

**Untersuchungen zur Aktivität des Stammzellfaktors Nanog in
embryonalen Stammzellen und somatischen Zellen**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dirk Winnemöller

aus

Köln

Bonn 2007

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

1. Referent: Prof. Dr. Brüstle
2. Referent: Prof. Dr. Scheidtmann

Tag der Promotion: 10.03.2008

Erscheinungsjahr: 2008

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

Abkürzungen

AP	Alkalische-Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
β-Gal	Beta-Galaktosidase
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
bp	Basenpaar
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
F	Farad
FKS	Fötale Kälber-Serum
g	Gramm oder Gravitationskonstante
h	Stunde
H6	6xHistidin
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HD	Homeodomäne
HRP	Meerrettichperoxidase (englisch: <i>Horseradish peroxidase</i>)
IgG, IgM	Immunglobulin G, Immunglobulin H
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle (englisch: <i>internal ribosomal entry site</i>)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani Medium
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LI	LIF Inhibitor
M	Molare Masse
m	Meter
MEF	murine embryonale Fibroblasten

Mes	Mesoderm
nb	nicht bestimmbar
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
Ni-NTA	Nickel- <i>nitrilotriacetic acid</i>
NLS	Kernlokalisierungssignal
OD	Optische Dichte
P	Passage
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	parietales Endoderm
PFA	Paraformaldehyd
PRE	primitives Endoderm
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: <i>ribonucleic acid</i>)
RT	Reverse Transkription
SDS	Natrium Dodecyl-Sulfat (englisch: <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
TAT	basische Region des HIV-TAT Proteins
TB	<i>Terrific Broth</i> Medium
TE	Trophektoderm
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VE	viscerales Endoderm
Vol	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Embryonale Stammzellen	1
1.2 Stammzellen für die regenerative Medizin	1
1.3 Regulation der Pluripotenz von ES-Zellen	2
1.3.1 Extrinsische Faktoren zum Pluripotenzhalt	2
1.3.2 Intrinsische Pluripotenzfaktoren	4
1.4 Die Rolle des Stammzellfaktors Nanog bei Pluripotenzhalt und Differenzierung	4
1.5 Pluripotenz und Transformation	6
1.6 Zelluläre Seneszenz	7
1.7 Reprogrammierung somatischer Zellen	8
1.8 Überexpression von Genen durch Supertransfektion	10
1.9 Manipulation von Zellen durch Protein-Transduktion	11
1.10 Zielsetzung der Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Verwendete Chemikalien, Geräte und biologisches Material	13
2.1.1 Chemikalien	13
2.1.2 Geräte	13
2.1.3 Plastikware für die Zellkultur	15
2.1.4 Inhibitoren	16
2.1.5 Enzyme	16
2.1.6 Antikörper	17
2.1.7 Bakterienstämme	17
2.1.8 Zell-Linien	18
2.1.9 Mauslinien	19
2.2 Molekularbiologie	20
2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA und PCR Produkten	20
2.2.2 Enzymatische Hydrolyse von DNA	21
2.2.3 Dephosphorylierung von freien DNA Enden	21
2.2.4 Ligation von DNA	21
2.2.5 Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	21
2.2.6 Phenol-Chloroform-Extraktion	22
2.2.7 Elektrophorese im Agarosegel	22
2.2.8 Photometrische Messung von DNA und RNA Konzentrationen	23
2.2.9 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	23
2.2.10 DNA-Sequenzierung	24
2.2.11 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	24
2.2.12 SDS-PAA-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung	25
2.2.13 Western-Blot mit Antikörperfärbung	26
2.2.14 <i>Dot Blot</i>	28
2.2.15 <i>Typing</i> PCR	29
2.2.16 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	30
2.2.17 Klonierung der <i>Polyoma</i> -basierten Vektoren	31
2.3 Präparation rekombinanter Proteine	34
2.3.1 Proteinexpression	34
2.3.2 Native Affinitäts-Chromatografie von HTNCre	35

2.3.3 Native Affinitäts-Chromatografie von Nanog-Proteinen	36
2.3.4 Dialyse von HTNCre in Glycerinpuffer	37
2.3.5 <i>In vitro</i> Cre-Rekombination	38
2.3.6 Dialyse von Nanog Proteinen und Herstellung des Nanog Transduktionsmediums	39
2.4 Immunhistochemie und Zell-Färbungen	40
2.4.1 Immunhistochemie	40
2.4.2 Alkalische Phosphatase-Aktivität	41
2.4.3 X-Gal-Färbung	41
2.5 Zellkultur	42
2.5.1 Fibroblasten	42
2.5.2 Murine embryonalen Stammzellen	42
2.5.3 SSC-Zellen	43
2.5.4 Feederpräparation	43
2.5.5 Elektroporation von NIH 3T3 Zellen und ES-Zellen	44
2.5.6 Supertransfektion von E14T ES-Zellen	44
2.5.7 <i>Foci</i> Test	45
2.5.8 <i>Soft</i> Agar	45
2.5.9 Wachstumskurven	45
2.5.10 Karyotyp-Analyse	46
2.5.11 Injektion von NIH 3T3 Zellen in immunsupprimierte Mäuse	46
3. Ergebnisse	48
3.1 Konditionale Überexpression des Stammzellfaktors Nanog in Maus-Zellen	48
3.1.1 Klonierung eines <i>Polyoma</i> -basierten Vektors zur konditionalen Überexpression	48
3.1.2 Cre-induzierbare Überexpression von HcRed in murinen ES-Zellen	50
3.1.3 Inhibition der Differenzierung durch Überexpression von Nanog in ES-Zellen	52
3.1.4 Nanog Überexpression ermöglicht klonales Wachstum in Abwesenheit von LIF	57
3.1.5 Analyse der Überexpression von HcRed und Nanog in NIH 3T3 Zellen	59
3.2 Nanog Protein-Transduktion in somatischen Zellen der Maus	61
3.2.1 Zellpermeables Nanog-TAT Protein	61
3.2.2 Nanog-TAT induziert eine erhöhte Proliferation von NIH 3T3 Zellen	62
3.2.3 Nanog-TAT induziert den Verlust der Kontaktinhibition von NIH 3T3 Zellen	63
3.2.4 Reversible Bildung der Nanog-TAT induzierten <i>Foci</i>	65
3.2.5 Nanog-TAT behandelte Zellen bilden vermehrt Kolonien im <i>Soft</i> -Agar-Test	66
3.2.6 Nanog-TAT induziert vergrößerte Tumore <i>in vivo</i>	68
3.2.7 Einfluss der Phosphoinositid-3-Kinase auf die Nanog-TAT induzierte Transformation	69
3.2.8 Transkriptionsanalyse Nanog-TAT behandelter Zellen	70
3.2.9 Nanog-TAT Protein-Transduktion mit primären embryonalen Maus Fibroblasten	71
3.2.10 Nanog-TAT beschleunigt die Proliferation von murinen Fibroblasten-Zellen	72
3.2.11 Nanog-TAT blockiert die zelluläre Seneszenz von murinen Fibroblasten-Zellen	73
3.2.12 Nanog-TAT induzierte Verminderung der zellulären Seneszenz ist mit chromosomaler Stabilität assoziiert	74
3.2.13 Die Nanog-TAT Protein-Transduktion ist auf spermatogonialen Stammzellen der Maus anwendbar	76
4. Diskussion	79
4.1 Etablierung eines <i>Polyoma</i>-basierten Vektors zur konditionalen Überexpression	79
4.2 Überexpression von Nanog in ES-Zellen und somatischen Zellen	81
4.3 Proteintransduktion von Nanog-TAT in somatische Zellen	83
4.4 Reversible Transformation von NIH 3T3 Zellen durch Nanog-TAT	84
4.5 Expansion primärer Zellen mit Nanog-TAT	88
4.6 Übertragung der Nanog Protein-Transduktion auf weitere Zell-Linien	89
4.7 Ausblick	90
5. Zusammenfassung	91

6. Literaturverzeichnis	92
7. Eigene Publikationen	100
8. Danksagung	101
9. Erklärung	102
10. Lebenslauf	103

1. Einleitung

1.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) besitzen die Fähigkeit zur uneingeschränkten Selbsterneuerung und können sich in alle Zelltypen des Organismus entwickeln. Damit unterscheiden sie sich von somatischen Zellen, deren Vermehrung eingeschränkt ist und die in ihrem Entwicklungspotential limitiert sind. Die Potenz, in alle Zelltypen des adulten 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).

Bei der Maus ist es erstmals 1981 gelungen, ES-Zellen aus der inneren Zellmasse von Blastozysten abzuleiten (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981; Abbildung 1.1), beim Menschen war dies erst 1998 erfolgreich (Thomson et al., 1998).

