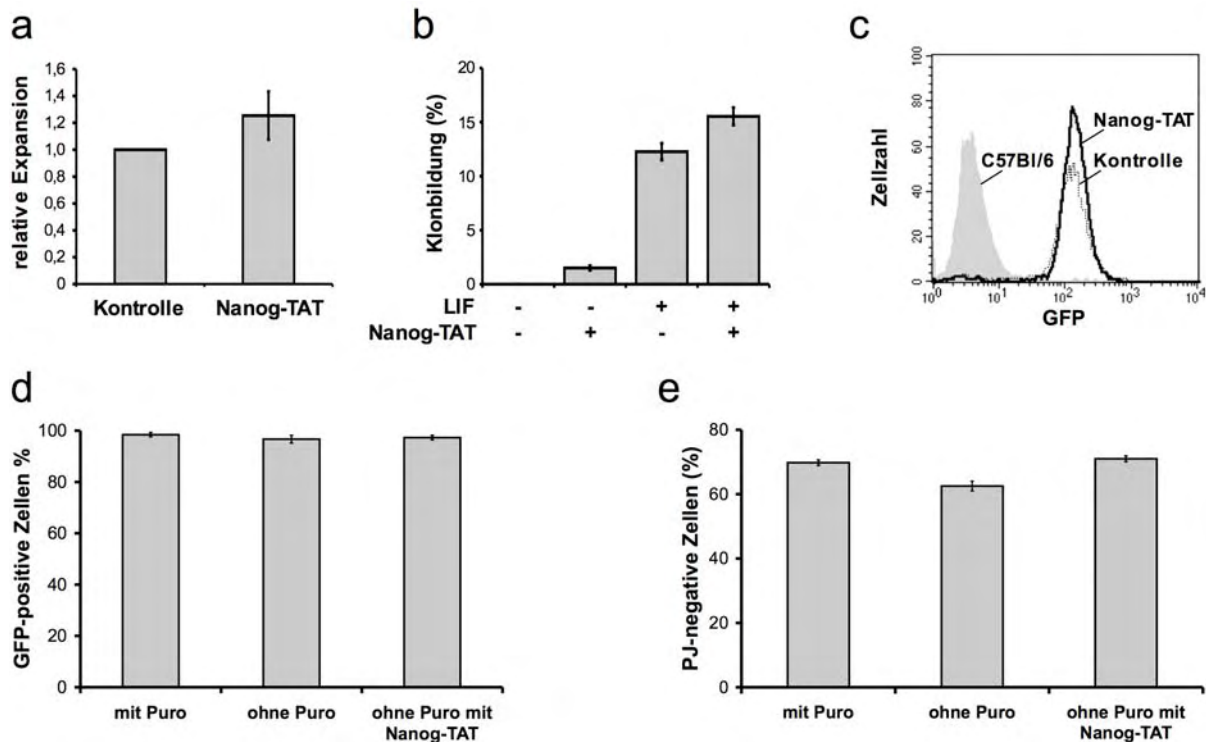
**Abb. 28: Blastozysten-Injektion von Nanog-TAT behandelten ES-Zellen**

Oct4-GiP ES-Zellen wurden für 8 Passagen mit Nanog-TAT in LIF-freiem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen wieder in normales ES-Zellmedium inkl. LIF überführt und expandiert. **a)** Aus einer Injektionsrunde der Zellen in C57Bl/6 Blastozysten sind 19 Nachkommen hervorgegangen. Drei der vier Chimären waren fertil (alle Männchen), doch konnten keine Keimbahn-Transmission festgestellt werden **b)** Die Schwanzspitzen der Nachkommen wurden über PCR genotypisiert; hierbei wird ein Teil des GFP-Gens amplifiziert. Als Kontrolle dienten die injizierten ES-Zellen. **c)** Nachdem die Nachkommen keine Keimbahn-Transmission zeigten, wurden Organe einer repräsentativen Maus (#18) genotypisiert. Als Positiv-Kontrolle dienten die injizierten ES-Zellen, als Negativ-Kontrolle C57Bl/6 ES-Zellen. In alle Reaktionen wurden 100 ng genomische DNA als Templat eingesetzt. Das Sternchen markiert die erwartete Laufhöhe (702 bp) des korrekten PCR-Amplifikats. **d)** Präparierte Maus vor Organentnahme für PCR-Analyse in b). Die Art der Fellfärbung war bei allen Chimären sehr ähnlich. Oct4-GiP-abgeleitete Gewebe bilden weißes Fell aus. Schwarzes Fell leitet sich aus Zellen der C57Bl/6-Blastozyste ab.

eine PCR genotypisiert die ein Teil des GFP-Gens amplifiziert. Als Kontrolle dienten die injizierten ES-Zellen. Nachdem die positiv-typisierten Nachkommen bei Verpaarungsversuchen keine Keimbahn-Transmission zeigten, wurden bei einer repräsentativen Maus jeweils zwei Gewebetypen pro Keimblatt genotypisiert (Abb. 28c). Als Positiv-Kontrolle dienten die injizierten ES-Zellen, als Negativ-Kontrolle C57BL/6 ES-Zellen. Zur Standardisierung wurde in allen PCR-Ansätzen 100 ng genomische DNA als Templat eingesetzt. In allen entnommenen Geweben, mit Ausnahme der Leber, konnte die Anwesenheit des GFP-Transgens festgestellt werden. Insgesamt waren die Produktmengen der PCR aber relativ schwach im Vergleich zur Positivkontrolle, insbesondere bei Proben des Gehirns und der Hoden. Am meisten PCR-Produkt bildet sich bei der Dünndarm-Probe. Der geringe Chimärismus spiegelte sich auch in der weitgehend schwarzen Fellfarbe des untersuchten Tieres wider. Die Art der Fellfärbung war allen Chimären sehr ähnlich. Schwarzes Fell leitet sich aus Zellen der C57BL/6-Blastozyste ab und Oct4-GiP-abgeleitete Haarfollikel bilden weißes Haar aus (Abb. 28d).

### 3.3.8 Synergismus von Nanog-TAT und LIF

Wie oben bereits beschrieben, sieht man bei ES-Zellen auf morphologischer Ebene einen kombinatorischen Effekt von LIF- und Nanog-TAT-Behandlung (siehe Kapitel 3.3.2). Im Folgenden wurde der möglicherweise synergistischen Wirkung von Nanog-TAT und LIF weiter nachgegangen. So wurde der Einfluss beider Faktoren auf die Proliferation von ES-Zellen über mehrere Passagen getestet. Im Vergleich zu den Kontrollzellen war die Zellzahl bei jeder Passage im Durchschnitt ca. 25 % höher (Abb. 29a). Ein Merkmal von murinen ES-Zellen ist, dass man mit den Zellen klonal arbeiten kann, d. h. eine einzelne Zellen bildet wieder eine neue Kolonien aus. Um den Einfluss von Nanog-TAT auf die Klonbildungseffizienz zu testen, wurden Oct4-GiP ES-Zellen in An- oder Abwesenheit von LIF für 3 Passagen mit bzw. ohne Nanog-Protein behandelt. Anschließend wurden aus den so vorinkubierten Zellen eine Einzelzell-Suspension gemacht und in klonaler Dichte (60 Zellen/cm<sup>2</sup>) in LIF-haltigem ES-Zellmedium ausgesät. Mit Puromycin wurde dann gegen Oct4-negative Zellen selektiert. Nach 6 Tagen wurde die Zahl der gebildeten Kolonien ins Verhältnis zu der Menge an ausgesäten Zellen gesetzt und so die Klonbildungseffizienz bestimmt (Abb. 29b). In Abwesenheit von LIF konnten sich nur noch aus Nanog-TAT behandelten Zellen Kolonien bilden (Effizienz: ca. 1,5 %). Ohne Nanog-Protein hat sich aus den LIF-entzogenen Zellen keine einzige Kolonie mehr formen können. In der Anwesenheit



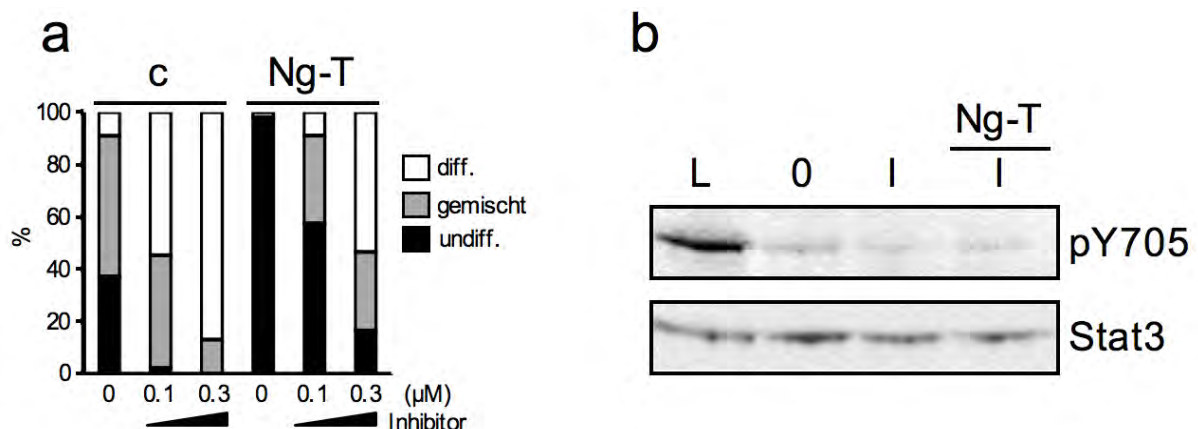
**Abb. 29: Synergistische Wirkung von Nanog-TAT und LIF**

**a)** Oct4-GiP ES-Zellen wurden mit Nanog-TAT und LIF kultiviert. Die mittlere Expansionsrate (Teilungsrate) wurde ermittelt und mit unbehandelten Zellen verglichen. (n = 4) **b)** Oct4-GiP-Zellen wurden für 3 Passagen in An- bzw. Abwesenheit von Nanog-TAT und LIF kultiviert und darauf in klonaler Dichte (60 Zellen/cm<sup>2</sup>) in normalem ES-Zellmedium mit Puromycin ausgesät. Nach 6 Tagen Selektion auf Oct4-positive Zellen wurden die ES-Zellkolonien ausgezählt und die Klonbildungsrate errechnet. (n = 3) **c)** Oct4-GiP ES-Zellen wurden für 4 Passagen mit Nanog-TAT und LIF kultiviert und über eine FACS-Analyse mit unbehandelten Kontrollzellen, sowie nicht-fluoreszierenden ES-Zellen (C57Bl/6) verglichen. **d)** Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz lebender Zellen (n = 9). **e)** Quantifizierung lebender Zellen (Propidiumiodid-negativ) pro erfasstem Zählereignis. (n = 9).

von LIF lag die Klonbildungsrate bei ca. 12 %. Mit Nanog-TAT war der Anteil gebildeter Kolonien mit ca. 15 % um ein Viertel höher als bei der Kontrolle. Um zu testen, ob sich der kombinatorische Effekt auch auf die Oct4-Promotor-regulierte GFP-Fluoreszenz auswirkt, wurden Oct4-GiP ES-Zellen nach 4 Passagen mit LIF und Nanog-TAT durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 29c). Die Intensitäten der GFP-Fluoreszenz Nanog-behandelter Zellen ist etwas homogener und weniger gestreut als bei Kontrollzellen, welche ohne Puromycin kultiviert wurden. Der Anteil GFP-positiver Zellen bleibt nahezu gleich, unabhängig ob die Zellen mit Puromycin selektiert oder mit Nanog-Protein behandelt wurden (Abb. 29d). Allerdings zeigt die Quantifizierung lebender Zellen (Propidiumiodid negative Zellen), dass ohne Puromycin-Selektion 10 – 15 % weniger lebende Zellen zur GFP-Analyse erfasst werden. Dieser Verlust vitaler Zellen kann durch Zugabe von Nanog-TAT wieder vollständig kompensiert werden (Abb. 29e).

### 3.3.9 Aktivität von Nanog-TAT ist unabhängig vom JAK/Stat3 Signalweg

Um die Differenzierung von Maus-ES-Zellen zu verhindern, muss durch LIF-Zugabe der JAK/Stat3 Signalweg aktiviert werden (Übersicht bei Chambers, 2004). Zur Untersuchung, ob bei der Selbsterneuerung der ES-Zellen unter Nanog-TAT-Einfluss dieser Signalweg eine Rolle spielt, wurde die Nanog-TAT Aktivität in Anwesenheit des spezifischen JAK-Inhibitors D6665 (Thompson et al., 2002) getestet. Oct4-GiP ES-Zellen wurden in klonaler Dichte in Nanog-TAT-Medium ausgesät, dem 0,1 bzw. 0,3  $\mu\text{M}$  JAK-Inhibitor sowie LIF zugegeben wurde. Nach 5 Tagen wurden die Zellen auf AP-Aktivität gefärbt und der Anteil der undifferenzierten, gemischten und differenzierten Kolonien bestimmt. (Abb. 30a). In den Kontrollen reduziert sich der Anteil undifferenzierter Kolonien in der Anwesenheit vom Inhibitor von ca. 40 % auf 2 % mit 0,1  $\mu\text{M}$  bzw. auf 0 % mit 0,3  $\mu\text{M}$ . Selbst Mischkolonien sind bei der höheren Inhibitor-Konzentration nur vereinzelt vorhanden (ca. 10 %). Nanog-TAT dagegen ermöglicht bei der geringeren Inhibitor-Konzentration die Ausbildung von mehr undifferenzierten Kolonien als bei der Kontrolle ohne Inhibitor. Selbst bei der höheren Inhibitor-Konzentration ermöglicht das Protein noch die Bildung von fast 20 % undifferenzierter Kolonien. Um auszuschließen, dass Nanog-TAT-Präparationen nicht auf anderem Wege zur Stat3-Phosphorylierung führen, wurde der Phosphorylierungsstatus von Stat3 bei Anwesenheit von Nanog-TAT geprüft. Hierzu wurden ES-Zellen in hoher Dichte für 24 h mit 1000 Einheiten LIF/ml, ohne LIF bzw. mit LIF-Inhibitor hLIF-05 kultiviert. Zusätzlich wurden Zellen mit LIF-Inhibitor und Nanog-TAT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und über Western Blot der Phosphorylierungsstatus von Stat3 untersucht