1.2 Stammzellen für die regenerative Medizin

Die Erforschung von ES-Zellen ist besonders im Hinblick auf mögliche zukünftige Einsätze in der regenerativen Medizin sinnvoll. Aufgrund der uneingeschränkten Teilungsfähigkeit sind diese Zellen eine attraktive Quelle für Zell- und Gewebeersatztherapien. Dies wird durch die Fähigkeit der ES-Zellen, *in vitro* in somatische Vorläuferzellen differenzieren zu können, ermöglicht (Donovan und Gearhart, 2001, Mayhall et al., 2004).

So konnte gezeigt werden, dass hämatopoetische Vorläuferzellen, die aus ES-Zellen differenziert wurden, dauerhaft das blutbildende System in bestrahlten Mäusen wiederherstellen konnten (Daley, 2003). Auch neurale Zellen können aus ES-Zellen gewonnen werden (Brüstle et al., 1997; Conti et al., 2005). Aus ES-Zellen abgeleitete Oligodendrozyten myelinisieren Axone *in vivo* (Brüstle et al., 1999) und es wurde berichtet, dass aus ES-Zellen abgeleitete dopaminerge Neuronen nach Transplantation im Mausmodell funktionell sind (Kim et al., 2002).

Bevor Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson oder Diabetes durch den Einsatz von ES-Zell-abgeleiteten Zellen behandelt werden können, ist es essentiell die molekularen Regulationsmechanismen von ES-Zellen genauer zu verstehen. Neue Erkenntnisse wären auch für das

Verständnis von adulten Stammzellen nutzbar. Neben der Erforschung von verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten steht dabei die Untersuchung des Pluripotenzerhalts im Vordergrund.

1.3 Regulation der Pluripotenz von ES-Zellen

Die Regulation komplexer biologischer Mechanismen erfolgt meist durch ein Zusammenspiel von verschiedenen extrinsischen und intrinsischen Faktoren und Signalwegen. Nach heutigem Wissen ist dies auch bei der Regulation der Pluripotenz in ES-Zellen der Fall.

1.3.1 Extrinsische Faktoren zum Pluripotenzerhalt

Zu den extrinsischen Faktoren gehören Zytokine und Hormone. Sie müssen bei der *in vitro* Zellkultur von ES-Zellen dem Medium zugegeben werden. Dies kann auch mit Hilfe von embryonalen Fibroblasten-Zellen erfolgen, die bei Ko-Kultur mit ES-Zellen die benötigten Faktoren ins Medium sekretieren.

Als wichtigster extrinsischer Faktor für die Zellkultur von murinen ES-Zellen wurde vor fast 20 Jahren der *leukemia inhibitory* Faktor (LIF) identifiziert (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Für viele ES-Zell-Linien ist bei entsprechender LIF-Stimulation keine Ko-Kultur mit Fibroblasten-Zellen notwendig (Hooper et al., 1987; Thompson et al., 1989). LIF ist ein Mitglied der Interleukin-6 Zytokin-Familie und bindet direkt an den LIF-Rezeptor (LIFR), welcher daraufhin mit seiner zytoplasmatischen Domäne 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 konnte gezeigt werden, dass allein die Aktivierung von Stat3 ausreichend ist, um die Selbsterneuerung von ES-Zellen aufrecht zu halten (Matsuda et al., 1999). Weitere wichtige extrinsische Faktoren sind die BMP Proteine (*bone morphogenetic proteins*), die eine dauerhafte Aufrechterhaltung von Pluripotenz in der ES-Zellkultur in Abwesenheit von fötalem Serum ermöglichen (Ying, et al., 2003).

Zusätzlich gibt es Hinweise auf alternative extrinsische Faktoren, die noch nicht identifiziert werden konnten. So haben im Maus-Embryo bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von Pluripotenz Mutationen an LIF und am LIF-Rezeptor keine Auswirkung auf die Pluripotenz

(Nichols et al., 1996) und ES-Zellen mit homozygot deletierten LIF-Rezeptor-Allelen können auf Fibroblasten-Zellen Kolonien bilden (Chambers et al., 2004). Dies deutet auf LIF-unabhängige Mechanismen hin, welche die Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen unterstützen.

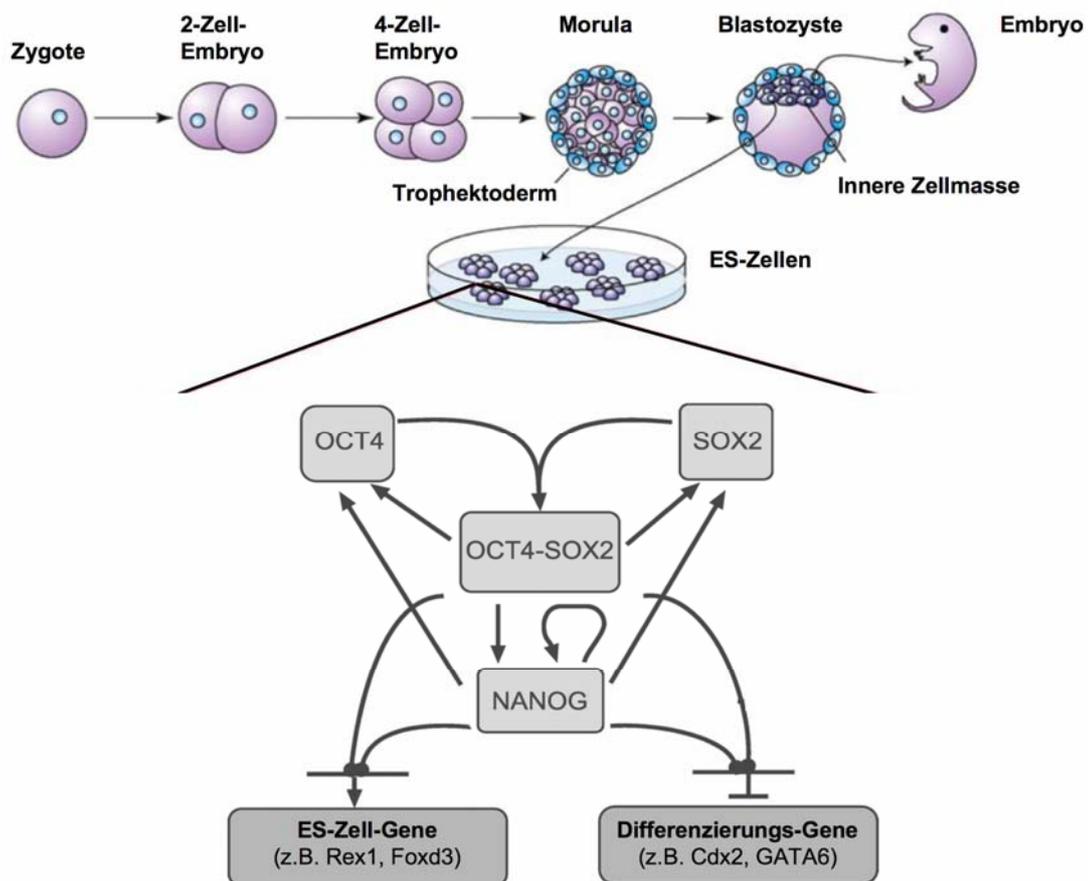


Abbildung 1.1 Gewinnung von Maus ES-Zellen und deren Transkriptionelles Netzwerk

ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen, die in der normalen Entwicklung den Embryo ausbildet. Bei der *in vitro* Zellkultur dieser Zellen wird die Pluripotenz durch ein komplexes Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog aufrecht erhalten. Dabei regulieren sich Oct4, Sox2 und Nanog gegenseitig. Die Pfeile repräsentieren die Aktivierungen durch die jeweiligen Transkriptionsfaktoren oder durch den Komplex aus Oct4 und Sox2. Schließlich aktivieren Nanog und Oct4-Sox2 die Transkription von ES-Zell-Genen und inhibieren die Transkription von Differenzierungs-Genen.

Adaptiert von Boyer et al., 2006 und Chickarmane et al., 2006

1.3.2 Intrinsische Pluripotenzfaktoren

Intrinsische Faktoren sind in der Regel Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch extrinsische Signale oder interne autoregulatorische Netzwerke kontrolliert werden. Die wichtigsten intrinsischen Pluripotenzfaktoren sind Oct4, Sox2 und Nanog (Abbildung 1.1). 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 (Niwa, 2007; Zhou et al., 2007; Abbildung 1.1).

In ES-Zellen führt die Eliminierung von Oct4 oder Nanog durch *knock-out* oder *knock-down* Techniken zum Verlust der Selbsterneuerung und der Pluripotenz. Im Fall von Oct4 resultiert die Differenzierung der Zellen in die trophektodermale Linie (Nichols et al., 1998, Niwa et al., 2000), beim *knock-out* von Nanog in extraembryonales Endoderm (Mitsui et al., 2003). Die Sox2 Expression in ES-Zellen ist für die Regulation der Oct4 Expression notwendig, daher können ES-Zellen ohne Sox2 Expression nur durch eine Überexpression von Oct4 pluripotent bleiben (Masui et al., 2007).

1.4 Die Rolle des Stammzellfaktors Nanog bei Pluripotenzerhalt und Differenzierung

Der Transkriptionsfaktor Nanog wurde vor kurzem unabhängig von zwei Gruppen entdeckt (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Nanog ist wie Oct4 ein Protein mit einer Homeodomäne. Nanog-Expression ist *in vitro* in ES-Zellen und in embryonalen Tumorzellen nachgewiesen worden. In der Mausentwicklung startet die Expression von Nanog im Morulastadium und die stärkste Transkription ist in der inneren Zellmasse von frühen Blastozysten nachweisbar. Vor der Implantation des Embryos verringert sich die Expression, möglicherweise wird so die unkontrollierte Proliferation der Zellen verhindert. Die Expression von Nanog bleibt nach der Einnistung des Embryos auf bestimmte Zellen des Epiblasts und später auf primordiale Keimzellen beschränkt (Chambers et al., 2003).

Aus der inneren Zellmasse von Nanog-defizienten Embryonen (Nanog^{-/-}) lassen sich nur Zellen gewinnen, die dem primitiven Endoderm ähnlich sind. Nach dem Ausschalten von Nanog in ES-Zellen nehmen die Nanog^{-/-}-Zellen eine typische abgerundete Morphologie von Zellen des parietalen Endoderms an (Mitsui et al., 2003 und Abbildung 1.2). Bei einer Suspensionskultur verhindert die Nanog-Expression in aggregierten ES-Zellen die Differenzierung in das primitive Endoderm (Hamazaki et al., 2004).

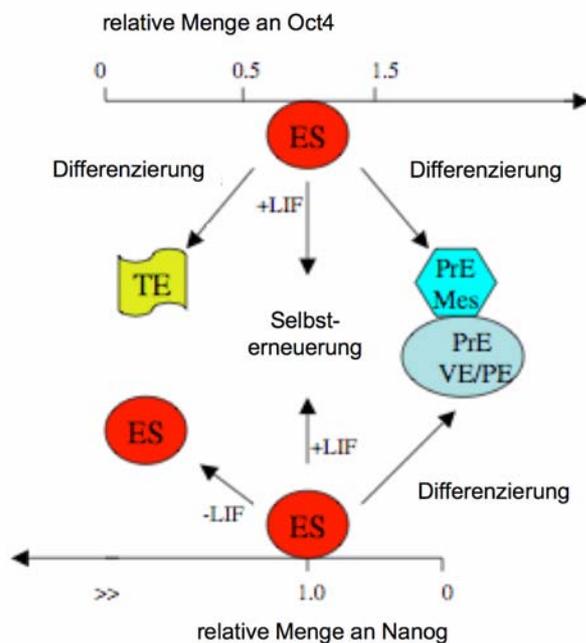


Abbildung 1.2
Molekulares Netzwerk in ES-Zellen

Modell des Einflusses von Oct4, Nanog und LIF in ES-Zellen. Unterschiedliche Expressionsniveaus der Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog führen zum Pluripotenzerhalt und Selbsterneuerung oder zur Differenzierung. Dabei ermöglicht nur die gesteigerte Menge an Nanog eine Selbsterneuerung in Abwesenheit von LIF.

Abkürzungen:
Mes, Mesoderm; PE, parietales Endoderm;
PrE, primitives Endoderm; TE, Trophoderm;
VE, viscerales Endoderm
Adaptiert von Cavaleri und Schöler, 2003

Darüber hinaus wurde berichtet, dass Nanog auch neurale Differenzierung inhibiert (Ying et al., 2003), die ansonsten durch den Entzug von BMP oder Serum ausgelöst wird. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass Nanog die frühe mesodermale Differenzierung aufhebt, indem es *brachyury* reprimiert, welches für den mesodermalspezifischen T-box Transkriptionsfaktor T kodiert. Dieser Faktor 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 in das primitive Endoderm sowie die neurale und mesodermale Differenzierung blockieren.

Im Gegensatz zu Oct4 scheint die Überexpression von Nanog für den Pluripotenzerhalt förderlich zu sein (Abbildung 1.2; Chambers et al., 2003; Boyer et al., 2006). ES-Zellen mit loxP-flankiertem konstitutiv aktiven Nanog-Expressionskonstrukt konnten für acht bis neun

Tage (zwei Passagen) bei klonaler Dichte (100 Zellen/cm²) in Anwesenheit eines LIF-Inhibitors kultiviert werden. Danach wurden diese Zellen in LIF-haltigem Medium expandiert, die Nanog-Expressionskassette über Cre-Rekombination entfernt und in Maus-Blastozysten injiziert. Der daraus resultierende Nachwuchs der Mäuse zeigte hohen Chimärismus. Die so behandelten Zellen zeigten aber keine Keimbahntransmission (Chambers et al., 2003). Da parallel behandelte Wildtyp-ES-Zellen vollständig differenzierten, scheint Nanog in Abwesenheit von LIF die Pluripotenz dieser Zellen aufrechterhalten zu haben. Diese Aktivität von Nanog ist unabhängig von der Stat3-Aktivierung und darüberhinaus induziert Stat3 selbst nicht die Expression von Nanog (Chambers et al., 2003). So scheinen Stat3 und Nanog unabhängig voneinander ihre Funktionen in 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, weil die Zellen ansonsten in die trophektodermale Richtung differenzieren. ES-Zellen bleiben durch Nanog-Überexpression auch ohne LIF pluripotent und exprimieren weiterhin Oct4, somit scheint Nanog die Oct4-Expression beeinflussen zu können.

1.5 Pluripotenz und Transformation

ES-Zellen und andere pluripotente oder multipotente Stammzellen sind in vielen Aspekten mit Tumorzellen zu vergleichen. Beide Zelltypen zeigen eine dauerhafte und hohe Proliferation sowie einen geringen Grad der Differenzierung. ES Zellen können als reversibel transformierte Zellen der inneren Zellmasse angesehen werden, die im Gegensatz zu diesen, tumorassoziierte Gene wie *E-Ras* exprimieren (Takahashi et al., 2003). Bei der dauerhaften *in vitro* Kultur von humanen ES-Zellen kann es zu genetischen Veränderungen kommen, die häufig auch bei der *in vivo* Tumorentstehung zu beobachten sind (Baker et al., 2007). Die Injektion von ES-Zellen in Mäuse (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981) oder Primaten (Asano et al., 2006) führt darüber hinaus zur Bildung von Teratomen.

Ob Stammzellfaktoren auch bei der Entstehung von Tumoren in adulten Organismen eine Rolle spielen, ist noch weitgehend unklar. Die Pluripotenzfaktoren Oct4 und Nanog werden normalerweise nicht in adulten Geweben exprimiert. Zu Beginn dieser Arbeit war es nicht

geklärt, ob eine Expression dieser Faktoren die Transformation somatischer Zellen bewirken kann. Neue Studien zeigen die Expression von Oct4 und Nanog in Keimzelltumoren (Ezeh et al., 2005; Hart et al., 2005). Darüber hinaus konnte die Expression von Nanog in einigen Brusttumoren und transformierten Zell-Linien wie MCF7 nachgewiesen werden (Ezeh et al., 2005). Hier ist es ungeklärt, ob die Expression der Pluripotenzfaktoren Ursache oder Folge der Transformation ist. Bei der ektopischen Überexpression von Oct4 in Swiss 3T3 Zellen zeigt sich dagegen, dass Oct4 eine Transformation induziert. Dabei verlieren die Swiss 3T3 Zellen ihre typische Kontaktinhibition und bilden Tumore in *cd1 nude* Mäusen (Gidekel et al., 2003). Zusätzlich induziert die Oct4 Überexpression in transgenen Mäusen epitheliale Dysplasie (Hochedlinger et al., 2005). Auch die Expression von Nanog scheint eine erhöhte Proliferation von NIH 3T3 Zellen zu bewirken (Zhang et al., 2005; Piestun et al., 2006).