**Abb. 30: Nanog-TAT Aktivität ist unabhängig vom JAK/Stat3 Signalweg**

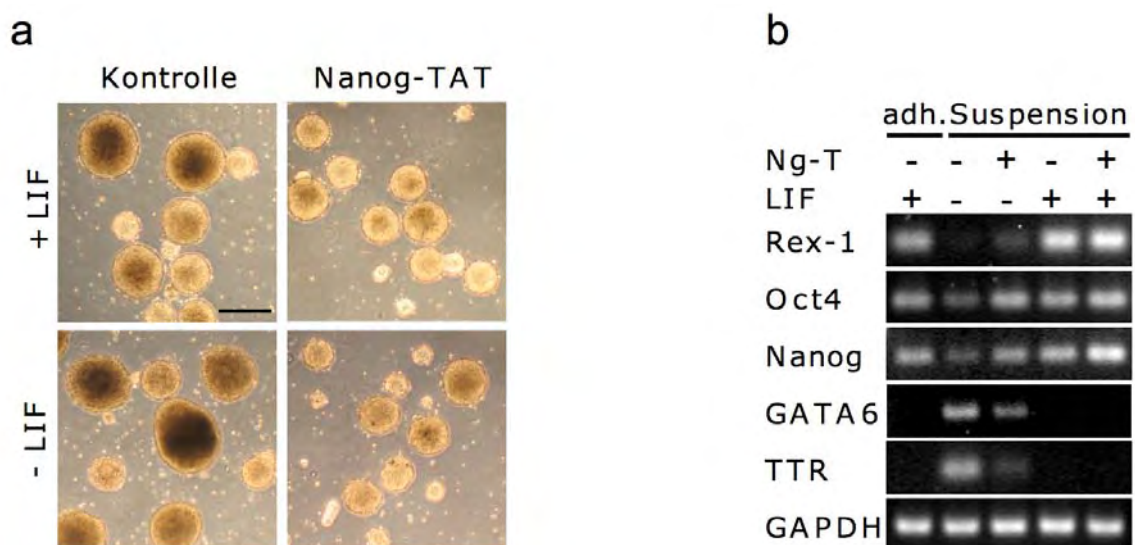
**a)** Oct4-GiP ES-Zellen wurden in klonaler Dichte in Medium mit 100 nM Nanog-TAT, LIF und dem JAK-Inhibitor D6665 (Thompson et al., 2002) ausgesät. Nach 5 Tagen wurden die Zellen auf AP-Aktivität gefärbt und der Anteil der undifferenzierten, gemischten und differenzierten Kolonien bestimmt. **b)** ES-Zellen wurden in hoher Dichte ( $10^5$  Zellen/ $\text{cm}^2$ ) für 24 h wie beschriftet kultiviert. Anschließend wurde das Lysat von  $2 \times 10^5$  Zellen über Western Blot mit einem anti-phospho-Stat3 Antikörper (Tyrosin 705) der Phosphorylierungsstatus von Stat3 untersucht (oben). Die Proben wurden in einem weiteren Blot mit einem Antikörper gegen Stat3 untersucht (unten). L, mit LIF; 0, ohne LIF; I, LIF-Inhibitor; Ng-T, Nanog-TAT



(Abb. 30b). Das Antikörper-Signal ist in Anwesenheit von LIF am stärksten und schwächt sich durch hLIF-05-Zugabe so stark ab, dass sich das Signal kaum von Hintergrund abhebt. Dieser negative Phosphorylierungszustand wird durch die Anwesenheit von Nanog-TAT-Protein im Medium nicht verändert.

### 3.3.10 Inhibition der endodermalen Differenzierung durch Nanog-TAT

Um zu überprüfen auf welchem Wege, Nanog-TAT die Differenzierung von ES-Zellen inhibiert, wurden Oct4-GiP ES-Zellen aggregiert und für 4 Tage in An- oder Abwesenheit von Nanog-TAT bzw. LIF kultiviert (Abb. 31a). Auf morphologischer Ebene induzierte die Behandlung mit Nanog-TAT-Protein eine gleichmäßigere Oberfläche der Aggregate. Auch hatten die Aggregate im Schnitt einen geringeren Durchmesser und keine dunkle Zyste im Inneren, wie man es bei den aus unbehandelten Zellen abgeleiteten Kontrollen beobachten konnte. Um Veränderungen der Aggregate auf Transkriptionsebene zu untersuchen, wurde die Expression von Pluripotenz- und Endoderm-assoziierten Gentranskripten der Aggregate erfasst (Abb. 31b). Bei den Pluripotenzmarkern Rex-1, Oct4 und Nanog geht ohne LIF-Stimulation übereinstimmend die Transkription deutlich zurück. Durch Zugabe von Nanog-TAT lässt sich diese Reduktion ganz (Oct4, Nanog) oder teilweise (Rex-1) kompensieren. In Anwesenheit von LIF sind nur geringe Transkriptionsunterschiede zwischen den analysierten Proben zu finden. Allerdings ist das Transkriptions-Niveau von Nanog bei der Kombination



**Abb. 31: Nanog-TAT unterdrückt die Differenzierung von ES-Zellen**

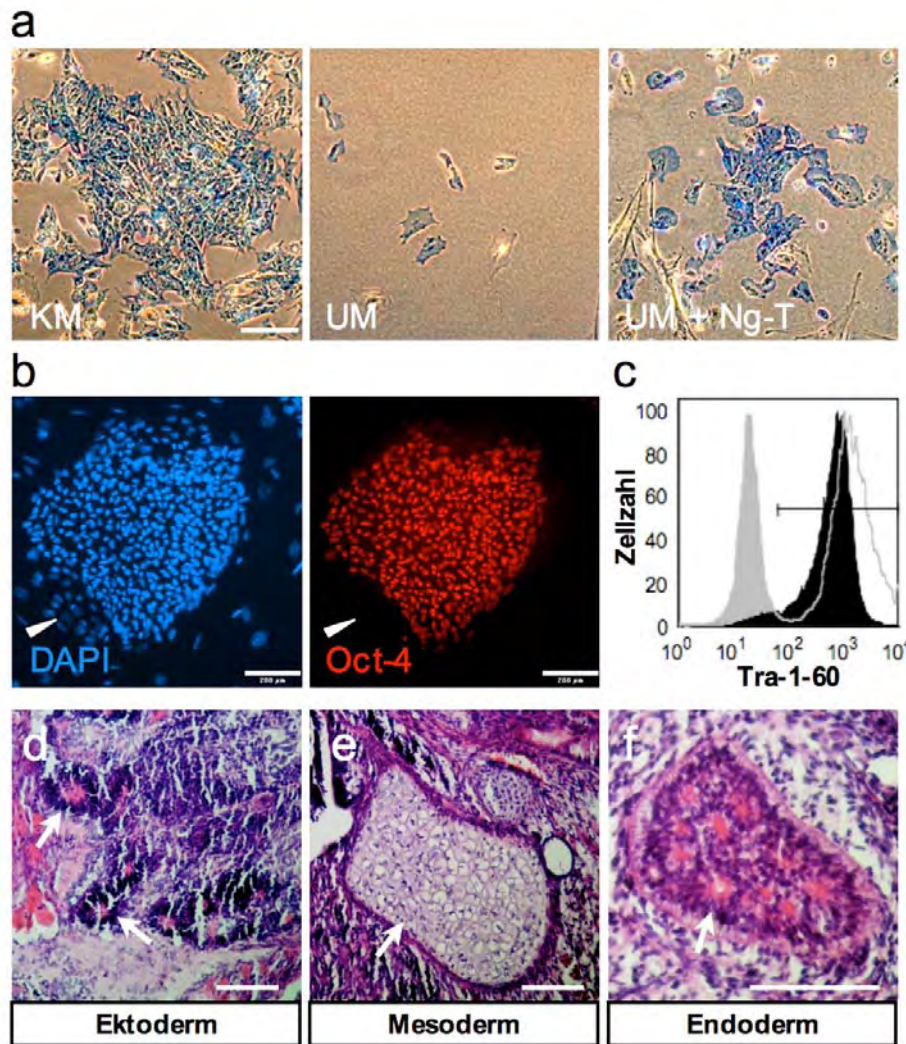
**a)** Oct4-GiP Zellen wurden in Suspensionskultur in den angegebenen Medien aggregiert und nach 4 Tagen fotografiert. **b)** Von den Aggregaten wurde RNA präpariert und über RT-PCR die Expression von Pluripotenzfaktoren (Rex-1, Oct4, Nanog) sowie endodermalen Markern (GATA6 und TTR) untersucht. adh., adhärenz kultiviert; Ng-T, Nanog-TAT; TTR, Transthyretin. Skalierung, 200 µm

von LIF und Nanog-TAT stärker als bei den in Suspension oder adhärent kultivierten Kontrollzellen. Die Expression der endodermalen Marker GATA-6 und Transthyretin (TTR) ist nur in den LIF-entzogenen Aggregaten nachweisbar (Abb. 31b). Doch bei Zugabe von Nanog-TAT ist die Transkription dieser Gene in den Aggregaten deutlich reduziert.

### 3.3.11 Nanog-TAT reduziert die Differenzierung humaner ES-Zellen

Humane ES-Zellen werden in der Regel auf MEF-Zellen kultiviert, welche das Medium mit weitgehend unbekanntem Faktoren zur Pluripotenzerhaltung konditionieren. In herkömmlichen Medien können humane ES-Zellen ohne MEFs kultiviert werden, wenn das Medium zuvor von MEFs konditioniert wurde (Xu et al., 2001) oder durch Zugabe hoher Konzentrationen von bFGF (Xu et al., 2005), durch die Kombinationen von bFGF mit Noggin (Xu et al., 2005; Wang et al., 2005) oder durch TGF- $\beta$ /Aktivin/Nodal-Signalmoleküle (Beattie et al., 2005; James et al., 2005; Vallier et al., 2004).

Um zu testen, ob sich mit murinem Nanog-TAT in humanen ES-Zellen ähnliche Ergebnisse erzielen lassen wie bei Maus-ES-Zellen, wurden humane H9.2 ES-Zellen (Amit et al., 2000) für 4 Tage ohne MEFs in unkonditioniertem Medium kultiviert (Abb. 32a). Die Zellen wurden anschließend auf Alkalische Phosphatase-Aktivität gefärbt. Unbehandelte Zellen sind unter diesen Bedingungen nicht weiter proliferiert, und die verbliebenen Zellen zeigten nur noch geringe AP-Aktivität. Dagegen bildeten sich in Nanog-TAT-behandelten Kulturen AP-positive Kolonien. Diese waren allerdings deutlich kleiner, und enthielten mehr undifferenzierte Zellen als Kolonien, die in konditioniertem Medium gewachsen sind. In einem weiteren Versuch wurden die Zellen für eine Woche unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die verbliebenen Zellen abgelöst und in Standardmedium auf MEFs passagiert. Aus den Passagen der unbehandelten Zellen konnten sich keine Kolonien mehr entwickeln; dies war nur mit Kulturen möglich, die mit Nanog-TAT inkubiert wurden. Um zu testen, ob die Zellen nach dieser transienten Nanog-TAT-Inkubation weiterhin Pluripotenzmarker exprimieren, wurden sie mit Oct4-spezifischen Antikörpern gefärbt (Abb. 32b) und zusätzlich durchflusszytometrisch die Expression des Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarkers Tra-1-60 untersucht (Abb. 32c). Die Kolonien waren bis auf kleinere Randbereiche alle positiv für Oct4. Auch den Marker Tra-1-60 prägten fast alle untersuchten Zellen aus, die Intensität der Antikörper-Färbung fiel etwas geringer aus als bei unbehandelten Kontrollzellen.



**Abb. 32: Nanog-TAT unterdrückt die Differenzierung von ES-Zellen**

**a)** Humane ES-Zellen (H9.2; Amit et al., 2000) aus MEF-freier Kultur wurden auf Laminin-beschichtete Kulturschalen transferiert und in den angegebenen Medien für 4 Tage kultiviert. Die Zellen wurden anschließend auf Alkalische Phosphatase-Aktivität gefärbt. **b)** Humane ES-Zellen (H9.2) wurden für 7 Tage wie in a) beschrieben kultiviert, und anschließend auf MEF-Zellen mit normalem humanem ES-Zellmedium passagiert. Die Kontrollzellen bildeten keine ES-Zellkolonien mehr aus. Die Zellen aus der Nanog-TAT-Kultur bildeten dagegen Kolonien, welche weiter expandiert wurden. Die expandierten Zellen wurden mit Antikörpern auf Oct4-Expression bzw. **c)** auf Tra-1-60 Expression untersucht. Die Spezifität der Oct4-Färbung wird deutlich an ungefärbten, differenzierten Zellen (weiße Pfeilspitze).

*Schwarze Fläche:* expandierte Zellen nach Nanog-TAT Behandlung; *graue Linie:* unbehandelte Kontrollzellen; *graue Fläche:* Sekundär-Antikörper-Kontrolle.

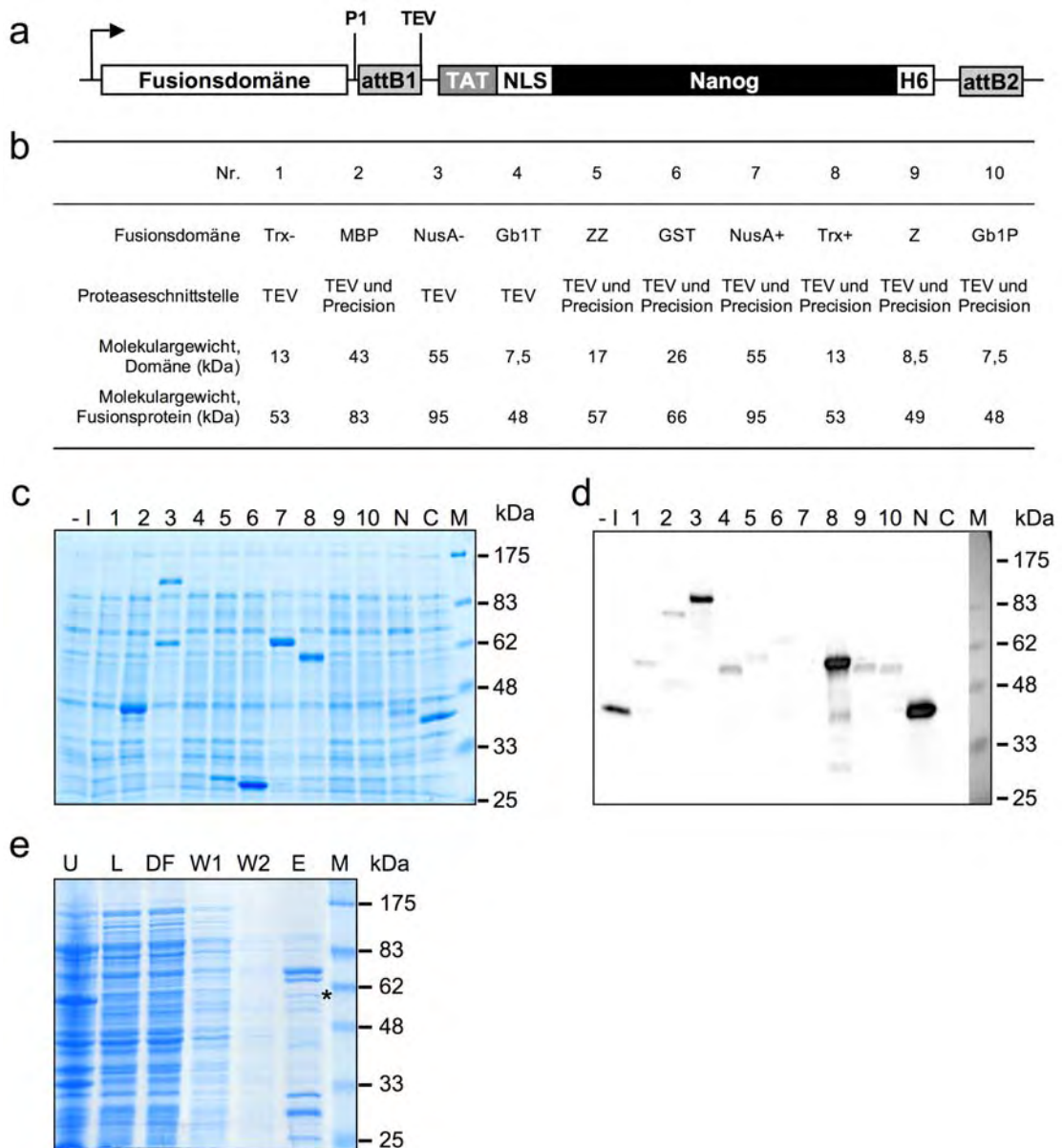
UM, unkonditioniertes humanes ES-Zellmedium ohne FGF-2; KM, konditioniertes humanes ES-Zellmedium mit FGF-2; Ng-T, Nanog-TAT. **d-f)** Die expandierten hES-Zellen aus b) wurden in immundefiziente SCID-beige Mäuse injiziert ( $1,5 \times 10^6$  Zellen/Tier) woraufhin sich Tumore (Teratome) ausbildeten. Bei der histologischen Charakterisierung ließen sich verschiedene Strukturen wie primitives Neuroepithel (Ektoderm), Knorpelgewebe (Mesoderm) und Drüsengewebe (Endoderm) identifizieren. Die relevanten Strukturen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Skalierung, a) 100  $\mu\text{m}$ , b+d-f) 200

Als finaler Test auf die Pluripotenz wurden die Zellen in immundefiziente SCID-beige Mäuse injiziert, woraufhin sich Tumore (Teratome) ausbildeten. Bei der histologischen Charakterisierung ließen sich verschiedene Strukturen wie primitives Neuroepithel (Ektoderm), Knorpelgewebe (Mesoderm) und Drüsengewebe (Endoderm) identifizieren (Abb. 32d – f).