Die retrovirale Expression der Onkogene c-Myc und Klf4 zusammen mit Oct4 und Sox2 resultieren in der Reprogrammierung von Maus-Fibroblastenzellen zu Stammzellen mit induzierter Pluripotenz (iPS-Zellen, *iPS-cells*, *induced pluripotent stem cell*) (Takahasi und Yamanaka, 2006; Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007; Abschnitt 1.7). Es existieren also Zusammenhänge zwischen Pluripotenz und Transformation, die aber auf molekularer Ebene größtenteils noch nicht verstanden sind.

1.6 Zelluläre Seneszenz

Im Gegensatz zu Stammzellen besitzen die meisten anderen Säugetierzellen nicht die Fähigkeit der uneingeschränkten Teilungsaktivität. Stattdessen ist die Proliferation *in vitro* und *in vivo* durch einsetzende replikative Seneszenz limitiert (Campisi, 2001). In humanen Zellen wird diese Seneszenz mit der Verkürzung der Telomere in Verbindung gebracht, während seneszente Mauszellen stabile Telomere besitzen (Wright und Shay, 2000). Bei embryonalen Fibroblasten-Zellen der Maus (MEF) setzt die Seneszenz früher ein als bei humanen Fibroblasten. Ein Möglicher Grund dafür könnte die unterschiedliche Toleranz gegenüber dem Stress der *in vitro* Zellkultur sein, deren Ursache noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Sherr und DePinho, 2000). Dabei ist besonders der oxidative-Stress zu nennen, der mit steigender Sauerstoffkonzentration zunimmt. Im Gegensatz zur physiologischen Sauerstoffkonzentration von drei bis fünf Prozent werden Zellen *in vitro* bei 21 Prozent Sauerstoffanteil kultiviert. Möglicherweise spielen durch den hohen Sauerstoffanteil entstehende DNA-Schäden eine wichtige Rolle bei der Ursache für die Seneszenz. Kultiviert

man MEF-Zellen bei geringer Sauerstoffkonzentration (drei Prozent), durch die weniger freie Radikale und damit auch weniger DNA Schäden entstehen, zeigen MEF-Zellen eine deutlich verlängerte Lebensspanne (Parrinello et al., 2003). MEF-Zellen können aber auch unter Standard-Zellkulturbedingungen die replikative Seneszenz überwinden und dauerhaft proliferieren (Todaro und Green, 1963; Kodama et al., 2001). Dies ist häufig mit dem Verlust des Tumorsuppressors p53 verbunden (Itahana et al., 2001). Es resultieren immortalisierte Zell-Linien wie NIH 3T3 Zellen, die unter anderem durch einen aberranten Karyotyp (hypotetraploid) charakterisiert sind (Torado und Green, 1963). Auch die Überexpression von Tbx2 blockiert die Seneszenz, immortalisiert MEF-Zellen *in vitro* und wird mit der Entstehung von humanem Brustkrebs in Verbindung gebracht (Jacobs et al., 2000).

Die limitierte Expansionsfähigkeit von primären untransformierten Zellen ist besonders in der regenerativen Medizin ein Problem. Zellen und Gewebe für die Ersatztherapie lassen sich deshalb nur eingeschränkt gewinnen. Ob die Stammzellfaktoren, die in ES-Zellen eine konstante dauerhafte Proliferation bei stabilem Karyotyp ermöglichen, die Seneszenz in primären somatischen Zellen beeinflussen können, ist nicht bekannt. Im Verlauf dieser Arbeit sind lediglich zwei Publikationen erschienen, die eine erhöhte Proliferation von NIH 3T3 Zellen bei Nanog Überexpression postulieren (Zhang et al., 2005; Piestun et al., 2006). Diese immortalisierte Zell-Linie eignet sich jedoch nicht für die Zellersatztherapie, da sie Tumore verursachen würde.

1.7 Reprogrammierung somatischer Zellen

Ein besonderer Aspekt von ES-Zellen ist deren oben beschriebener möglicher Einsatz in der regenerativen Medizin. Im Gegensatz zu Organtransplantaten könnten Gewebe, die aus ES-Zellen gewonnen werden, in Zukunft uneingeschränkt zur Verfügung stehen. Das Problem der Gewebeabstoßung durch das Immunsystem des Empfängers gilt aber für ES-Zell-abgeleitete Gewebe ebenso wie für klassische Transplantate. Darüber hinaus gibt es ethische Bedenken gegenüber der Verwendung von humanen ES-Zellen, da für deren Gewinnung humane Embryonen benötigt werden.

Die Gewebeabstoßung könnte man durch die Gewinnung von Patienten-spezifischen pluripotenten Zellen umgehen. Dies müsste durch Reprogrammierung von somatischen Zellen erfolgen, wie es bei der Maus bereits mit verschiedenen methodischen Ansätzen möglich ist (Abbildung 1.3):

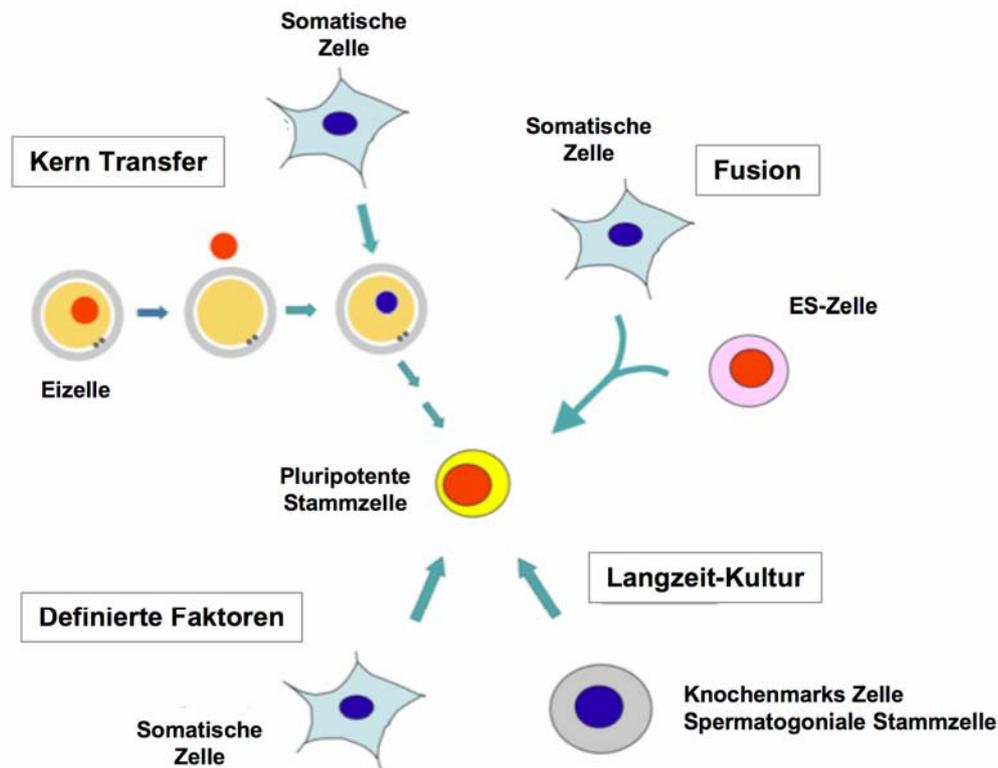


Abbildung 1.3 Methoden zur Generierung von Patienten-spezifischen pluripotenten Stammzellen

Durch den Kerntransfer, die Fusion von somatischen Zellen mit ES-Zellen und mit definierten Faktoren (Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc) ist es möglich, somatische Zellen der Maus zu reprogrammieren und pluripotente Stammzellen zu generieren. Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von pluripotenten Stammzellen ist die Langzeit-Kultur von Knochenmarkszellen oder Spermatozonialen Stammzellen.

Adaptiert von Yamanaka, 2007

- I. Reprogrammierung durch Kerntransfer (SCNT, *somatic cell nuclear transfer*) von einem somatischen Zellkern in eine entkernte Eizelle (Gurdon und Byrne, 2003) oder eine entkernte Zygote (Egli et al., 2007).
- II. Die Fusion von somatischen Zellen mit ES-Zellen führt zu Hybriden, bei denen eine Reprogrammierung des somatischen Zellkerns nachweisbar ist (Tada et al., 2001).
- III. Spontane Reprogrammierung durch die Langzeit-Kultur geeigneter Zellen. Auf diese Weise konnten pluripotente Zellen aus dem Knochenmark (Jiang et al., 2002) und aus dem Hoden von adulten Mäusen (Guan et al., 2006) gewonnen werden.

- IV. Die retrovirale Überexpression der definierten Faktoren Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc reprogrammiert murine Fibroblasten-Zellen zu Zellen mit induzierter Pluripotenz (Takahasi und Yamanaka 2006; Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007).

Bei der zuletzt genannten Technik (IV) werden keine Embryonen oder Oozyten gebraucht. Allerdings werden bis heute bei dieser Methode die vier Faktoren retroviral exprimiert und es kommt zu Integrationen in das Wirtsgenom. Deshalb könnten so erzeugte Zellen, bei einer erfolgreichen Übertragung der Methode auf humane Zellen, aufgrund der Gefahr von insertionaler Mutagenese nicht therapeutisch verwendet werden.

1.8 Überexpression von Genen durch Supertransfektion

Eine Strategie zur Charakterisierung der Funktion eines Proteins ist neben der Deletion des entsprechenden Gens (*loss of function*), die Überexpression des jeweiligen Proteins (*gain of function*). Um dies zu erreichen, gibt es verschiedene Methoden die auf dem Transfer von Nukleinsäuren basieren: chemische oder elektrisch induzierte Transfektion, Mikroinjektion sowie verschiedene virale Vektorsysteme. Um die dauerhafte Expression eines Gens zu ermöglichen, ist dabei meist die Integration von DNA in das Genom notwendig, dabei besteht das Risiko permanenter genetischer Modifikationen durch insertionale Mutagenese (Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Glover et al., 2005).

Polyoma Virus-DNA wird im Gegensatz dazu als freies, nicht integriertes Minichromosom (Episom) repliziert (Fried und Prives, 1986). Dabei ist das *Large-T* Antigen für die Initiation der Replikation der Virus-DNA verantwortlich (Fried, 1970; Francke und Eckhard, 1973).

Aufbauend auf diesem System wurde die Supertransfektion entwickelt (Gassmann et al., 1995; Camenisch et al., 1996). Diese beruht auf *Polyoma*-basierten Vektoren, die in ES-Zellen mit Expression des *Large-T* Antigens episomal vorliegen und repliziert werden. Die zirkulären Plasmide werden durch Elektroporation in die Zellen eingeschleust. Die Effizienz ist gegenüber der herkömmlichen Elektroporation um drei Größenordnungen höher (Chambers et al., 2003). Das *polyoma*-basierte Plasmid pMGD20neo wird über 78 Passagen ohne Integration funktionell in ES-Zellen erhalten (Camenisch et al., 1996). Dabei bilden ES-Zellen, die das *Large-T* Antigen exprimieren, nach Blastocysten-Injektion lebende Chimären,

die Pluripotenz der Zellen wird durch die Expression des *Large-T* Antigens also nicht beeinträchtigt (Gassmann et al., 1995).

1.9 Manipulation von Zellen durch Protein-Transduktion

Die relativ neue Technik der Protein-Transduktion ermöglicht *gain of function* Experimente, ohne die genetische Information von Zellen zu verändern (Dietz und Bahr, 2004). Dabei wird eine Protein-Transduktionsdomäne an das gewünschte Protein fusioniert, um die Zellpermeabilität zu erreichen. Das Protein wird rekombinant hergestellt, dem Medium zugesetzt und kann dann von Zellen aufgenommen werden. Im Gegensatz zur Transfektion, bei der eine ausreichende Expression durch Selektion sichergestellt werden muss, können die Zellen die Aufnahme des Proteins nicht einstellen, so dass eine Selektion nicht notwendig ist (Patsch und Edenhofer, 2007).

Zu Proteinen, die von Natur aus Zellmembranen passieren 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) identifiziert, die für die Transduktion wichtig ist.

Die prominenteste PTD ist TAT, ein basisches Peptid aus 11 Aminosäuren, 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 eindringen 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 als Fusionsprotein mit dem CDK-Inhibitor p27^{Kip1} rekombinant hergestellt (TAT-p27^{Kip1}) und induzierte die Migration von Zellen (Nagahara et al., 1998).

Eine zellpermeable Version der Cre Rekombinase (HTNCre) basiert ebenfalls auf der TAT-Domäne. Mit diesem transduzierbaren Protein konnte die Rekombination in Fibroblasten-Zellen, murinen ES-Zellen (Peitz et al., 2002; Peitz et al., 2007), humanen ES-Zellen (Nolden et al., 2006) und ES-Zell-abgeleiteten neuronalen Vorläuferzellen sowie postmitotischen Neuronen (Haupt et al., 2007) nachgewiesen werden. Dabei lag die Rekombinationseffizienz bei mitotisch aktiven Zellen bei über 90 Prozent.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Die Untersuchung des Stammzellfaktors Nanog in ES-Zellen und somatischen Zellen der Maus stand im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Zur Etablierung eines stabilen *gain of function* Modells sollte sowohl ein *Polyoma*-basierter Vektor kloniert werden, der eine konditionale Überexpression von Nanog ermöglicht, als auch die Protein-Transduktion von rekombinantem Nanog-TAT auf somatischen Zellen charakterisiert werden.

Für den genetischen Ansatz sollte ein *Polyoma*-basierter Vektor in mehreren Klonierungsschritten modifiziert werden und dann durch die sequentielle Anwendung der zellpermeablen Rekombinasen HTNCre und HTNFlp reversibel induzierbar werden. Dabei sollte eine Selektion sowohl vor als auch nach der Rekombination möglich sein. Dieser Vektor sollte so aufgebaut werden, dass er auch für weitere Anwendungen verwendbar ist wie einem *Screen* nach neuen Faktoren und für die konditionale Überexpression in humanen ES-Zellen.

Parallel dazu sollte untersucht werden, ob die Protein-Transduktion von Nanog-TAT erfolgreich auf somatische Zellen anwendbar ist. Zu diesem Zweck sollten zwei Zell-Linien zeit- und dosisabhängig mit dem zellpermeablen Nanog-TAT Protein behandelt werden: a) NIH 3T3 Zellen, eine etablierte, immortalisierte Zell-Linie, die durch hohe Proliferation und strikte Kontaktinhibition charakterisiert ist und b) MEF Oct4-GIP Zellen, die aus entsprechenden transgenen Mäusen hergestellt werden sollten und einen Reporter tragen, der eine Aktivierung des Oct4 Promotors anzeigt.

Mit dem als optimal identifizierten Nanog *gain of function* Modell sollten dann die möglichen Effekte von Nanog in den somatischen Zellen analysiert werden. Hierbei standen Untersuchungen zur Proliferation, Transformation und Reprogrammierung im Mittelpunkt.

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 (Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore (Eschborn) angesetzt. Zur Sterilisation wurden die Lösungen nach dem Ansetzen durch eine 0,2 µm Membran filtriert oder autoklaviert.

2.1.2 Geräte

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)

Hybridisierungssofen

BFD53 Binder GmbH (Tuttlingen)

Inkubator

Heracell Heraeus (Hanau)

Mikroskope

Axiovert 25 Zeiss (Göttingen)

Axiovert 40C Zeiss (Göttingen)

Axiovert 200M Zeiss (Göttingen)

Axioskop2 Zeiss (Göttingen)

pH-Meter

CG840 Schott (Mainz)

Photometer

BioPhotometer Eppendorf (Hamburg)

NanoDrop Peqlab (Erlangen)

Schüttler

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

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

Sonikator

SONOPLUS HD 2070 BANDELIN electronic (Berlin)

Sterile Werkbänke

Herasafe Heraeus (Hanau)

Hera guard HPH 12/95 Heraeus (Hanau)

UV-Transilluminatoren

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

Waagen

LA310S	Sartorius (Göttingen)
BL610	Sartorius (Göttingen)

Zentrifugen

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

2.1.3 Plastikware für die Zellkultur

Zellkulturschalen 15 cm	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturschalen 10 cm	BD Falcon, (Bedford, USA)
Zellkulturschalen 6 cm	BD Falcon, (Bedford, USA)
Zellkulturschalen 3,5 cm	BD Falcon, (Bedford, USA)
6 well Zellkulturplatte	Nunc (Roskilde, Dänemark)
12 well Zellkulturplatte	Nunc (Roskilde, Dänemark)
24 well Zellkulturplatte	Costar (Corning, USA)
96 well Zellkulturplatte	Costar (Corning, USA)
Petrischalen 10 cm	BD Falcon, (Bedford, USA)
Petrischalen 6cm	BD Falcon, (Bedford, USA)
15 ml Plastikröhrchen	Greiner Bio (Frickenhausen)
50 ml Plastikröhrchen	Greiner Bio (Frickenhausen)
Kryotubes	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Zellsieb (40 µm)	BD Falcon, (Bedford, USA)

Elektroporationsküvetten	Peqlab (Erlangen)
Zellschaber	Costar (Corning, USA)
Plastikpipetten (1 ml – 25 ml)	Costar (Corning, USA)
Sterilfilter (0,2 µm)	Whatman (Dassel)