### 3.3.12 Versuch zur Löslichkeitsverbesserung von TAT-fusioniertem Nanog

Parallel zum oben beschriebenen Ansatz, bei dem Domänenpositionen variiert worden sind, wurde eine alternative Strategie verfolgt, um die Löslichkeit und somit die Ausbeute von rekombinanten Proteinen zu steigern. Ziel war, über die Schaffung einer Vektorplattform die unter minimalem Klonierungsaufwand ein leichtes Austauschen von Fusionspartnern erlaubt, die Löslichkeit von rekombinantem Nanog zu verbessern. Hierzu wurde mit Hilfe des Gateway-Systems (Invitrogen) TAT-modifiziertes Nanog genetisch mit verschiedenen Proteinen oder Proteindomänen fusioniert, von denen berichtet wurde, dass sie zur erhöhten Löslichkeit beitragen (Braun et al., 2002, Hammarström et al., 2002; Woestenenk et al., 2003.). Die Fusionspartner lassen sich im Zuge einer Chromatographie mit Hilfe einer oder mehrerer Proteasen abspalten (Abb. 33a). Es wurden folgende Proteine mit Nanog fusioniert: *Gbl* (B1 Domäne des Streptokokken-Proteins G (Huth et al., 1997), *Z-Domäne* von Protein A (Nilsson et al., 1987), *Trx* (Thioredoxin; LaVallie et al. 1993), *GST* (Glutathion-S-Transferase; Smith und Johnson 1988), *MBP* (Maltosebindeprotein; Bedouelle und Duplay 1988) und *NusA* (Faktor aus *E.coli* zur Termination der Transkription; Davis et al., 1999) (Abb. 33b). Die Vektoren der Fusionsproteine wurden in *E. coli* transformiert und einer Expressionsanalyse unterzogen (Abb. 33c,d). Als Negativkontrolle diente das Lysat nicht-induzierter Bakterien und als Positivkontrolle wurde HTNCre verwendet, da sich dieses Protein sehr gut exprimieren lässt. Im Vergleich mit nicht-induziertem Lysat fällt im Coomassie-gefärbten Gel auf, dass bei mehreren Fusionskonstrukten überrepräsentierte Banden erscheinen, doch nur bei zwei entspricht die Laufhöhe der errechneten Größe von 95 bzw. 53 kDa: *NusA*- und *Trx*+ (Position 3 bzw. 8 im Gel bzw. der Tabelle). Bestätigt wurde dieser Befund mit einem Western Blot unter Verwendung eines anti-Nanog-Antikörpers (Abb. 33d). Nur bei den beiden genannten Fusionspartnern gibt es auf der Höhe des Vollelänge-Konstrukts ein starkes Signal. Bei allen anderen Fusionsproteinen sind nur sehr schwache Signale mit korrekter Laufhöhe auf dem Blot auszumachen. Das Konstrukt mit der *Trx*+-Fusion zeigte die stärkste Induktion, und daher wurde versucht, dieses Protein aufzureinigen. Proben des Ni-(II)-Chromatographie-Verlaufs sind auf einem SDS-Gel aufgetragen (Abb. 33e). Auf der Höhe des Gesamtproteins (mit einem Sternchen markiert) konnte nur eine sehr schwache Proteinbande festgestellt werden, ansonsten überwiegen stark andere Proteine mit einer Größe um 70 bzw. 30 kDa. In der unlöslichen Fraktion des Lysates ist dagegen auf der Höhe des Vollelänge-Proteins eine dominante Bande zu sehen. Demnach bleibt festzuhalten, dass zwar die meisten Fusionsproteine in voller Länge exprimiert werden,



**Abb. 33: Ansatz zur Verbesserung der Löslichkeit TAT-fusionierten Nanog-Proteins mit Partnerproteinen**

**a)** Schematischer Aufbau des Expressionvektors. Ausgehend von einem zu klonierenden Donor-Vektor lassen sich mit dem Gateway-System (Invitrogen) viele unterschiedliche Domänen genetisch an Nanog fusionieren. **b)** Verwendete Fusionsdomänen zur Löslichkeitsverbesserung (Details siehe Text). **c)** Induktionstest: Die unterschiedlichen Fusions-Konstrukte (Nummerierung wie in b)) wurden in *E. coli* transformiert und die Expression durch IPTG-Zugabe induziert. Nach 3 h Induktion wurden Proben genommen, in SDS-Probenpuffer lysiert und über SDS-PAGE analysiert. -I, nicht-induzierte Bakterien (mit Nanog-TAT-Expressionplasmid transformiert); N, Rohlysate Nanog-TAT-exprimierender Bakterien; C, Rohlysate HTNCRExprimierender Bakterien. **d)** Die Proben aus c), in gleicher Reihenfolge, wurden über einen Western Blot mit anti-Nanog-Antikörper analysiert. **e)** Das Konstrukt mit Trx+ zeigte unter den getesteten Fusionsproteinen die stärkste Expression. Es wurde daher versucht dieses Konstrukt über eine native Affinitätschromatografie anzureichern. Fraktionen der Chromatografie wurden über SDS-PAGE analysiert. Die erwartete Laufhöhe des Volllänge-Proteins ist mit einem Sternchen markiert. P1 und TEV, Schnittstellen für Proteasen; U, unlösliche Fraktion; L, lösliche Fraktion; DF, Säulen-Durchfluss; W, Waschfraktion; E, Elutionsfraktion; M, Marker

doch ist die Expressionsleistung zu schwach für präparative Zwecke. Das einzige Konstrukt welches sehr effizient exprimiert wird, liegt dagegen überwiegend in unlöslicher Form vor. Daher wurde weiterhin am Nanog-TAT-Protein zur Charakterisierung der Nanog-Proteintransduktion festgehalten.

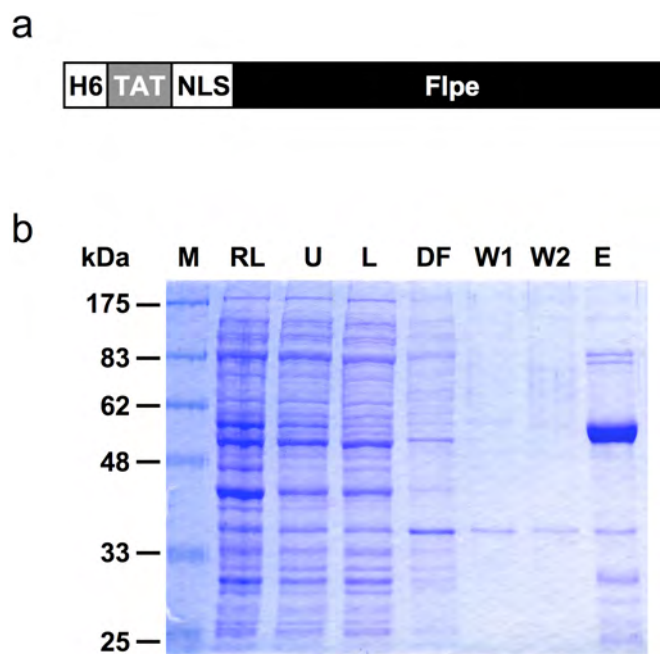
### 3.4 Herstellung einer transduzierbaren Flpe-Rekombinase

Um mit einer weiteren transduzierbaren Rekombinase das Anwendungsspektrum konditionaler Mutagenese zu erweitern, und um zu testen, ob neben Cre auch andere Proteine in ES-Zellen transduzieren können, wurde am Beginn dieser Doktorarbeit eine membrangängige Flpe Rekombinase entwickelt. Anhand einer ES-Zelllinie mit Flp-Reporterkonstrukt sollte die Flpe-Transduktion in ES-Zellen untersucht werden.

#### 3.4.1 Präparation und Charakterisierung transduzierbarer Flp Rekombinase

Das Flpe-Fusionprotein ist analog zur transduzierbaren Cre Rekombinase entworfen worden. Das rekombinante Protein besteht neben Flpe, einer thermostabileren Variante von Flp (Buchholz et al., 1998), aus einem N-terminalem His-*tag* (H6), einer TAT-Domäne und einem Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal; NLS) (Abb. 34a).

Abb. 34b zeigt anhand eines Coomassie-gefärbtem SDS-PAGE-Gels eine charakteristische Aufreinigung des Proteins aus bakteriellem Lysat. Man sieht in der Elutionsfraktion auf der erwarteten Laufhöhe von ca. 53 kDa eine dominante Bande. Unter- und oberhalb dieser



**Abb. 34: Aufbau und Reinigung des transduzierbaren Flp-Fusionsproteins HTNFlpe**

**a)** Aufbau des rekombinant hergestellten Flp-Fusionsproteins. **b)** Das Protein wurde in *E. coli* exprimiert und über Affinitätschromatographie angereichert. Fraktionen des Reinigungsverlaufs wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie angefärbt. In jede Spur wurden 2,5 µl Probe aufgetragen. H6, Sechs Histidine; NLS (*nuclear localization signal*); TAT, Protein-Transduktions-Domäne; RL, Rohlysat; U, unlösliche Fraktion; L, lösliche Fraktion; DF, Säulen-Durchfluss; W, Waschfraktion; E, Elutionsfraktion; M, Marker (Größenstandard)

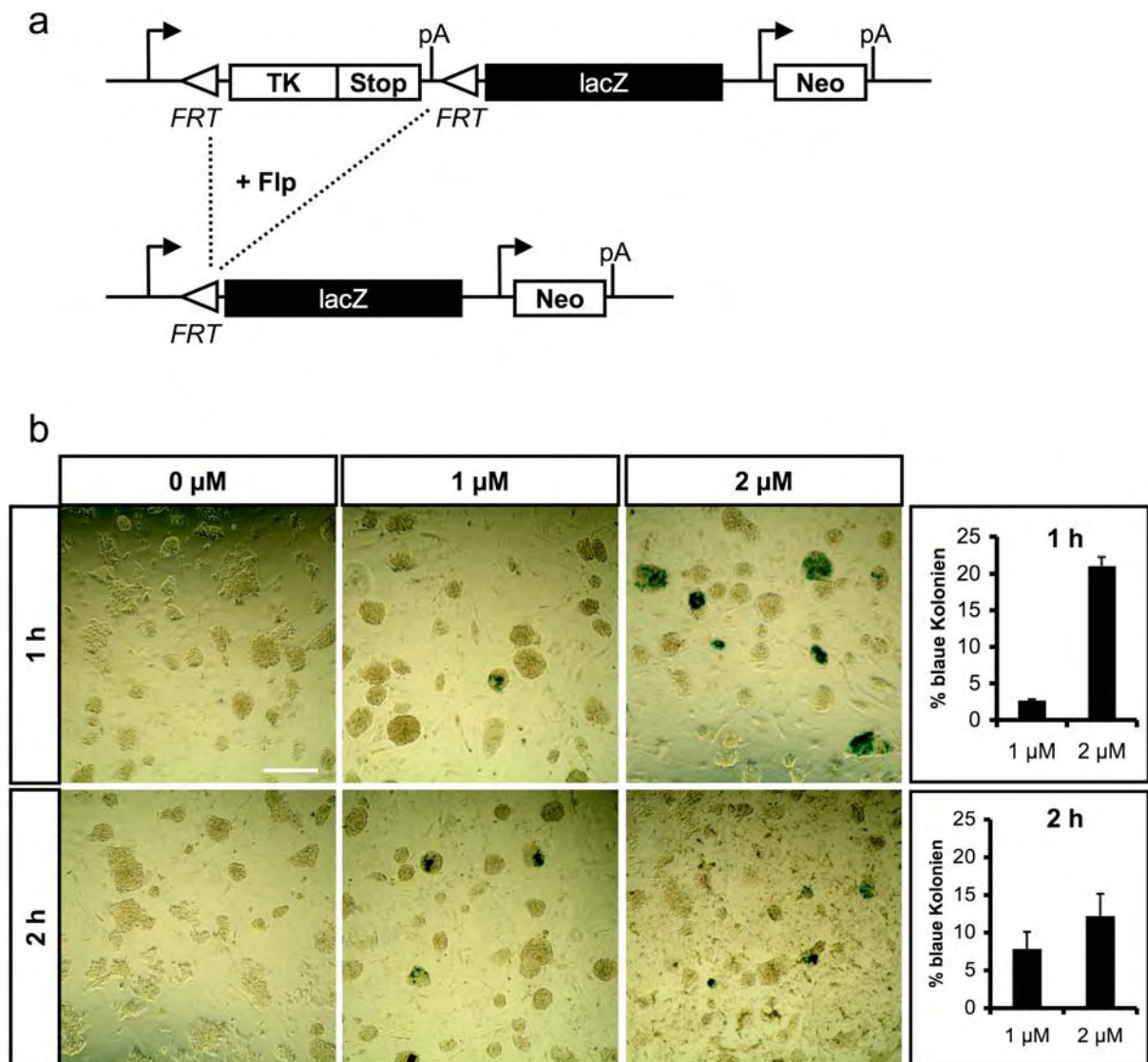
Bande sind nur sehr schwache Doppelbanden (Laufhöhen ca. 30 bzw. ca. 70 kDa) zu erkennen. Im Gegensatz zu HTN<sup>Cre</sup> war das Protein im Standard-Reinigungspuffer mit 500 mM NaCl instabil und neigte binnen 24 Stunden zur Präzipitation. Mit einer Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 2 M ist die Lösung jedoch lagerfähig und das Protein kann weiter konzentriert werden (100 – 150  $\mu$ M). Dieses Proteinkonzentrat lässt sich ohne Aktivitätsverlust oder Proteinpräzipitation einfrieren und anschließend wieder auftauen. Es wird für Zellkultur-Experimente lediglich mit Medium verdünnt, sodass, ähnlich wie bei der Glycerinstocklösung von HTN<sup>Cre</sup>, aufwendige und verlustreiche Dialyseschritte umgangen werden können.