2.1.4 Inhibitoren

PI(3)Kinase Inhibitor LY294002	Merck (Darmstadt)
LIF Inhibitor	Vernallis et al., 1997 (im Labor von Michael Peitz hergestellt)

2.1.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	NEB (Ipswich, USA)
Taq Polymerase	Invitrogen (Carlsbad, USA)
GoTaq Polymerase	Promega (Mannheim)
(beide Polymerasen für analytische PCRs)	
High Fidelity PCR Master Mix (für Klonierungsarbeiten)	Roche (Basel, Schweiz)
M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus, Punkt Mutante	Promega (Mannheim)
Benzonase	Novagen (Darmstadt)
Lysozym	Sigma (München)
T4 DNA Ligase	NEB (Ipswich, USA)
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	Roche (Basel, Schweiz)
RQ1 RNase freie DNase	Promega (Mannheim)

2.1.6 Antikörper

Für Zellfärbungen:

Primäre Antikörper

Anti-Oct4 (Maus IgG, 1:400, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA)

Anti-SSEA-1 (Maus IgM, 1:80, Hybridoma Bank),

Anti-Nanog (Kaninchen IgG, 1:1500, Chemicon-Millipore, Billerica, USA)

Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor 488 (anti-Kaninchen IgG, 1:600, Invitrogen, Carlsbad, USA)

Cy3 (anti-Kaninchen IgG, 1:400, Jackson Immuno Research, West Grove, USA)

Cy3 (anti-Maus IgG 1:400, Jackson Immuno Research, West Grove, USA)

Für Western Blots:

Primäre Antikörper

Anti-Nanog (Kaninchen IgG, 1:2000, Chemicon-Millipore, Billerica, USA)

Anti-p53 (1:2000, Cell Signaling Technology, Danvers, USA)

Anti-*Polyoma Large-T* (anti-Kaninchen, polyklonal 1:5000, Dr. Ogris, Wien, Österreich)

Anti-Aktin (1:1000, Chemicon-Millipore, Billerica, USA)

Sekundäre Antikörper

anti-Kaninchen HRP (1:5000, Cell Signaling Technology, Danvers, USA)

anti-Maus HRP (1:5000, Cell Signaling Technology, Danvers, USA)

2.1.7 Bakterienstämme

DH5a (Gibco BRL, Karlsruhe)

Bakterienstamm für Klonierungen

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

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

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 die Expression von HTNCRE benutzt.

2.1.8 Zell-Linien

NIH 3T3

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

MEF Oct4-GIP

Heterozygote Embryonale Fibroblasten-Zellen, die durch Verpaarung und anschließende Präparation der Föten von Oct4-GIP Mäusen (Yeom et al., 1996) mit Black6 Mäusen (Stamm-Name: C57BL/6J, *The Jackson Laboratory*, Main, USA) gewonnen wurden (Abschnitt 2.5.4).

MEF EQ

Transgene Embryonale Fibroblastenzellen die die Resistensgene Neomycin^r, Hygromycin^r und Puromycin^r exprimieren. Diese Zellen wurden als Fütterzellen für ES Zellen eingesetzt und wurden vor der Verwendung bestrahlt und waren daher mitotisch inaktiv.

SSC (Guan et al., 2006)

Spermatogoniale Stamm Zellen („*spermatogonial stem cells*“, SSC) die aus dem Hoden von adulten Mäusen gewonnen wurden.

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 kodiert für das β -Galaktosidasegen. Nur nach Cre-vermittelter Rekombination, bei der auch ein *loxP*-flankiertes Neomycinresistenzgen ausgeschnitten wird, kann die Expression der β -Galaktosidase stattfinden.

ES Zell-Linien**Oct4-GiP** (Ying et al., 2002; Yeom et al., 1996)

Transgene, hybride ES-Zelllinie (129 5 MF1). Regulatorische Sequenzen des murinen Oct4 Gens kontrollieren in dieser Linie die Expression von *gfp* und *pac^r* (Gen, das Puromycin-Resistenz vermittelt). Nur pluripotente Zellen und Zellen der Keimbahn sind daher positiv für GFP und resistent gegen Puromycin.

E14T (Chambers et al., 2003)

E14T ES Zellen sind Derivate der E14/Tg2a Zellen (Hooper et al., 1987). Sie exprimieren das *Polyoma Large-T* Antigen und eine Neomycin Resistenz von einer integrierten cDNA Expressions Kasette pMGDneo20 (Gassman et al., 1995). Diese Zelllinie ist daher für die Supertransfektion geeignet.

2.1.9 Mauslinien**Oct4-GIP** (Yeom et al., 1996)

Transgene Mauslinie die vom 129Ola Stamm abgeleitet ist. Regulatorische Sequenzen des murinen Oct4 Gens kontrollieren in dieser Linie die Expression von *gfp* und *pac^r* (Gen, das Puromycin-Resistenz vermittelt). Nur pluripotente Zellen und Zellen der Keimbahn sind daher positiv für GFP und resistent gegen Puromycin.

Fellfarbe: weiß

Black 6

C57/Black 6 ist die am weitesten verbreitete Inzucht-Mauslinie. Sie wurde 1921 von C. C. Little gezüchtet und ist homozygot für alle Gen-Loci (Stamm-Name: C57BL/6J, *The Jackson Laboratory*, Main, USA).

Fellfarbe: braun

Scid-beige (*CB17/Icr.Cg-Prkdc^{scid}Lyst^{bg}/Crl*)

Bei dieser Linie handelt es sich um immundefiziente Mäuse, die durch Inzucht gewonnen wurden und die beiden autosomalen rezessiven Mutationen *scid* und *beige* aufweisen. Diese Mauslinie wurde durch Kreuzung der *CB-17-Cg Prkdc^{scid}* und *C57BL/6 Lyst^{bg}* Linien generiert (Charles River Laboratories, Wilmington, USA)

Fellfarbe: weiß

2.2 Molekularbiologie**2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA und PCR Produkten**

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

Für geringe Mengen DNA (3 bis 9 µg):

Mini-Kit (Peqlab, Erlangen)

Mini-Kit (Amersham, Little Chalfont, UK)

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

Für größere Mengen DNA (100 bis 600 µg)

Maxi-Kit (Qiagen, Hilden)

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

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

2.2.2 Enzymatische Hydrolyse von DNA

Die Spaltung der DNA mittels Endonukleasen erfolgte unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Puffer und Temperaturen. Die Menge an Enzym und die Inkubationszeit richteten sich nach der DNA Menge. Der Anteil des Enzyms in 50 Prozent Glycerin betrug maximal 10 Prozent vom gesamten Reaktionsansatz.

2.2.3 Dephosphorylierung von freien DNA Enden

Um die Re-Ligation eines endonukleolytisch gespaltenen Plasmids zu verhindern, wurde dem Reaktionsansatz eine alkalische Phosphatase zugesetzt. Diese entfernt die Phosphatgruppe an den freien 5'-Überhängen des gespaltenen Plasmids. Die *Shrimp*-Alkalische Phosphatase wurde entsprechend den Herstellerangaben mit 1 U / 50 ng DNA eingesetzt.

2.2.4 Ligation von DNA

Bei der Ligation wurden unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung kompatible DNA Enden miteinander verbunden. Es wurde die T4 DNA Ligase (NEB, Ipswich, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Die Inkubationsdauer betrug 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur oder 16 Stunden bei 16 °C.

2.2.5 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Kompetente Bakterien (Chung et al., 1989; Inoue et al., 1990) wurden für 20 Minuten auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde ein Aliquot von 100 µl entnommen. Die zu transformierende DNA (≥ 100 ng) wurde in einem Volumen von 1 – 5 µl zu den kompetenten Bakterien gegeben. Der Ansatz wurde für 5 bis 30 Minuten auf Eis stehen gelassen, dann erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden. Nach 2 Minuten Inkubation auf Eis wurden 800 µl SOC-Medium dazu pipettiert und der Ansatz für 20 bis 60 Minuten auf einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg) bei 37 °C geschüttelt (600 U/min). Dann wurden die Bakterien in einer Tischzentrifuge (3 Minuten, 3000 U/min) pelletiert und 800 µl des

Überstands abpipettiert. Im verbliebenen Medium wurden die Bakterien vorsichtig resuspendiert. Diese konnten entweder auf einer LB-Platte ausgestrichen werden oder zum Animpfen eines Flüssigbakterienmediums verwendet werden, jeweils mit dem entsprechenden Antibiotikum.

SOC-Medium:

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

2.2.6 Phenol-Chloroform-Extraktion

Mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion konnten Protein-Verunreinigungen aus einer DNA Lösung entfernt werden. Man mischte zuerst die wässrige DNA-Lösung 1:1 mit Roti-Phenol, beschleunigte die Phasentrennung durch Zentrifugation und verwarf die untere, phenolhaltige Phase. Der Schritt wurde wiederholt und die wässrige obere Phase, in der sich die DNA befand, in ein neues Gefäß überführt. Um Phenolreste aus der Lösung zu entfernen, wurde sie mit einem Volumen Chloroform gut gemischt und abzentrifugiert. Die untere Chloroformphase wurde verworfen und der Schritt wiederholt.

2.2.7 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.

Agaroseblock zu isolieren, wurde das Aufreinigungskit *QIAquick Gel Extraktion Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.10 DNA-Sequenzierung

Die während der Arbeit genutzte automatische DNA-Sequenzierung beruht auf dem Prinzip der Abbruchmethode durch fluoreszenzmarkierte Nukleotid-Analoga (ddNTPs).

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 Nukleotidanalogen 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 einer Sequenziermaschine 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 150–500 ng hochreine DNA und Primer (100 pM) in einem Volumen von 6 µl vorgelegt.

2.2.11 Bestimmung der Proteinkonzentration 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 Minuten Inkubation bei 595 nm bestimmt wurde. Die Probenmenge wurde so gewählt, dass die OD₅₉₅ zwischen 0,1 und 0,2 lag. Daraufhin wurde der Wert mit der Anfangssteigung der Eichkurve verrechnet und so die Proteinkonzentration der Ausgangslösung bestimmt.

2.2.12 SDS-PAA-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) werden die aufzutrennenden Proteine zunächst mit SDS denaturiert und Disulfidbrücken mit β -Mercaptoethanol reduziert. Das SDS des Probenpuffers 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 porösem Polyacrylamidgel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt.

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden zwei unterschiedlich vernetzte Polyacrylamidgele mit unterschiedlichen pH-Werten übereinander geschichtet. Das obere, weitmaschige Sammelgel dient zur Konzentrierung der Proteine. Im darunterliegenden 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 wurde auch zur Quantifizierung der Expression der rekombinanten Proteine und zur Abschätzung der Reinheit von Proteinpräparationen verwendet.

2 x Probenpuffer:	6 % SDS
(Lämmli-puffer)	20 % Glycerin
	1 Spatelspitze Bromphenolblau
	6 % β -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 Polymerisieren 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 Lauf-Puffer überschichtet. Anschließend wurden die im Probenpuffer für 3–5 Minuten bei 96 °C aufgekochten und zentrifugierten Proteinproben in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese wurde bei 200 V für 45 Minuten mit einer *Mini-PROTEAN III* Kammer (Bio-Rad, München) durchgeführt.

Sammelgel (2 ml):	1,4 ml H ₂ 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%, 5 ml):	1,7 ml H ₂ 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 Laufpuffer (1 l):	30,3 g Tris
	144,2 g Glycin
	10 g SDS

Anfärben von Proteinen in SDS-Gelen

Die SDS-Gele wurden 3 x 5 Minuten in destilliertem H₂O gewaschen um das SDS zu entfernen. Anschließend wurde das Gel für mindestens eine Stunde oder über Nacht in einer Coomassie-Färbelösung (*Gel Code Blue Stain Reagent*, Pierce, Rockford, USA) behandelt. Zum Entfärben wurde das Gel für mindestens eine Stunde oder über Nacht mit destilliertem H₂O inkubiert. Mit dem *Gel Dry System* (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurde das Gel luftgetrocknet und konserviert.

2.2.13 Western-Blot mit Antikörperfärbung

Die zu analysierende Proteinprobe wurde per SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer semi-dry blot Apparatur (Biometra, Göttingen) auf eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) transferiert. Dazu schichtet man drei in Western-Transferpuffer getränkte Filterpapiere (Whatman, Maidstone, UK) 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 ($1,5 \text{ mA/cm}^2$ Gel). Die Proteine wandern im elektrischen Feld zur Anode werden auf die Membran transferiert. Die Dauer des Transfers lag zwischen 15 und 35 Minuten, anschließend wurde die Membran direkt weiterverwendet. Um die unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern, wurde die NC-Membran für 45 Minuten bei Raumtemperatur in Blockierlösung inkubiert. Daraufhin wurde der primäre Antikörper für 45 Minuten bei Raumtemperatur zugegeben. Um ungebundene primäre Antikörper zu entfernen, wurde dreimal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Dann wurde der Blot mit dem zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörper für 30 Minuten inkubiert und anschließend dreimal mit TBS-T und einmal mit TBS für 5 Minuten gewaschen. Durch die Peroxidase-Aktivität des sekundären Antikörpers kann man das Signal über Chemolumineszenz amplifizieren. Dazu wurde das *SuperSignal West Pico* Chemolumineszenz Substrat (Pierce, Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei schwachen Signalen wurde für eine sensitivere Detektion das Substrat *SuperSignal West Femto* (Pierce, Rockford, USA) benutzt. Die Signale wurden mit der CCD-Kamera eines ChemiDoc XRS Systems (Bio-Rad, München) mit der QuantityOne (Version 4.5.2, Bio-Rad, München) Software aufgenommen.

Western-Transferpuffer : 5 % (v/v) 10 x Laemmlipuffer
 10 % (v/v) Methanol
 mit H₂O auffüllen

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

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

TBS-T-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 Antikörper an Proteinen zu testen, ist es möglich vor der Inkubation mit einem zweiten primären Antikörper den ersten primären Antikörper zu entfernen (Strippen der Membran). Das Entfernen des ersten primären Antikörpers ist notwendig, da dieser die Bindung eines weiteren Antikörpers verhindern kann. Man wäscht zuerst die Membran kurz in PBS, inkubiert sie dann für 30 Minuten bei 50 °C unter gelegentlichem Schwenken in einem Stripping-Puffer. Danach wird die Membran zweimal in großen Volumina PBS-T und einmal in PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend kann die Membran wie nach einem Proteintransfer behandelt werden.

Stripping-Puffer: 2 % SDS
 62,5 mM Tris-Cl, pH 6,7
 frisch zugeben:
 100 mM β -Mercaptoethanol

PBS-T PBS
 0,05 % (v/v) Tween 20

2.2.14 Dot Blot

Zum Angleichen der Konzentrationen von Nanog-TAT und Nanog Δ HD in Zellkulturmedien wurde ein *Dot Blot* durchgeführt. Jeweils 300 μ l der aufgereinigten Proteine in Zellkulturmedium (Abschnitt 2.3.6) wurden mit derselben Menge 2 x SDS Proben-Puffer gemischt und bei 96°C für 3 Minuten inkubiert. Ausgehend von diesen Lösungen wurden mit

1 x SDS Proben-Puffer verschiedenen Verdünnungen angesetzt und diese erneut bei 96 °C für eine Minute erhitzt. Nach Zentrifugation wurde je 1 µl des Überstandes dieser Verdünnungen auf eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) getropft, die zuvor in TBS-T inkubiert wurde. Die Tropfen wurden für 2 bis 3 Minuten getrocknet. Anschließend wurde die Membran in TBS-T gewaschen und mit 5 % Milchpulver in TBS-T 30 Minuten blockiert. Dann wurde sie wie bei einem Western-Blot (Abschnitt 2.2.13) mit anti-Nanog (1:5000, Chemicon-Millipore, Billerica, USA) als primären Antikörper und *anti*-Kaninchen HRP (1:5000, Cell Signaling Technology, Danvers, USA) als sekundären Antikörper behandelt. Nach der Detektion konnte anhand der Signalstärken der einzelnen Verdünnungen beobachtet werden, ob beide Proteine in der gleichen Konzentration vorliegen. War dies nicht der Fall wurde das höher konzentrierte Protein entsprechend verdünnt. Trägt man zusätzlich eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen von Nanog-TAT auf, kann auch die absolute Konzentration von Nanog-TAT im Zellkulturmedium abgeschätzt werden. Dies wurde im Labor von Bernhard Müntz vorgenommen.

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

2.2.15 Typing PCR

Um sicherzustellen, dass die Oct4-GIP Mäuse und die aus diesen gewonnenen MEF Oct4-GIP Zellen das OCT4-GIP Reporterkonstrukt tragen, wurde eine *typing PCR* mit entsprechenden Primern durchgeführt. Die genomische DNA wurde bei den Oct4-GIP Mäusen aus den Schwanzspitzen und bei den MEFs direkt aus den Zellen gewonnen. Es wurde das *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. 250 ng der so präparierten DNA wurden in einer PCR eingesetzt, bei der nur in Anwesenheit des Oct4-GIP Reporterkonstruktes eine Bande bei 703 bp entsteht.