### 3.4.2 Flpe-Transduktion in murine ES-Zellen

Die Flpe-Protein-Transduktion wurde an embryonalen Stammzellen der Maus getestet. Dazu wurde eine Flpe-Reporter-ES-Zelllinie verwendet, die innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelt wurde (Dipl.-Biol. Daniela Kessler, unpubliziert). Diese Zellen exprimieren nach Flpe-vermittelter Rekombination  $\beta$ -Galaktosidase (Abb. 35a).

Die Zellen wurden vor der Flpe-Transduktion vereinzelt und auf MEF-Zellen ausgesät. Wenige Stunden danach, wurde das Protein für 1 oder 2 Stunden mit einer Konzentration von 1 oder 2  $\mu$ M in serumfreiem Medium zu den Zellen gegeben (Abb. 35b). Die Auszählung der blauen Kolonien ergab, dass mit 1  $\mu$ M nach ein- oder zweistündiger Inkubation fast 3 bzw. 8% der Kolonien teilweise oder ganz  $\beta$ -Galaktosidase-positiv waren. Eine Konzentration von 2  $\mu$ M für eine Stunde steigerte die Rekombinations-Effizienz auf 21 %. Bei doppelt so langer Inkubation sank der Anteil positiver Kolonien auf ca. 12 %. Unter letzterer Bedingung waren auch massive Protein-Präzipitate auf den Zellen zu beobachten, welche sich nachteilig auf das Wachstum der Zellen auswirkten.

Die Arbeiten an HTN<sup>Flpe</sup> wurden von Dipl.-Biol. Christoph Patsch im Arbeitskreis fortgeführt. Im Weiteren wurden u. a. gemeinsam die Transduktionsbedingungen von HTN<sup>Flpe</sup> in ES-Zellen optimiert, sodass Rekombinations-Effizienzen von ca. 50% erreicht werden konnten. In Zusammenarbeit mit Prof. Andreas Zimmer (Universität Bonn) konnten wir inzwischen zeigen, dass auch nach HTN<sup>Flpe</sup>-Transduktion und Rekombination die Keimbahn-Kompetenz von ES-Zellen erhalten bleibt (Patsch, Peitz et al., Manuskript in Vorbereitung). Folglich konnten wir anhand von HTN<sup>Flpe</sup> als weiterem transduzierbarem Protein zeigen, dass die Protein-Transduktion eine Methode ist, welche sich zur Manipulation von ES-Zellen eignet.



**Abb. 35: Rekombination mit HTNFpe in murine ES-Zellen**

**a)** Aufbau des Reporterkonstruktes: ein Transkriptionsstop ist FRT flankiert und verhindert die Transkription des LacZ-Gens. Nach Flp-vermittelter Rekombination wird die Stopkassette deletiert, und das LacZ-Gen gelangt unter die Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors (Daniela Kessler, unpublizierte ES-Zelllinie). **b)** Die Reporterzellen wurden fünf Stunden nach dem Aussäen in serumfreien PBS/DMEM eine oder zwei Stunden mit verschiedenen Konzentrationen HTNFpe behandelt, und mit X-Gal auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gefärbt. In den Diagrammen ist der Anteil ganz oder teilweise blau gefärbter Kolonien wieder gegeben. (n = 3); TK, Thymidin-Kinase; pA, poly-Adenylierungsstelle; Skalierung, 100  $\mu\text{m}$



## 4. Diskussion

### 4.1 Optimierung der Transduktions-Effizienz

In dieser Arbeit wurde zur Optimierung der Protein-Transduktion in ES-Zellen die Cre-Transduktion als Modellsystem verwendet. Dabei hat sich der Einsatz von Reporterzellen, insbesondere der CV1-5B-Fibroblasten als sehr nützlich erwiesen, da der mit X-Gal leicht nachweisbare Phänotyp sowohl qualitativ als auch quantitativ mit dem Genotyp der Zellen übereinstimmt. So konnte zum Beispiel der inhibitorische Einfluss von FKS auf die Transduktion gezeigt werden. Dieser Faktor ist von großer Relevanz, wenn man mit transduzierbaren Proteinen begrenzter Löslichkeit arbeitet, da sich in diesen Fällen die Protein-Konzentration zum Ausgleich der Inhibition nicht beliebig erhöhen lässt. Die Ursache der Inhibition durch Serum ist schwer zu identifizieren, da es sich bei FKS um ein sehr heterogenes Gemisch von Proteinen und niedermolekularen Substanzen handelt. Denkbar ist, dass wie HTNCre einige dieser Moleküle sehr basisch sind, und daher eine unspezifische Affinität zu den sauren Heparansulfat-Proteoglykanen der Zelloberfläche haben. Da die Bindung an diese Zelloberflächenmoleküle Voraussetzung für die Protein-Transduktion ist (Console et al., 2003; Tyagi et al., 2001), würde in diesem Fall eine kompetitive Hemmung der Protein-Transduktion vorliegen. Zu dieser Annahme passt der Befund, dass sich durch Konzentrationserhöhung der membranpermeablen Cre-Proteine die Inhibition der Internalisierung aufheben lässt und ihre Aktivität in den Zellen wieder nachweisbar wird.

Des Weiteren ist es möglich, dass Proteasen im FKS das transduzierbare Protein abbauen. Ergebnisse von Yu et al. (2003) und eigene Beobachtungen deuten darauf hin, dass durch den Einsatz des Protease-Inhibitors Leupeptin die inhibitorische Wirkung von FKS reduziert, aber nicht aufgehoben werden kann. Eine systematische Analyse dieser Befunde ist jedoch noch nicht durchgeführt worden. Durch die Überprüfung weiterer Protease-Inhibitoren ließe sich möglicherweise ein bestimmter Protease-Typ eingrenzen, bzw. die Inhibition weiter minimieren.

Es wurde weiter gezeigt, dass neben dem Medium auch der Aufbau der Transduktionsdomäne ein kritischer Faktor bei der Protein-Transduktion ist. So haben die zwei Proline, welche beim Wildtyp-Protein HIV-Tat der TAT-Domäne folgen, einen starken Einfluss auf die Transduktions-Effizienz. Da Prolin in vielen Proteinen als sogenannter „Helixbrecher“ wirkt, könnten zwei Proline eine veränderte Sekundärstruktur des Peptids verursachen. Diese Änderung könnte eine verbesserte Interaktion mit den transduktions-relevanten Strukturen auf

der Zelloberfläche bewirken und so den Transduktionsprozess effizienter machen. Denkbar ist auch, dass die Strukturänderung Interferenzen mit dem Fracht-Protein bzw. interagierenden Partnerproteinen minimiert.

Die Freisetzung der Proteine aus den pinosomalen Vesikeln ist offenbar bei der Protein-Transduktion ein limitierender Schritt. Über 99 % der Frachtproteine verbleibt in den Vesikeln und gelangt nicht ins Cytosol (Kaplan et al., 2005). Es wäre daher äußerst hilfreich, den Anteil des freigesetzten Proteins erhöhen zu können. Bei Versuchen mittels Ko-Transduktion des fusogenen Peptids dTAT-HA2 die Transduktions-Effizienz zu steigern, konnten unter nicht-sättigenden Bedingungen die Rekombinationsereignisse mit 10  $\mu$ M dTAT-HA2 um das 60fache angehoben werden. Bei dieser Konzentration reduziert sich allerdings deutlich die Zelldichte, was als Anzeichen für Zelltoxizität zu werten ist. Da das verwendete dTAT-HA2 entsprechend der Original-Publikation (Wadia et al., 2004) aus D-Aminosäuren aufgebaut ist, könnte möglicherweise ein verzögerter oder blockierter Abbau in den Zellen zur Toxizität beitragen. Ob ein, finanziell deutlich günstigeres, Peptid aus L-Aminosäuren weniger toxisch ist, werden Vergleiche zeigen müssen. Bei HTNFlpe konnte mit dem Peptid innerhalb des Arbeitskreises ebenfalls eine Verbesserung der Transduktion erzielt werden (Dipl.-Biol. Christoph Patsch, persönliche Mitteilung). Eine genaue Quantifizierung der Transduktionssteigerung steht zurzeit noch aus.

Dagegen konnte die Transduktions-Aktivität von Nanog-TAT mit dTAT-HA2 nur wenig verstärkt werden. Möglicherweise wurde durch die beobachtete Präzipitation die Konzentration löslichen Nanog-TAT-Proteins bzw. dTAT-HA2-Peptids so weit abgesenkt, dass dieser Verlust durch das Peptid nicht ausgeglichen werden konnte. Somit scheint die Anwendbarkeit des dTAT-HA2 Peptids gewissen Limitationen zu unterliegen und muss daher für jedes Protein individuell geprüft werden.

## **4.2 Protein-Transduktion in embryonale Stammzellen**

Die Proteintransduktion in murine ES-Zellen war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht hinreichend analysiert, daher schienen eingehende Untersuchungen notwendig zu sein, um eine optimale Nanog-Proteintransduktion in ES-Zellen zu gewährleisten zu können. Bei Vergleichen mit Fibroblasten fiel auf, dass bei der Transduktion von ES-Zellen mit HTNCre eine mindestens vierfach höhere Proteinkonzentration nötig ist, um vergleichbare Rekombinationseffizienzen zu erreichen. Dieses Phänomen kann damit erklärt werden, dass

ES-Zellen eine deutlich kleinere Zelloberfläche haben als Fibroblasten. Ein weiterer Grund könnte die unterschiedliche Ausstattung der Zellen mit Membranproteinen insbesondere der transduktions-relevanten Heparansulfat-Proteoglykane sein. So sind Heparansulfate in ES-Zellen ungewöhnlich gering sulfatiert (Johnson et al., 2007), was in einer geringeren Wechselwirkung mit den basischen Transduktions-Domänen resultieren könnte, sodass der initiale Schritt zur Internalisierung geschwächt wird.

Eine Gemeinsamkeit von Fibroblasten und ES-Zellen ist die Abhängigkeit der Transduktionseffizienz vom FKS-Gehalt. Bei der Standard-Konzentration von 15 % FKS muss bei ES-Zellen, im Vergleich zum serumfreien Medium, die Menge an HTNCRE um den Faktor 5 erhöht werden, um maximale Rekombinationsraten zu erzielen.

Mehrere Gruppen haben berichtet, dass Cre-Aktivität toxische Effekte induziert, wie Wachstums-Inhibition bei verschiedenen Fibroblastenlinien und HeLa Zellen (Pfeifer et al., 2001; de Alboran et al., 2001) und darüber hinaus chromosomale Aberrationen in primären Fibroblasten (Loonstra et al., 2001; Silver und Livingston, 2001). Bei den diesen Studien wurde die Cre-Aktivität über virale Transduktion oder über ein posttranslational kontrollierbares System (Loonstra et al., 2001) reguliert. In eigenen Untersuchungen wurde daher analysiert, ob ES-Zellen nach der Behandlung mit dem Cre-Protein normal weiter proliferieren. Selbst nach HTNCRE-Behandlungen, die zu höchsten Rekombinationseffizienzen führen, wiesen weder ES-Zellen noch COS-7 oder CV1-5B-Zellen eine veränderte Wachstumsdynamik auf. Eine Analyse der Stabilität von Cre in Zellen zeigte, dass nach Beendigung der Protein-Inkubation binnen weniger Stunden der überwiegende Teil des Cre-Proteins abgebaut wurde oder sich durch Zellteilung verdünnt hat.

Aufgrund der oben erwähnten Berichte zur Genotoxizität stellt sich die Frage, ob eine HTNCRE-Behandlung, die in einer fast vollständigen Rekombination loxP-modifizierter Allele resultiert, nicht zu chromosomalen Schäden und dem Verlust der Keimbahnfähigkeit von ES-Zellen führt. Die Analyse von ES-Zell-Metaphasen zeigte, dass durch die HTNCRE-Inkubation der Karyotyp der Zellen nicht verändert wurde. Kleinere chromosomale Veränderungen, wie z. B. Translokationen oder Verkürzungen, konnten selbst mit der aufwendigen multi-FISH-Analyse nicht beobachtet werden. In einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hubert Schorle (Pathologie, Universität Bonn) konnte schließlich gezeigt werden, dass Zellen, die mit hohen Konzentrationen HTNCRE behandelt wurden, weiterhin keimbahngängig bleiben (Peitz et al., 2007). Eine hohe Rekombinations-Effizienz unter Erhalt der Keimbahnkompetenz ist bei der Manipulation von ES-Zellen von großem Vorteil. So kann z. B. nach homologer Rekombination eines Transgens die Selektionskassette entfernt

werden, und die einzelnen Klone können ohne weitere Analyse in die Blastozyste injiziert werden. Als weitere interessante Anwendungsgebiete für die Cre-Transduktion und die Rekombinasen-Transduktion allgemein bieten sich der Rekombinase-vermittelte Kassetten-Austausch (*recombinase mediated cassette exchange, RMCE*) oder die vollständige Entfernung loxP-flankierter Transgene bzw. Vireng Genome aus infizierten Zellen an (Sarkar et al., 2007).

Als Ergänzung zu den Möglichkeiten der Cre-Transduktion, wurde auch die Flpe Rekombinase als transduzierbares Protein etabliert. Dieses Protein ist für die Maus-Genetik ebenfalls von großem Interesse, da sich mit ihm die Selektions- bzw. Manipulationsmöglichkeiten an ES-Zellen erweitert lassen. Wenn auch die biochemischen Eigenschaften des Proteins bezüglich der Löslichkeit und der Stabilität etwas ungünstiger als bei HTNCre sind, so lassen sich auch mit diesem Protein ES-Zellen erfolgreich manipulieren. Nach einer weiteren Optimierung der Transduktionsbedingungen konnte im Arbeitskreis die Rekombinations-Effizienz weiter auf ca. 50% gesteigert werden. Zudem wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Andreas Zimmer (Universität Bonn) gezeigt, dass ES-Zellen auch nach Transduktion von HTNFlpe weiterhin keimbahnfähig bleiben (Patsch, Peitz et al., Manuskript in Vorbereitung).

Die bisher diskutierten Experimente zeigen, dass bei der Protein-Transduktion mit entsprechender Protein-Konzentration und geeignetem Medium die transduzierbaren Proteine in den überwiegenden Anteil einer ES-Zell-Population eindringen können. Darüber hinaus lässt sich die Aktivität des jeweiligen Proteins zeitlich sehr gut kontrollieren. Somit stellt die Protein-Transduktion eine Alternative zu den klassischen Gen-Transfermethoden dar, um biologische Aktivitäten in ES-Zellen einzubringen.

### **4.3 Herstellung eines transduzierbaren Nanog-Proteins**

Das initial klonierte TAT-Nanog-Konstrukt leitet sich im Aufbau her von HTNCre und HTNFlpe ab. Anders als bei den beiden Rekombinasen, fielen in der biochemischen Analyse Kontaminationen auf, die überwiegend kleiner als das Gesamtprotein waren. Anhand der Western-Blot-Analysen wurde deutlich, dass es sich um Proteine handelt, die sowohl von einem anti-Nanog-Antikörper als auch von dem anti-pentaHis-Antikörper erkannt werden. Vermutlich wurden bei der Affinitätschromatographie unvollständig synthetisierte Proteine mit angereichert, die auf vorzeitige Translationsabbrüche zurückzuführen sind. Die Abbrüche

---

können durch seltene Codons verursacht werden, für die es in *E. coli* keine oder nur wenige tRNAs gibt (Misra und Reeves, 1985). So befindet sich z. B. AGG, eines der seltensten Codons von *E. Coli* (Chen und Inouye, 1994), dreimal in der Wildyp-Sequenz von Nanog. Des Weiteren sind auch proteolytische Prozesse als Ursache verkürzter Proteine denkbar, die Zugabe von Protease-Inhibitoren während der Aufreinigung brachte allerdings keine Verbesserung. Da auf den H6-*tag* die TAT-Domäne folgt, liegt ein Gemisch von vermutlich inaktiven, aber potentiell transduzierbaren Proteinen vor. Die trunkierten Proteine liegen zudem in der Überzahl vor, daher besteht beim Einsatz dieses Gemisches die Gefahr, dass überwiegend inaktive bzw. unvollständige Proteine in die Zellen transduzieren. Die Abbruchfragmente könnten auf die biologische Wirkung des vollständigen Proteins sogar negativ wirken. Der biologische Effekt des Vollelänge-Proteins würde so maskiert. Daher wurden alternative Konstrukte geschaffen, welche den H6-*tag* am C-Terminus tragen, um auszuschließen, dass unvollständig translatierte Proteine mit angereichert werden. Zusätzlich wurden die Positionen der Transduktionsdomänen und des NLS variiert und der Einfluss dieser Änderungen auf die Exprimierbarkeit und Löslichkeit der Proteine bewertet. Selbst geringe Variationen zeigten einen starken Einfluss auf die Eigenschaften der Proteine. Unter den getesteten Versionen hatte das Konstrukt NLS-Nanog-TAT-H6 (kurz „Nanog-TAT“) die günstigsten Eigenschaften in Bezug auf Reinheit und Ausbeute. Wie bei den meisten anderen Varianten lag allerdings auch hier der überwiegende Teil des synthetisierten Proteins als unlösliche Aggregate (*inclusion bodies*) in den Bakterien vor. Weitere Ansätze zur Erhöhung des Anteils löslichen Proteins in unserer Arbeitsgruppe, wie das Ändern der Expressionstemperatur und Testen verschiedener Expressionsstämme, führten zu keiner Verbesserung. Ferner ließ sich mit denaturierender Aufreinigung die Reinheit von Nanog-TAT deutlich erhöhen. Doch in seiner hochreinen Form ist das Protein in zellverträglichen Puffern nicht löslich (Dipl.-Biol. Bernhard Müntz, Diplomarbeit) und für Versuche mit Zellen nicht verwendbar. Somit stabilisieren vermutlich die in der Standard-Eluatfraktion zu findenden Verunreinigungen Nanog-TAT und ermöglichen auf diese Weise den Einsatz des Proteins in der Zellkultur. Sollte es gelingen, die Stabilisatoren zu identifizieren, ließen sie sich womöglich gezielt zur Stabilisierung schlecht löslicher Proteine einsetzen.

In der Literatur gibt es viele Beispiele, in denen durch systematisches Testen verschiedener Fusionspartner wie MBP, GST oder NusA zuvor schwer lösliche Proteine sehr gut in Lösung gebracht und unlösliche Aggregate stark reduziert wurden (Braun et al., 2002, Hammarström et al., 2002; Woestenenk et al., 2003.). Allerdings konnte im Fall von Nanog bei den Fusionen meist leider keine gute Expression der Fusionskonstrukte erzielt werden. Der Befund, dass bei

nahezu allen Protein nur der Fusionspartner, aber nicht das darauf folgende Nanog-Protein hergestellt wird, kann zur Annahme verleiten, dass durch Fehler in den Expressionskonstrukten das Protein nicht vollständig translatiert werden kann. Gegen diese Vermutung spricht, dass sämtliche Konstrukte sequenziert wurden und im Western-Blot für alle Varianten mit einer Ausnahme (NusA+) geringe Mengen an vollsynthetisierten Konstrukten nachweisbar waren. So muss es einen anderen Grund für den Mangel an Vollelänge-Proteinen geben. Es ist unwahrscheinlich, dass seltene Kodons im Nanog-Partner häufig zu Translationsabbrüchen führen, da in denselben Bakterien Nanog-TAT sehr gut exprimiert wird. Ein denkbare Szenario wäre, dass viele der Fusionspartner tatsächlich die Löslichkeit von Nanog in den Zellen erhöhen, und dass es aufgrund toxischer Effekte des Fusionsproteins in *E.coli* zu einer Selektion gegen lösliche Konstrukte mit vollständiger Länge kommt. Interessanterweise wird nämlich das Fusionsprotein mit „Trx+“ in großen Mengen als Vollelänge-Protein gebildet, doch liegt es in unlöslichen Aggregaten vor und lässt sich unter nativen Bedingungen nicht aufreinigen.

Die Variante Nanog-TAT stellt zurzeit das Optimum in Bezug auf Reinheit und Löslichkeit dar. Bei 4°C liegt die maximale Löslichkeit bei ca. 500 nM und sinkt bei einer Temperatur von 37°C auf ca. 100 nM ab. Konzentrationen dieser Größenordnung sind bei anderen transduzierbaren Proteinen zur Induktion spezifischer biologischer Effekte ausreichend gewesen (Nagahara et al., 1998, Asoh et al., 2002; Kroschl et al., 2003). Darüber hinaus deutet die Fähigkeit, bei einem EMSA an die Nanog-Bindesequenz binden zu können, an, dass Nanog-TAT in einer nativen Faltung vorliegt. Somit wurde dieses Konstrukt für die weitere Charakterisierung eines transduzierbaren Nanog-Proteins ausgewählt.

Um Nanog-TAT in großem Maßstab in der Zellkultur einsetzen zu können, wäre eine weitere Erhöhung der Löslichkeit bzw. der Protein-Ausbeute hilfreich. So sind zurzeit für 80 ml Nanog-TAT-Medium, mit einer Konzentration von ca. 100 nM, zehn Liter bakterielle Expressionskultur notwendig. Ein alternativer Aufbau des Nanog-Proteins könnte hierbei zum Erfolg führen. So zeigte ein Fusionsprotein aus dem N-terminalen Teil von Nanog und der viralen Transaktivierungsdomäne VP16 (Sadowski et al., 1988) in NIH3T3 Zellen eine stärkere Transaktivierung des pluripotenz-assoziierten Gens Rex-1 als Wildtyp-Nanog (Shi et al., 2006). Solch eine Nanog-Variante wäre eine interessante Alternative zu den bisher getesteten Proteinen, da ein grundlegend verändertes Konstrukt eine verbesserte Löslichkeit in Bakterien aufweisen könnte, welches vielleicht auch weniger toxisch ist. Darüber hinaus ließe sich möglicherweise der Anteil löslichen Proteins mit alternativen Expressionssystemen, wie Hefezellen oder Baculo-Virus-infizierten Insektenzellen (Sf9- bzw. Sf21) erhöhen.

#### 4.4 Optimierung des ES-Zellmediums für die Nanog-Transduktion

Mit Hilfe der transduzierbaren Cre-Rekombinase konnte der Einfluss von FKS auf die Transduktionseffizienz gezeigt werden. Da klassisches ES-Medium 15 % FKS enthält, wurde versucht, den Serum-Gehalt auf ein Minimum zu senken, um maximale Nanog-Transduktionseffekte zu erreichen. Dazu wurde eine spezielle DMEM-Variante (Advanced DMEM, Invitrogen) verwendet, die bereits mit ITS (Insulin, Transferrin und Selenit) supplementiert ist. Mit diesem Medium reichten bereits 5 % FKS aus, um die Bildung Alkalische-Phosphatase-positiver Kolonien, zumindest auf dem Niveau von herkömmlichem ES-Medium, aufrechtzuerhalten. Vermutlich sorgt die Supplementierung mit ITS für den geringeren FKS-Bedarf, da diese Komponenten ansonsten über das Serum zugeführt werden müssten. So macht sich der Mangel weiterer, für die ES-Zellkultur wichtiger Faktoren, erst bei niedrigeren Serumkonzentrationen durch Differenzierungsprozesse bemerkbar. Auch bei längeren Kulturphasen in dem serumreduzierten Advanced DMEM ES-Zellmedium war keine erhöhte spontane Differenzierung der ES-Zellen feststellbar. Unter Nutzung des Transduktions-Systems mit HTNCre und den CV1-5B Reporterfibroblasten wurde der Effekt der Serumreduktion auf die Protein-Transduktion getestet. Im serumreduzierten ES-Zellmedium war die Inhibition auf die Protein-Transduktion im Vergleich zum herkömmlichen ES-Zellmedium ca. um den Faktor 3 reduziert. Somit wurde ein Medium etabliert, welches die Bedürfnisse von ES-Zellen und die Anforderungen der Protein-Transduktion ausbalanciert. In Anlehnung an den Namen des Basalmediums wird dieses Medium als „Advanced ES-Medium“ bezeichnet.

Eine weitere Herausforderung war die limitierte Löslichkeit des Proteins, da es im normalen ES-Medium und Advanced ES-Medium bei 37°C stark zur Bildung von Aggregaten neigt. Eine genauere Untersuchung der Kinetik zeigte, dass nach den ersten 1 bis 2 Stunden Inkubation die Präzipitation nicht fortschreitet und sich eine maximale Löslichkeit des Proteins von ca. 100 nM einstellt. Diese Konzentration reduziert sich nach weiteren ein oder zwei Tagen bei 37°C dann nur noch in geringem Maße. In Anwesenheit von Fibroblasten reduziert sich die Konzentration des Proteins stärker, was an Proteasen im Medium liegen kann oder an einer Proteinaufnahme durch die Zellen. Die Untersuchung von Kernextrakten behandelter Fibroblasten konnte tatsächlich zeigen, dass Fibroblasten Nanog-TAT in den Zellkern aufgenommen haben.

Wie oben beschrieben wurde versucht, den FKS-Gehalt möglichst weit abzusenken, um das Medium für die Protein-Transduktion zu optimieren. Vor kurzem wurde sogar ein völlig

serumfreies, aus definierten Komponenten bestehendes ES-Zellmedium publiziert (Ying et al., 2003), welches für die Protein-Transduktion als besonders attraktiv erschien. Löslichkeitstests zeigten allerdings, dass dieses Medium ungeeignet für die Nanog Protein-Transduktion ist, da sich darin die Präzipitation von Nanog-TAT nicht nur verstärkte, sondern sich auch nach zwei Stunden bei 37°C nicht stabilisierte. Unter Umständen sind Bestandteile des FKS für eine Stabilisierung von Nanog-TAT essentiell. Somit ist zur Nanog-Transduktion das serumreduzierte Advanced ES-Medium bislang am besten geeignet.

#### **4.5 Veränderte Morphologie und Proliferation von ES-Zellen durch Nanog-TAT**

Um die zelluläre Funktion von Nanog zu charakterisieren, wurde Nanog-TAT zu ES-Zellen gegeben. Dazu wurden initiale Versuche mit murinen Wildtyp-ES-Zellen (C57BL/6) durchgeführt. C57BL/6 Zellen werden in der Regel erfolgreich auf MEF-Zellen kultiviert. Wenn diese ES-Zellen aber auf Gelatine-beschichteten Kulturschalen gehalten werden, bilden sie einen großen Anteil spontan differenzierender Kolonien aus. Nach wenigen Tagen der Inkubation mit Nanog-TAT konnten bereits deutliche Unterschiede zu den Kontrollzellen festgestellt werden. Die Differenzierungsneigung von C57BL/6 konnte bei der Kombination von LIF und Nanog-TAT nahezu vollständig aufgehoben werden. In der Abwesenheit von LIF induzierte Nanog-TAT den Erhalt undifferenzierter ES-Zellkolonien, und unterdrückte die Ausbildung von primitiven endodermartigen Zellen, wie sie meist bei LIF-Entzug aus ES-Zellen entstehen. Diese Beobachtung stimmt überein mit publizierten Daten zur genetischen Nanog-Überexpression von anderen Gruppen (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003) und mit Erfahrungen unserer eigenen Arbeitsgruppe (Dipl.-Biol. Dirk Winnemöller, persönliche Mitteilung). Auf die Unterdrückung der endodermalen Differenzierung durch Nanog-TAT wird später in der Diskussion näher eingegangen. Die Inhibition von Differenzierungsprozessen konnte, neben der Morphologie, auch anhand der Aktivität des ES-Zellmarkers Alkalische Phosphatase bestätigt werden.

In Anwesenheit von Nanog-TAT und LIF wird durch die kooperative Steigerung der Differenzierungsinhibition eine synergistische Wirkung beider Faktoren deutlich. Es ließ sich nahezu keine andifferenzierte Kolonie in der gesamten Kulturschale finden. Dass es sich nicht nur um ein morphologisches Phänomen handelt zeigt die Tatsache, dass die Ko-Inkubation von LIF und Nanog-TAT zu einer verstärkten Proliferation führt. Diese Beobachtung wurde



auch von Mitsui et al. (2003) bei einer transgenen Nanog-Überexpression in Anwesenheit von LIF gemacht. Darüber hinaus war die Klonogenität LIF+Nanog-TAT-behandelter ES-Zellen signifikant erhöht, d. h. der Anteil an Zellen mit Selbsterneuerungspotential ist durch die Behandlung beider Faktoren angestiegen. Möglicherweise wurde das Selbsterneuerungspotential durch eine erhöhte Vitalität der ES-Zellen gesteigert. Diese Annahme wird durch die Befunde der durchflusszytometrischen Analyse von Oct4-GiP ES-Zellen gestärkt. Hier wiesen LIF+Nanog-TAT-behandelte Kulturen einen durchweg höheren Anteil lebender GFP-positiver Zellen auf, als unbehandelte Kontrollen. Ob die Anzahl pluripotenter Zellen in den ko-inkubierten Kulturen tatsächlich erhöht ist, kann man vermutlich nur durch Blastozysten-Injektionen von ES-Zellen klären, die für mehrere Passagen in An- oder Abwesenheit von Nanog-TAT kultiviert wurden. Anhand der Chimärenqualität und/oder der Keimbahngängigkeit der Tiere sollten sich Unterschiede in der Pluripotenz der injizierten Zellen widerspiegeln lassen.

Werden die Zellen in klonaler Dichte ( $60 \text{ Zellen/cm}^2$ ) in Nanog-TAT-Medium ausgesät, bleibt die synergistische Wirkung von LIF und Nanog-TAT bestehen, doch bei LIF-Entzug ist der Pluripotenzerhalt, gemessen an der Morphologie und der Aktivität der Alkalischen Phosphatase, abgeschwächt. Völlig undifferenzierte Kolonien sind nach 5-tägiger Inkubation nicht mehr nachweisbar, lediglich der Anteil gemischter Kolonien ist bei der höchsten Nanog-TAT-Konzentration erhöht. Da aufgrund der Vorversuche eine basale LIF-Aktivität durch Einsatz des Inhibitors hLIF-05 auszuschließen ist, scheinen andere para- oder autokrine Stimulatoren bei höherer Zelldichte den Effekt von Nanog-TAT zu unterstützen. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre ESRF (*ES cell renewal factor*; Dani et al. 1998), ein bislang nicht näher identifizierter Faktor, der von differenzierenden ES-Zellen sekretiert wird. Es wurde berichtet, dass sich in mit diesem Faktor konditioniertem Medium selbst LIF-Rezeptor-defiziente ES-Zellen klonal expandieren lassen (Dani et al., 1998).

Mit einer weiteren ES-Zelllinie (Oct4-GiP; Ying et al., 2002) konnten Änderungen des ES-Zellstatus alternativ verfolgt werden, da in diese Zellen ein transgenes Oct4-Reporterkonstrukt integriert ist. Die Zellen wurden in höherer Zelldichte kultiviert ( $5000 \text{ Zellen/cm}^2$ ) und nach 3 bis 4 Passagen waren die Kontrollzellen ohne LIF vollständig differenziert. Auch in Gegenwart einer Deletionsmutante (Nanog $\Delta$ HD) ohne TAT und Homeodomäne (Dipl.-Biol. Bernhard Münst, Diplomarbeit) konnten die Zellen nicht weiter proliferieren. Nur die Zugabe von Nanog-TAT induzierte die Bildung von kleinen, einschichtigen Kolonien. Anhand der Durchflusszytometrie-Daten wird ersichtlich, dass sich nach einigen Passagen eine Population GFP-positiver Zellen durchsetzt. Es ist denkbar, dass

---

nur ein kleiner Anteil der ES-Zellen in der Ausgangspopulation in der Lage ist, auf Nanog-TAT zu reagieren bzw. genügend Protein für einen biologischen Effekt aufnehmen zu können. Dadurch könnten diese Zellen in Abwesenheit von LIF einen Wachstumsvorteil erfahren, sodass sich eine proliferierende Population durchsetzt. Die Proliferation von Nanog-TAT-behandelten ES-Zellen in Abwesenheit von LIF scheint ein allgemein gültiges Phänomen zu sein, da es anhand von drei ES-Zelllinien mit jeweils unterschiedlichen genetischen Hintergründen gezeigt werden konnte.

#### **4.6 LIF-unabhängiger Erhalt der Pluripotenz**

ES-Zellen besitzen das Potential in sämtliche Gewebe bzw. Zelltypen des Organismus zu differenzieren. Es wurden verschiedene Tests durchgeführt um herauszufinden, inwieweit Nanog-TAT bei ES-Zellen das Entwicklungspotential während eines LIF-Entzugs aufrechterhalten kann, bei dem die Kontrollzellen differenziert sind. Ein erster Hinweis auf Pluripotenz ist die Ausprägung von ES-Zell-spezifischen Markern wie Oct4, SSEA-1 und Alkalischer Phosphatase, die auch bei den Nanog-TAT-behandelten LIF-entzogenen ES-Zellen nachweisbar waren.

Die Bildung von Embryoidkörperchen (EBs) aus aggregierten ES-Zellen ist ein relativ einfaches in-vitro-Modell zur Rekapitulation der initialen Differenzierungsprozesse in der Embryonalentwicklung. Auch die LIF-entzogenen, mit Nanog-TAT kultivierten Oct4-GiP ES-Zellen ließen sich zur EB-Bildung anregen und bildeten innerhalb von zwei Wochen Gewebe der drei Keimblättern, ohne zuvor wieder mit LIF in Kontakt gekommen zu sein. Zur Bildung von Teratomen wurden die LIF-entzogenen ES-Zellen zuvor wieder in LIF-haltigem Medium expandiert. Auch in den Teratomen konnten Gewebe aller drei Keimblätter gefunden werden, was als weiteres Indiz für den Erhalt der Pluripotenz zu bewerten ist.

Die Blastozysten-Injektion von Nanog-TAT-inkubierten Oct4-GiP Zellen führte zwar zu chimären Tieren, doch war der Grad des Chimärismus sehr gering. Dies zeigte sich schon in der nur schwach veränderten Fellfarbe der Tiere. Oct4-GiP-abgeleitete Zellen waren zwar in Organen aller drei Keimblätter über PCR nachweisbar, unter anderem auch in den Hoden, doch konnte bei den Verpaarungen der fertilen Chimären mit C57BL/6 Mäusen keine Keimbahntransmission nachgewiesen werden. Eine routinemäßig arbeitende Injektionsabteilung würde vermutlich eine systematischere Pluripotenz-Analyse mittels Blastozysten-Injektionen ermöglichen.

---

In einem ähnlichen Experiment wurden von Chambers et al. (2003) Nanog-überexprimierende ES-Zellen für zwei Passagen bei klonaler Dichte ohne LIF kultiviert und anschließend mit LIF expandiert. Das Transgen wurde über Cre-Rekombination entfernt und die resultierenden Klone sind in Blastozysten injiziert worden. Der Nachwuchs zeigte einen hohen Anteil an Fellfarben-Chimärismus, doch konnte auch hier keine Keimbahngängigkeit der Zellen gezeigt werden. Der Nachweis ist bis heute nicht erbracht worden, ob Nanog ohne LIF-Unterstützung die Pluripotenz soweit aufrechterhält, dass die Zellen auch noch in die Keimbahn eintreten können.

Der geringe Beitrag der Oct4-GiP ES-Zellen zum Chimärismus kann verschiedene Gründe haben. Zum einen kann es sein, dass die Zellen zu lange ohne LIF mit Nanog-TAT kultiviert wurden. So betrug bei Chambers et al. (2003) die Zeit, in der Nanog allein die Selbsterneuerung der ES-Zellen aufrechterhielt, acht bis neun Tage (zwei Passagen). Bei der vorliegenden Arbeit hingegen konnte das Experiment über 30 Tage (acht Passagen) fortgeführt werden und wurde dann zum Zweck der Analyse abgebrochen. Zum anderen ist denkbar, dass die Zellen per se eine eingeschränkte Pluripotenz besitzen. Dagegen spricht, dass die Zellen im Arbeitskreis von Prof. Austin Smith (Universität Cambridge), der diese Zellen freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat, bereits Keimbahntransmission gezeigt haben (Dr. Jennifer Nichols, persönliche Mitteilung). Da diesbezüglich aber keine eigenen Erfahrungen mit dieser Zelllinie vorliegen, muss in weiteren Analysen die Keimbahnfähigkeit der aus dem Smith-Labor erhaltenen Zellen geklärt werden. Im Zuge dessen gilt es auch den Karyotyp vor und nach Nanog-Transduktion zu prüfen.

Zur weiteren Klärung der Fragestellung zum Pluripotenzerhalt und der Keimbahngängigkeit sollten idealerweise keimbahnfähige ES-Zellen verwendet werden, die konstitutiv GFP exprimieren und die für einen kürzeren Zeitraum (wie bei Chambers et al., 2003) unter LIF-Entzug mit Nanog-TAT inkubiert werden. Falls auch auf diesem Weg keine Keimbahntransmission erreichbar sein sollte, ließe sich zumindest der Beitrag der Zellen zu früheren Embryonalstadien einfacher untersuchen, bzw. es ließe sich feststellen, ob die Zellen bestimmte Organe oder Gewebetypen bevorzugt ausbilden.

Insbesondere bei diesen Untersuchungen, bei denen nur ein transienter *gain-of-function*-Effekt erwünscht ist, wird der Vorteil der Protein-Transduktion klar, da man das Protein den Zellen ganz einfach wieder entziehen kann, ohne aufwendig genetische Information aus den Zellen entfernen zu müssen.

#### **4.7 Nanog-TAT-vermittelte Inhibition endodermaler Differenzierung unabhängig vom JAK/Stat3 Signalweg**

Die Analyse der molekularen Mechanismen des Pluripotenzerhalts zeigte, dass in Anwesenheit eines JAK-Inhibitors Nanog-TAT die Bildung undifferenzierter Kolonien induzieren kann. Ferner demonstrierte die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von Stat3, dass weder Nanog-TAT noch potentiell ko-purifizierte bakterielle Faktoren Stat3 aktivieren. Somit wirkt Nanog-TAT auf einem alternativen Weg zum LIF/JAK/Stat3 Signalweg der Differenzierung von ES-Zellen entgegen. Diese über Protein-Transduktion gewonnenen Daten stimmen mit Ergebnissen von Chambers et al. (2003) überein, die zeigen, dass durch genetische Nanog-Überexpression Stat3 nicht aktiviert wird, und dass die Wirkung von Nanog unabhängig von der JAK-Aktivität ist.

Bei einem der ersten Differenzierungsprozesse in der Mausentwicklung bildet sich beim Übergang von der frühen zur späten Blastozyste, vermittelt durch GATA6, das primitive Endoderm. Diese Differenzierung wird bei einer Nanog-Überexpression durch direkte oder indirekte Inhibition von GATA6 blockiert (Übersicht bei: Niwa 2007). Mit transduzierbarem Nanog-TAT wurde versucht, diesem Befund nachzugehen. Dazu wurden aggregierte ES-Zellen als Modell zur Rekapitulation der frühembryonalen Präimplantations-Phase verwendet. Die Nanog-TAT-behandelten ES-Zell-Aggregate hatten zumeist eine homogenere Morphologie, als unbehandelte Kontrollzellen. Im Inneren der meisten Kontrollaggregate bildete sich im Gegensatz dazu bereits innerhalb von 4 Tagen eine Zyste, was auf einen beginnenden Differenzierungsprozess schließen lässt. Auch auf der Transkriptionsebene wurde deutlich, dass die endodermalen Marker GATA6 und TTR in Nanog-TAT-behandelten Aggregaten schwächer exprimiert wurden, als in den Kontrollen.

Diese Resultate stimmen mit einer im Lauf dieser Arbeit erschienenen Publikation überein, welche die Aktivität von Nanog in aggregierten ES-Zellen beschreibt (Hamazaki et al., 2004). Eine vollständige Blockierung der endodermalen Differenzierung wie bei Hamazaki et al. (2004) beschrieben, konnte bei den eigenen Experimenten nicht gefunden werden. Eine wahrscheinliche Erklärungsmöglichkeit ist, dass Nanog-TAT nur in die äußeren Zellen der Aggregate gelangt und dort womöglich die GATA6-Expression verhindert, während weiter innen gelegene Zellen Differenzierungsprozesse starten können. So zeigen Experimente unserer Arbeitsgruppe zur Cre-Transduktion an mehrschichtigen ES-Zellkolonien, dass die Transduktionseffizienz mit der Größe der Kolonien abnimmt (Dr. Thomas Wunderlich, Dissertation 2004, Universität zu Köln). Die durch Southern-Blot ermittelte Effizienz sinkt

---

von anfänglich über 95 % rekombinierter Allele bei Zugabe des Proteins zu frisch vereinzelt ES-Zellen auf 50 % bei 3 Tage alten Kolonien. Mit einem GFP-Reporter ließ sich der Rückgang der Rekombinationsereignisse bestätigen, und dabei zeigte sich, dass die GFP-positiven Zellen vermehrt am Rand der Kolonien zu finden sind.

Ein weiterer interessanter Befund an den Aggregaten ist die kooperative Aktivität von Nanog-TAT und LIF. So ist in Anwesenheit beider Faktoren die Expression der Pluripotenzmarker am stärksten. Mit einer Dauerkultur unter diesen Bedingungen wird man klären können, ob es möglich ist, ES-Zellen dauerhaft undifferenziert in Suspensionskultur zu halten. Die Tatsache, dass bei LIF-stimulierten Aggregaten die Nanog-Expression nur in der äußeren Zellschicht runterreguliert wird, im Inneren der Aggregate aber Aufrecht erhalten bleibt (Hamazaki et al., 2004), ist eine günstige Voraussetzung für diesen Versuchsansatz. Die äußere Schicht sollte für das transduzierbare Nanog-Protein gut zu erreichen sein, sodass hier der Mangel an Nanog ausgeglichen werden könnte.

#### **4.8 Nanog-Transduktion in humane ES-Zellen**

Über die Funktion von Nanog in humanen ES-Zellen ist wenig bekannt. Wird Nanog-Aktivität durch ein RNAi-Experiment verringert (*knock-down*), differenzieren humane Stammzellen sowohl in eine endodermale als auch in eine trophektodermale Richtung (Hyslop et al., 2005). Die in dieser Arbeit an humanen ES-Zellen durchgeführten *gain-of-function*-Experimente mit Nanog-TAT legen eine pluripotenz-erhaltende Aktivität von murinem Nanog in humanen ES-Zellen nahe, denn mit dem rekombinanten Protein konnte für eine transiente Phase der pluripotente Charakter humaner ES-Zellen bewahrt werden. Die Aktivität des Proteins scheint reduziert zu sein, da die humanen ES-Zellen in dem Medium kaum proliferieren und nur sehr kleine Kolonien ausbilden. Des Weiteren sind bislang auch keine Dauerkulturen von humanen ES-Zellen in Nanog-TAT-haltigem Medium gelungen. Bei der genetischen Überexpression von humanem Nanog konnten dagegen humane ES-Zellen MEF-frei in unkonditioniertem Medium über viele Passagen kultiviert werden unter Erhalt der Pluripotenz (Darr et al., 2006). Allerdings konnte auch Nanog-TAT über einen begrenzten Zeitraum von 7 Tagen bei einem Teil der Zellen pluripotente Eigenschaften erhalten, wie die positiven Marker-Färbungen und die gebildeten Teratome zeigen. Ob humane ES-Zellen tatsächlich das gleiche Entwicklungspotential wie murine ES-Zellen haben, muss im Lichte kürzlich etablierter muriner Epiblasten-Stammzellen kritisch diskutiert werden, da diese

Zellen eine morphologische und funktionelle Ähnlichkeit zu humanen ES-Zellen aufweisen, ihr Entwicklungspotential nach Injektion in Blastozysten jedoch stark reduziert ist (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Die Frage nach der Pluripotenz humaner ES-Zellen wird man allerdings nicht abschließend beantworten können, da eine Blastozysten-Injektion humaner ES-Zellen als finaler Pluripotenznachweis aus ethischen und gesetzlichen Gründen ausgeschlossen ist.

Die geringe Homologie zwischen humanem und murinem Nanog-Protein von nur 58 % (im Bereich der Homeodomäne: 87 %) ist eine mögliche Erklärung für die schwache Aktivität von Nanog-TAT in humanen ES-Zellen. Chambers et al. (2003) konnten zeigen, dass humanes Nanog in murinen ES-Zellen zwar funktionell ist, jedoch mit ca. 30fach schwächerer Aktivität. Die Überexpression von humanem Nanog in murinen ES-Zellen konnte nur ca. 2,5 % LIF-unabhängige Kolonien induzieren, mit murinem Nanog dagegen ca. 80 %. Daten über Langzeitkulturen mit humanem Nanog in murinen Zellen sind bislang nicht publiziert geworden. Die Verwendung von einem transduzierbaren humanen Nanog könnte helfen, den Aktivitätsunterschied der beiden orthologen Proteine klären.

## 4.9 Ausblick

Eine Verbesserung der Pluripotenz von ES-Zell-Kulturen, insbesondere problematischer Inzuchtlinien wie C57BL/6, wäre eine mögliche Anwendung des in dieser Arbeit etablierten Nanog-Protein-Transduktionssystems. Darüber hinaus könnte getestet werden, ob die Etablierung einer Suspensionskultur mit ES-Zellen machbar wäre.

Bei vielen Säugetierspezies ist es zurzeit nicht möglich, ES-Zellen in Kultur zu nehmen. Mit einem transduzierbaren Nanog-Protein kann vielleicht die Etablierung solcher ES-Zellen gefördert werden. Erste Schritte hierzu wurden zusammen mit Prof. Pierre Savatier (Universität Lyon) unternommen, und vorläufige Experimente deuten auf eine Funktionalität von Nanog-TAT an Zellen der inneren Zellmasse von Kaninchen-Blastozysten hin.

Darüber hinaus ließen sich möglicherweise auch funktionelle Interaktionen in Pluripotenz-Netzwerken analysieren, indem man bestimmte Kandidatengene ausgeschaltet und versucht, mit Nanog-TAT den Verlust zu kompensieren. Ein analoges Beispiel wäre die Kompensation von Sox2-Verlust durch Oct4-Expression (Masui et al., 2007).

Ein transduzierbarer Pluripotenzfaktor bietet den Vorteil, dass man auch an somatischen Zellen sehr einfach seine Funktionalität untersuchen kann. Es ist nicht nötig transgene Linien

---

zu etablieren, was bei primären Zellen aufgrund von Seneszenz-Erscheinungen besonders problematisch ist. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Nanog-TAT in NIH3T3 und primären Fibroblasten einen proliferationsfördernden bzw. transformierenden Effekt hat (Peitz et al., unter Begutachtung).

Kürzlich wurde gezeigt, dass Nanog bei der Fusion von ES-Zellen mit somatischen Zellen den Transfer von Pluripotenz auf den somatischen Fusionspartner fördert (Silva et al., 2006). Auch bei solchen Reprogrammierungs-Experimenten wäre der Einsatz eines transduzierbaren Nanog-Proteins denkbar. In diesem Zusammenhang eröffnet ein aktueller Ansatz zur Induktion von Pluripotenz in primären Zellen mit den vier Faktoren Oct4, Sox2, c-myc und Klf4 (Takahashi & Yamanaka, 2006; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007; Maherali et al., 2007) weitere Anwendungsmöglichkeiten. Es wäre interessant herauszufinden, ob Nanog-TAT die Effizienz der Pluripotenz-Induktion steigern kann. Mit den transduzierbaren Rekombinasen HTNCre bzw. HTNFlpe ließen sich zudem möglicherweise die zur Reprogrammierung verwendeten viralen Vektoren bzw. die Kassetten zur Pluripotenz-selektion entfernen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten dazu ermutigen, die Protein-Transduktion analog auf die vier oben genannten Faktoren anzuwenden. Ein, wenn auch ambitioniertes, Ziel wäre die Etablierung eines Pluripotenz-induzierenden Mediums mit transduzierbaren Reprogrammierungsfaktoren.

## 5 Zusammenfassung

Das Homeobox-Protein Nanog ist eine Schlüssel-Determinante zur Selbsterneuerung und Pluripotenzerhaltung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen). Im Verlauf dieser Dissertation wurde eine zellmembranpermeable Variante des Nanog-Proteins etabliert, um ein Werkzeug zu schaffen, mit dem sich die Funktion des Proteins in pluripotenten und differenzierten Zellen charakterisieren lässt. Bei der hierfür angewendeten Methode der Protein-Transduktion wird keine genetische Information in Zellen transferiert, sondern rekombinant hergestelltes Protein. Dieses ist genetisch mit der Protein-Transduktionsdomäne TAT fusioniert, welche die Membranpermeabilität vermittelt.

Grundlegende Erkenntnisse zur Protein-Transduktion in murine ES-Zellen wurden anhand der transduzierbaren Cre Rekombinase HTNCre (His-TAT-NLS-Cre Fusionsprotein) gewonnen. Dazu wurde zunächst das Präparationsprotokoll von HTNCre optimiert und eine Aufbewahrungslösung etabliert, in welcher das Protein mit einer Konzentration von 200 – 450  $\mu\text{M}$  stabil gelagert werden kann. Mit dieser Lösung lässt sich das Ansetzen des Transduktionsmediums stark vereinfachen, da die üblichen Arbeitskonzentrationen zwischen 0,5 und 10  $\mu\text{M}$  liegen, und das Protein ohne weitere Dialyseschritte in das Zielmedium verdünnt werden kann.

Anhand von Reporterzelllinien ließen sich die mit HTNCre induzierten Rekombinationsereignisse zuverlässig quantifizieren. So wurde gezeigt, dass die Transduktion von HTNCre durch fötales Kälberserum (FKS) stark inhibiert wird. Aus diesem Grund wurde ein serumreduziertes ES-Zellmedium entwickelt, mit dem die Transduktions-Inhibition unter Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von ES-Zellen deutlich verringert werden konnte. Die Transduktions-Effizienz konnte ebenfalls durch den Einsatz des fusogenen Peptids dTAT-HA2 gesteigert werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Technik der Protein-Transduktion eine exakte Kontrolle über den Zeitpunkt und das Ausmaß der Cre-Aktivität erlaubt, und sich auf diese Weise die in der Literatur vielfach beschriebenen Cre-induzierten Toxizitäten umgehen lassen. Nach der HTNCre-Behandlung von murinen ES-Zellen war weder das Proliferationsverhalten verändert, noch konnten chromosomale Veränderungen festgestellt werden. Die Keimbahngängigkeit der ES-Zellen blieb trotz der HTNCre-Behandlung erhalten.

Analog zum Beispiel von Cre wurde eine membranpermeable Version der Flpe Rekombinase geschaffen, mit der gezeigt werden konnte, dass die Anwendbarkeit der Protein-Transduktion bei ES-Zellen nicht allein auf Cre beschränkt ist.



---

Zur Herstellung einer zellmembrangängigen Version des Transkriptionsfaktors Nanog wurde unter mehreren klonierten Nanog-Varianten das rekombinante Fusionsprotein mit einer optimalen Kombination aus Reinheit und Löslichkeit identifiziert („Nanog-TAT“). Nanog-TAT induzierte bei murinen Wildtyp-ES-Zellen (C57BL/6) eine kompakte, weniger differenziertere Morphologie als unbehandelte Kontrollzellen und verstärkte die für ES-Zellen charakteristische Alkalische Phosphatase (AP) Aktivität, was ebenfalls auf eine Inhibition von Differenzierungsvorgängen hinweist. Nanog-TAT erhielt unter Entzug des für ES-Zellen sonst essentiellen Zytokins LIF (*leukemia inhibitory factor*) die Selbsterneuerung von ES-Zellen. Eine ES-Zelllinie, mit Reportertransgen unter Kontrolle von Promotorelementen des Pluripotenzmarkers Oct4, reagierte vergleichbar auf Nanog-TAT und wurde für bis zu 12 Passagen ohne LIF kultiviert. Der ES-Zellstatus dieser Zellen wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen und Färbungen auf spezifische Pluripotenz-Marker analysiert. Die LIF-entzogenen Oct4-Reporter-ES-Zellen zeigten unter Nanog-TAT-Behandlung weiterhin GFP-Fluoreszenz und ließen sich positiv auf Oct4, SSEA-1 und AP färben. Ferner erhielt Nanog-TAT bei diesen Zellen das Potential in Embryoidkörperchen, Teratomen und chimären Tieren zu Geweben der drei Keimblätter differenzieren zu können. Des Weiteren konnte eine synergistische Wirkung von LIF und Nanog-TAT festgestellt werden. Diese manifestierte sich in einer erhöhten Proliferation, Klonierungseffizienz und Viabilität sowie einer homogeneren Fluoreszenz der Oct4-Reporter ES-Zellen. Der Effekt von Nanog-TAT ist unabhängig vom JAK/Stat3 Signalweg, wie durch die Selbsterneuerung Nanog-TAT-behandelter ES-Zellen in Anwesenheit eines JAK-Inhibitors gezeigt wurde. Eine direkte oder indirekte Phosphorylierung von Stat3 durch Nanog-TAT findet nicht statt. Es wurde weiter gezeigt, dass Nanog-TAT auch bei humanen ES-Zellen inhibierend auf die Differenzierung wirkt.

Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit ein System zum direkten Transfer biologisch aktiven Nanog-Proteins zur Anwendungsreife gebracht und eingehend funktionell charakterisiert. Mit dieser Technik lässt sich nun, unter Umgehung eines Gentransfers, die Rolle von Nanog in ES-Zellen weitergehend analysieren, sowie seine potentiell förderliche Aktivität bei der Pluripotenz-Induktion in somatischen Zellen untersuchen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ambrosetti, D.C., Scholer, H.R., Dailey, L. and Basilico, C. (2000) Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *J Biol Chem*, **275**, 23387-23397.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J. and Thomson, J.A. (2000) Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*, **227**, 271-278.
- Asoh, S., Ohsawa, I., Mori, T., Katsura, K., Hiraide, T., Katayama, Y., Kimura, M., Ozaki, D., Yamagata, K. and Ohta, S. (2002) Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 17107-17112.
- Aubert, J., Dunstan, H., Chambers, I. and Smith, A. (2002) Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nat Biotechnol*, **20**, 1240-1245.
- 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 Dev*, **17**, 126-140.
- Baba, Y., Nakano, M., Yamada, Y., Saito, I. and Kanegae, Y. (2005) Practical range of effective dose for Cre recombinase-expressing recombinant adenovirus without cell toxicity in mammalian cells. *Microbiol Immunol*, **49**, 559-570.
- Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M. and Cohen, P. (2003) The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J*, **371**, 199-204.
- Beattie, G.M., Lopez, A.D., Bucay, N., Hinton, A., Firpo, M.T., King, C.C. and Hayek, A. (2005) Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells*, **23**, 489-495.
- Bedouelle, H. and Duplay, P. (1988) Production in *Escherichia coli* and one-step purification of bifunctional hybrid proteins which bind maltose. Export of the Klenow polymerase into the periplasmic space. *Eur J Biochem*, **171**, 541-549.
- Boiani, M. and Scholer, H.R. (2005) Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 872-884.
- Bonifaci, N., Sitia, R. and Rubartelli, A. (1995) Nuclear translocation of an exogenous fusion protein containing HIV Tat requires unfolding. *Aids*, **9**, 995-1000.

- 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., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R. and Young, R.A. (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., Bell, G.W., Otte, A.P., Vidal, M., Gifford, D.K., Young, R.A. and Jaenisch, R. (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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2654-2659.
- Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A. and Vallier, L. (2007) Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, **448**, 191-195.
- Buchholz, F., Angrand, P.O. and Stewart, A.F. (1998) Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol*, **16**, 657-662.
- 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.
- Chambers, I. and Smith, A. (2004) Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*, **23**, 7150-7160.
- Chen, G.T. and Inouye, M. (1994) Role of the AGA/AGG codons, the rarest codons in global gene expression in Escherichia coli. *Genes Dev*, **8**, 2641-2652.
- Console, S., Marty, C., Garcia-Echeverria, C., Schwendener, R. and Ballmer-Hofer, K. (2003) Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J Biol Chem*, **278**, 35109-35114.
- Dani, C., Chambers, I., Johnstone, S., Robertson, M., Ebrahimi, B., Saito, M., Taga, T., Li, M., Burdon, T., Nichols, J. and Smith, A. (1998) Paracrine induction of stem cell

- renewal by LIF-deficient cells: a new ES cell regulatory pathway. *Dev Biol*, **203**, 149-162.
- Darr, H., Mayshar, Y. and Benvenisty, N. (2006) Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development*, **133**, 1193-1201.
- Davis, G.D., Elisee, C., Newham, D.M. and Harrison, R.G. (1999) New fusion protein systems designed to give soluble expression in Escherichia coli. *Biotechnol Bioeng*, **65**, 382-388.
- de Alboran, I.M., O'Hagan, R.C., Gartner, F., Malynn, B., Davidson, L., Rickert, R., Rajewsky, K., DePinho, R.A. and Alt, F.W. (2001) Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity*, **14**, 45-55.
- Derossi, D., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1998) Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol*, **8**, 84-87.
- Dietz, G.P. and Bahr, M. (2004) Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci*, **27**, 85-131.
- 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.
- Falnes, P.O. and Sandvig, K. (2000) Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 407-413.
- Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L.L., Pepinsky, B. and Barsoum, J. (1994) Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 664-668.
- Frame, S. and Cohen, P. (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J*, **359**, 1-16.
- Frankel, A.D. and Pabo, C.O. (1988) Fingering too many proteins. *Cell*, **53**, 675.
- Gardner, R.L. and Rossant, J. (1979) Investigation of the fate of 4-5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. *J Embryol Exp Morphol*, **52**, 141-152.
- Gooi, H.C., Feizi, T., Kapadia, A., Knowles, B.B., Solter, D. and Evans, M.J. (1981) Stage-specific embryonic antigen involves alpha 1 goes to 3 fucosylated type 2 blood group chains. *Nature*, **292**, 156-158.

- 
- Green, M. and Loewenstein, P.M. (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*, **55**, 1179-1188.
- Hall, H., Williams, E.J., Moore, S.E., Walsh, F.S., Prochiantz, A. and Doherty, P. (1996) Inhibition of FGF-stimulated phosphatidylinositol hydrolysis and neurite outgrowth by a cell-membrane permeable phosphopeptide. *Curr Biol*, **6**, 580-587.
- Hamazaki, T., Oka, M., Yamanaka, S. and Terada, N. (2004) Aggregation of embryonic stem cells induces Nanog repression and primitive endoderm differentiation. *J Cell Sci*, **117**, 5681-5686.
- Hammarstrom, M., Hellgren, N., van Den Berg, S., Berglund, H. and Hard, T. (2002) Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Sci*, **11**, 313-321.
- Han, X., Bushweller, J.H., Cafiso, D.S. and Tamm, L.K. (2001) Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat Struct Biol*, **8**, 715-720.
- 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.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S. and Monk, M. (1987) HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*, **326**, 292-295.
- Huth, J.R., Bewley, C.A., Jackson, B.M., Hinnebusch, A.G., Clore, G.M. and Gronenborn, A.M. (1997) Design of an expression system for detecting folded protein domains and mapping macromolecular interactions by NMR. *Protein Sci*, **6**, 2359-2364.
- Hyslop, L., Stojkovic, M., Armstrong, L., Walter, T., Stojkovic, P., Przyborski, S., Herbert, M., Murdoch, A., Strachan, T. and Lako, M. (2005) Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells*, **23**, 1035-1043.
- 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.

- 
- James, D., Levine, A.J., Besser, D. and Hemmati-Brivanlou, A. (2005) TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*, **132**, 1273-1282.
- Jans, D.A. and Hassan, G. (1998) Nuclear targeting by growth factors, cytokines, and their receptors: a role in signaling? *Bioessays*, **20**, 400-411.
- Jensen, F.C., Girardi, A.J., Gilden, R.V. and Koprowski, H. (1964) Infection of Human and Simian Tissue Cultures with Rous Sarcoma Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **52**, 53-59.
- Jo, D., Nashabi, A., Doxsee, C., Lin, Q., Unutmaz, D., Chen, J. and Ruley, H.E. (2001) Epigenetic regulation of gene structure and function with a cell-permeable Cre recombinase. *Nat Biotechnol*, **19**, 929-933.
- Johnson, C.E., Crawford, B.E., Stavridis, M., Ten Dam, G., Wat, A.L., Rushton, G., Ward, C.M., Wilson, V., van Kuppevelt, T.H., Esko, J.D., Smith, A., Gallagher, J.T. and Merry, C.L. (2007) Essential Alterations of Heparan Sulfate during the Differentiation of Embryonic Stem Cells to Sox1-EGFP Expressing Neural Progenitor Cells. *Stem Cells*.
- Joshi, S.K., Hashimoto, K. and Koni, P.A. (2002) Induced DNA recombination by Cre recombinase protein transduction. *Genesis*, **33**, 48-54.
- Kaplan, I.M., Wadia, J.S. and Dowdy, S.F. (2005) Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control Release*, **102**, 247-253.
- 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 Res*, **24**, 1404-1411.
- 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. *Mol Cell Biol*, **25**, 2475-2485.
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. and McCoy, J.M. (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. *Biotechnology (N Y)*, **11**, 187-193.
- Lee, T.I., Jenner, R.G., Boyer, L.A., Guenther, M.G., Levine, S.S., Kumar, R.M., Chevalier, B., Johnstone, S.E., Cole, M.F., Isono, K., Koseki, H., Fuchikami, T., Abe, K.,

- 
- Murray, H.L., Zucker, J.P., Yuan, B., Bell, G.W., Herbolsheimer, E., Hannett, N.M., Sun, K., Odom, D.T., Otte, A.P., Volkert, T.L., Bartel, D.P., Melton, D.A., Gifford, D.K., Jaenisch, R. and Young, R.A. (2006) Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, **125**, 301-313.
- Lewin, M., Carlesso, N., Tung, C.H., Tang, X.W., Cory, D., Scadden, D.T. and Weissleder, R. (2000) Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol*, **18**, 410-414.
- Loh, Y.H., Wu, Q., Chew, J.L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K.Y., Sung, K.W., Lee, C.W., Zhao, X.D., Chiu, K.P., Lipovich, L., Kuznetsov, V.A., Robson, P., Stanton, L.W., Wei, C.L., Ruan, Y., Lim, B. and Ng, H.H. (2006) The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*, **38**, 431-440.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H.B., Allak, B.A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A. and Jonkers, J. (2001) Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9209-9214.
- Martin, G.R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 7634-7638.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., Ko, M.S. and Niwa, H. (2007) Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, **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.
- Meiner, V.L., Cases, S., Myers, H.M., Sande, E.R., Bellosta, S., Schambelan, M., Pitas, R.E., McGuire, J., Herz, J. and Farese, R.V., Jr. (1996) Disruption of the acyl-CoA:cholesterol acyltransferase gene in mice: evidence suggesting multiple cholesterol esterification enzymes in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14041-14046.
- Misra, R. and Reeves, P. (1985) Intermediates in the synthesis of TolC protein include an incomplete peptide stalled at a rare Arg codon. *Eur J Biochem*, **152**, 151-155.

- 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.
- Murriel, C.L. and Dowdy, S.F. (2006) Influence of protein transduction domains on intracellular delivery of macromolecules. *Expert Opin Drug Deliv*, **3**, 739-746.
- 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.
- Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J.C., Jones, A.T., Sugiura, Y. and Futaki, S. (2004) Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol Ther*, **10**, 1011-1022.
- 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. *Mol Cell Biol*, **26**, 7772-7782.
- Nichols, J., Davidson, D., Taga, T., Yoshida, K., Chambers, I. and Smith, A. (1996) Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis. *Mech Dev*, **57**, 123-131.
- 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.
- Nilsson, B., Moks, T., Jansson, B., Abrahmsen, L., Elmblad, A., Holmgren, E., Henrichson, C., Jones, T.A. and Uhlen, M. (1987) A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Eng*, **1**, 107-113.
- Nishikawa, S., Jakt, L.M. and Era, T. (2007) Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 502-507.
- 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. *Mol Cell Biol*, **19**, 5453-5465.
- Niwa, H. (2001) Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct*, **26**, 137-148.



- 
- Niwa, H. (2007) How is pluripotency determined and maintained? *Development*, **134**, 635-646.
- Niwa, H., Miyazaki, J. and Smith, A.G. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, **24**, 372-376.
- 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.
- Novak, A., Guo, C., Yang, W., Nagy, A. and Lobe, C.G. (2000) Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis*, **28**, 147-155.
- Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S. (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, **448**, 313-317.
- Pan, G. and Pei, D. (2005) The stem cell pluripotency factor NANOG activates transcription with two unusually potent subdomains at its C terminus. *J Biol Chem*, **280**, 1401-1407.
- 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., Jäger, R., Patsch C., Jäger, A., Egert, A., Schorle, H., Edenhofer, F. (2007) Enhanced purification of cell-Permeant Cre and germline transmission after transduction into mouse embryonic stem cells. *Genesis*, im Druck
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4489-4494.
- Pfeifer, A., Brandon, E.P., Kootstra, N., Gage, F.H. and Verma, I.M. (2001) Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11450-11455.
- Phelan, A., Elliott, G. and O'Hare, P. (1998) Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat Biotechnol*, **16**, 440-443.
- Prochiantz, A. (2000) Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 400-406.

- 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. *J Biol Chem*, **280**, 24731-24737.
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S. and Ptashne, M. (1988) GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature*, **335**, 563-564.
- Sarkar, I., Hauber, I., Hauber, J. and Buchholz, F. (2007) HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase. *Science*, **316**, 1912-1915.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. and Brivanlou, A.H. (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Medicine*, **10**, 55-63.
- Schmidt, E.E., Taylor, D.S., Prigge, J.R., Barnett, S. and Capecchi, M.R. (2000) Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13702-13707.
- Shi, W., Wang, H., Pan, G., Geng, Y., Guo, Y. and Pei, D. (2006) Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem*, **281**, 23319-23325.
- Silva, J., Chambers, I., Pollard, S. and Smith, A. (2006) Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature*, **441**, 997-1001.
- Silver, D.P. and Livingston, D.M. (2001) Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol Cell*, **8**, 233-243.
- Skehel, J.J., Cross, K., Steinhauer, D. and Wiley, D.C. (2001) Influenza fusion peptides. *Biochem Soc Trans*, **29**, 623-626.
- 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.
- Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31-40.
- Solter, D. (2006) From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet*, **7**, 319-327.
- Solter, D. and Knowles, B.B. (1978) Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 5565-5569.
- Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F.H., Rodriguez-Esteban, C. and Belmonte, J.C. (2006) Maintenance of embryonic stem cell pluripotency by Nanog-mediated reversal of mesoderm specification. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, **3 Suppl 1**, S114-122.

- 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.
- Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L. and McKay, R.D. (2007) New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, **448**, 196-199.
- Theodore, L., Derossi, D., Chassaing, G., Llibat, B., Kubes, M., Jordan, P., Chneiweiss, H., Godement, P. and Prochiantz, A. (1995) Intraneuronal delivery of protein kinase C pseudosubstrate leads to growth cone collapse. *J Neurosci*, **15**, 7158-7167.
- Thompson, J.E., Cubbon, R.M., Cummings, R.T., Wicker, L.S., Frankshun, R., Cunningham, B.R., Cameron, P.M., Meinke, P.T., Liverton, N., Weng, Y. and DeMartino, J.A. (2002) Photochemical preparation of a pyridone containing tetracycline: a Jak protein kinase inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*, **12**, 1219-1223.
- Thompson, S., Clarke, A.R., Pow, A.M., Hooper, M.L. and Melton, D.W. (1989) Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell*, **56**, 313-321.
- 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*, **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. *Mol Cell Biol*, **23**, 2699-2708.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **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.
- Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M. and Giacca, M. (2001) Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, **276**, 3254-3261.
- Vallier, L., Reynolds, D. and Pedersen, R.A. (2004) Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway. *Dev Biol*, **275**, 403-421.

- 
- 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. *J Biol Chem*, **272**, 26947-26952.
- 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, G., Zhang, H., Zhao, Y., Li, J., Cai, J., Wang, P., Meng, S., Feng, J., Miao, C., Ding, M., Li, D. and Deng, H. (2005) Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem Biophys Res Commun*, **330**, 934-942.
- Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L. and Rothbard, J.B. (2000) The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13003-13008.
- 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*.
- Will, E., Klump, H., Heffner, N., Schwieger, M., Schiedlmeier, B., Ostertag, W., Baum, C. and Stocking, C. (2002) Unmodified Cre recombinase crosses the membrane. *Nucleic Acids Res*, **30**, e59.
- Williams, R., Hilton, D., Pease, S., Willson, T., Stewart, C., Gearing, D., Wagner, E., Metcalf, D., Nicola, N. and Gough, N. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, **336**, 684-687.
- Woestenenk, E.A., Hammarstrom, M., Hard, T. and Berglund, H. (2003) Screening methods to determine biophysical properties of proteins in structural genomics. *Anal Biochem*, **318**, 71-79.
- Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D. and Carpenter, M.K. (2001) Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, **19**, 971-974.
- Xu, R.H., Peck, R.M., Li, D.S., Feng, X., Ludwig, T. and Thomson, J.A. (2005) Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods*, **2**, 185-190.

- 
- 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*, **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.
- Yu, B.D., Becker-Hapak, M., Snyder, E.L., Vooijs, M., Denicourt, C. and Dowdy, S.F. (2003) Distinct and nonoverlapping roles for pRB and cyclin D:cyclin-dependent kinases 4/6 activity in melanocyte survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14881-14886.
- 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 Dev*, **9**, 2635-2645.
- Zhang, Y., Riesterer, C., Ayrall, A.M., Sablitzky, F., Littlewood, T.D. and Reth, M. (1996) Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, **24**, 543-548.

## 7 Eigene Publikationen

Heukamp, L., **Peitz, M.**, Klotz, L., Rommerscheidt-Fuss, U., Hahne, J., Edenhofer, F., Büttner, R., Diehl, L. (2007) In vivo use of recombinant Cre protein for sporadic lung cancer formation in a mouse tumour model.  
(in Vorbereitung)

Patsch, C. \*, **Peitz, M. \***, Kessler D., Zimmer, A., Edenhofer, F. (2007)  
Delivery of transducible Flpe protein induces highly efficient recombination in ES cells and retains germline competency  
(in Vorbereitung)

**Peitz M. \***, Winnemöller, D. \*, Müntz B. \*, Yamanaka S., Brüstle O., Edenhofer, F. (2007)  
Modulating stem cell properties by direct delivery of cell-permeable Nanog protein  
(unter Begutachtung bei Cell Stem Cell; Juli, 2007)

**Peitz, M. \***, Jäger, R. \*, Patsch C., Jäger, A., Egert, A., Schorle, H., Edenhofer, F. (2007)  
Enhanced Purification of Cell-Permeant Cre and Germline Transmission After Transduction Into Mouse Embryonic Stem Cells.  
Genesis, im Druck

Nolden, L., Edenhofer, F., **Peitz, M.**, and Brüstle, O. (2007)  
Stem Cell Engineering Using Transducible Cre Recombinase.  
Methods in Molecular Medicine 2nd ed.: Tissue Engineering.  
The Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA. Im Druck

Haupt, S.\*, Edenhofer, F.\*, **Peitz, M.**, Leinhaas, A., Brüstle, O. (2007)  
Stage specific conditional mutagenesis in embryonic stem cell-derived neural cells and post-mitotic neurons by direct delivery of biologically active Cre recombinase  
Stem Cells 25:181-188

---

Edenhofer, F. & **Peitz, M.** (2005)

CREating designer cells: genetic engineering of stem cells by site-specific recombinase

In: Stem Cell Repair and Regeneration

Imperial College Press, pp 49-65

**Peitz, M.**, Rajewsky, K., Brüstle, O., Edenhofer, F. (2003)

Direct delivery of biologically active proteins into cells: protein transduction as a tool for genomic manipulations in mammalian cells

Eur. J. Cell. Biol. 82:Suppl.53, 36

**Peitz, M.**, Pfannkuche, K., Rajewsky, K., 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

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:4489-4494

Edenhofer F., **Peitz, M.**, Pfannkuche, K., Rajewsky, K. (2002)

Recombinase fusion protein with enhanced cellular uptake

EP Nr. 020054680

Aranda M., Kanellopoulou C., Christ N., **Peitz M.**, Rajewsky K., Dröge P. (2001)

Altered directionality in the Cre-LoxP site-specific recombination pathway.

J Mol Biol. 311:453-9.

\* diese Autoren haben gleichermaßen zur Arbeit beigetragen

---

## 8 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei Prof. Dr. Oliver Brüstle für die exzellenten Arbeitsbedingungen am Institut und bei Herrn Dr. Edenhofer für die interessanten und herausfordernden Projekte, die wissenschaftlichen Diskussionen und Ratschläge, das mir stets entgegengebrachte Vertrauen und die eingeräumten Freiheiten bei der strategischen Ausrichtung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Klaus Willecke danke ich für seine nicht selbstverständliche Bereitschaft, diese Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu betreuen.

Bei der gesamten SCEG möchte ich mich für die sehr freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die Anregungen und Diskussionen in den „Clubs“ bedanken. Insbesondere danke ich Bernhard Münt und Dirk Winnemöller, Christoph Patsch und Daniela Kessler sowie Simone Haupt für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei den Nanog-, Flpe- bzw. Cre-Projekten.

Bei Prof. Dr. Hubert Schorle und seinen Mitarbeitern bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und hilfreiche Diskussionen.

Frau Anke Leinhaas möchte ich besonders danken. Sie war stets hilfsbereit und hat sich besonders bei der Etablierung der Blastozysten-Injektion das sprichwörtliche Bein ausgerissen. Auch bei Frau Michaela Segschneider möchte ich mich für die Unterstützung bei den Teratom-Experimenten bedanken. Frau Barbara Ley möchte ich für die Hilfe bei der FACS-Analyse humaner ES-Zellen danken.

Allen Mitarbeitern der Rekonstruktiven Neurobiologie, insbesondere dem Sekretariat, möchte ich für die angenehme Atmosphäre am Institut danken.

Ich danke meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung, die sie mir im Studium und darüber hinaus immer wieder zukommen ließen. Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Michaela für ihre Geduld und Fürsorge über all die Jahre.



## 9 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, im Juli 2007

Michael Peitz