PCR Bedingungen	95°C	3 Minuten	35 Zyklen
	94°C	15 Sekunden	
	60°C	12 Sekunden	
	72°C	1 Minute	
	72°C	10 Minuten	
	4°C	Pause	

Primer

Oct4GIP_Seq	5'-ACAGGCAGATAGCGCTCGCCTCAGTT
Oct4GIP_Rev	5'-CCGTCCTCGATGTTGTGGCGGATCTT

(Primersequenz stammt von Dr. Nichols, Universität Edinburgh)

2.2.16 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die RNA aus Zellen wurde mit Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach Herstellerangaben isoliert. Mögliche DNA Kontaminationen wurden durch die Behandlung mit DNase (2 Stunden, 37 °C, Promega, Mannheim) entfernt. Nach der DNase Behandlung wurde die RNA erneut mit Trizol gefällt. Die RNA Konzentration wurde bestimmt (Abschnitt 2.2.8) und gegebenenfalls angeglichen. Anschließend wurde die RNA mit dem Enzym M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus, Punkt Mutante (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben zu cDNA umgeschrieben; die Synthese-Temperatur wurde von 42 °C auf 48 °C angehoben. Die PCR Reaktion wurden mit der GoTaq Polymerase (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Verwendete Primer

BTG2, F:	5'-GATGGCTCCATCTGTGTCCT	(Piestun et al.,
BTG2, R:	5'-TATACGGTGGCCTGTTGTCA	2006)
FGFR1, F:	5'-ATGGTTGACCGTTCTGGAAG	(Piestun et al.,
FGFR1, R:	5'-GGAAGTCGCTCTTCTTGGTG	2006)
GAPDH-F:	5'-ACGACCCCTTCATTGACCTCAACT	
GAPDH-R:	5'-ATATTTCTCGTGGTTCACACCCAT	T _m : 55 °C
GATA6-F:	5'- GCAATGCATGCGGTCTCTAC	(Hamazaki et al.,
GATA6-R:	5'- CTCTTGGTAGCACCAGCTCA	2004)

JUN-B, F:	5'-ACGGAGGGAGAGAAAAGCTC	(Piestun et al.,
JUN-B, R:	5'-TGTTCCATTTTCGTGCACAT	2006)
Nanog-F:	5'-AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG	(Hamazaki et al.,
Nanog-R:	5'-CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG	2004)
Oct4-F:	5'-AGTGGAAAGCAACTCAGAGGG	
Oct4-R:	5'-GGTTCTCATTGTTGTCGGCTT	T _m : 52 °C
P53, F:	5'-ACAGGACCCTGTCACCGAGACC	(Vaslet et al.,
P53, R:	5'-GACCTCCGTCATGTGCTGTGAC	2002)
Rex-1-F:	5'-CGTGTAACATACACCATCCG	(Hamazaki et al.,
Rex-1-R:	5'-GAAATCCTCTTCCAGAATGG	2004)
Sox2, F:	5'-AGATGCACAACCTCGGAGATCAG	
Sox2, R:	5'-GAAGGAGCACCCGGATTATAAATA	T _m : 58,7 °C
TTR-F:	5'-CTCACCACAGATGAGAAG	(Hamazaki et al.,
TTR-R:	5'-GGCTGAGTCTCTCAATTC	2004)

2.2.17 Klonierung der *Polyoma*-basierten Vektoren

pBO1

Für die Klonierung des pBO1-Plasmids wurde aus dem publizierten Vektor pPyCAG (Chambers et al., 2003) mit Not1 und Cla1 das *IRE5 pac'* Fragment herausgeschnitten und durch ein Not1 Cla1 geschnittenes *IRE5 hygro'* Fragment aus pTriEx-Hygro (Novagen, Darmstadt) ersetzt. Der resultierende Vektor wurde als pCAG-IH bezeichnet. Im nächsten Schritt wurde ein Fragment zwischen zwei *EcoR1* Schnittstellen entfernt (zwischen *CAG* Promotor und *IRE5*), dabei wurde ein störendes ATG entfernt und der Vektor anschließend religiert (pCAG-IH – ATG).

Aus dem Vektor CHG-DR (Haupt, 2004) wurde zunächst mit BamH1 und Sse83871 ein Fragment entfernt und durch ein Neomycin-Resistenzgen (PCR Produkt mit entsprechenden Überhängen für die Schnittstellen) ersetzt. Es resultierte eine *loxP* flankierte *Neomycin Stopp Kasette*. Diese wurde mit Pac1 und Asc1 ausgeschnitten, gebluntet und mit dem Xho1 geschnittenen und geblunteten pCAG-IH – ATG ligiert. Es resultierte der Vektor pCAG-NSIH. Dieser Vektor wurde dann mit Not1 (zwischen Stopp und *IRE5*) aufgeschnitten, so dass das BOLigo1 DNA Oligomer eingefügt werden konnte. Dieses enthält mit *Not1* und *Sma1* zwei Schnittstellen, die sonst nicht im Vektor vorkommen und daher zum Einbringen

von Kandidatengenegen geeignet sind. Diese Schnittstellen sind zusätzlich von *attB*- Sequenzen für die *Gateway*-Rekombination flankiert. Der Vektor wurde als pBO1(-FRT) bezeichnet. Die fehlenden *FRT* Sequenzen wurden in Zusammenarbeit mit Katrin Hesse eingefügt (Hesse, 2007). Es resultiert der fertige Vektor pBO1, der als Variante auch mit Puromycin statt Neomycin Resistenz benutzt wurde.

BOligo1 DNA Oligomer Sequenz:

5'-GGCCTTAACCTAATTAAGCATAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAATAGCG
GCCGCATTACCCGGGATTAACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTATTAGGCC-3'

pBO1-Nanog

Mit einer präparativen PCR wurde die cDNA von Maus Nanog (von S. Yamanaka zur Verfügung gestellt) mit *Not1* und *EcoRV* Schnittstellen amplifiziert, entsprechend geschnitten und gerichtet in pBO1 kloniert.

pBO1-hcRed

Mit einer präparativen PCR wurde die cDNA hcRed mit *Not1* und *EcoRV* Schnittstellen amplifiziert, entsprechend geschnitten und gerichtet in pBO1 kloniert.

Alle Resistensgene, Kandidatengene und die *IRES* Sequenz wurden mit entsprechenden Primern sequenziert (ZMMK Köln, Abschnitt 2.2.10). Es wurden nur Klone ohne Mutation für weitere Experimente eingesetzt.

Verwendete Sequenzierungsprimer:

SeqDW1 Hygro	5'- CATTTCCTTGCTAGG
SeqDW2 HygroIRES	5'- ACGCACT GACGGTGTC
SeqDW3 Oligo-down	5'- G AATTCCTCC TCAGG
SeqDW4 Oligo-up	5'- ATGGTGAT GGTGATGG
SeqDW5 Oligo-down	5'- CTGGTGTGGCCAACTGG
SeqDW6 Oligo-up	5'- TTCTGGCTGGCTTGCACG
SeqDW7 Oligo-down	5'- TCTGGATC TGACATGG
SeqDW8 Oligo-down	5'- GAGATCGACGGTATCG

Gateway-Klonierung

Bei dem *Gateway*-System (Invitrogen, Carlsbad USA) handelt es sich um eine effiziente Klonierungstechnologie, die auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Phagen λ beruht.

Beim pBO1 Vektor sind die Kandidatengene von *attB*-Rekombinationsstellen flankiert. Diese bestehen aus 25 Basenpaaren und ermöglichen die effiziente Umklonierung dieser Gene. Dies ist besonders für den geplanten Einsatz dieses Vektorsystems bei einem *DNA Library Screen* nützlich.

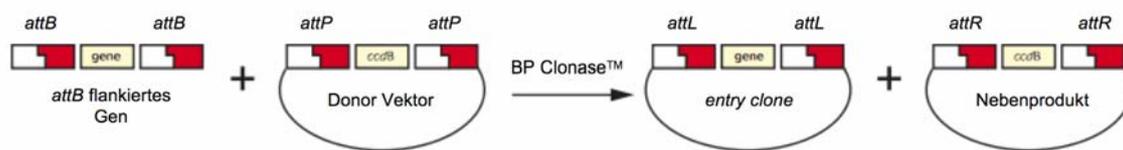


Abbildung 2.1: Überblick über die Gateway Rekombination

Ein *attB*-flankiertes Gen (z.B. *hcRed* bei pBO1-Red) kann effizient in einen Donor Vektor mit *attP*-Sequenzen rekombiniert werden. Diese Rekombination ist gerichtet und wird von der BP Clonase[™] vermittelt. Es resultieren rekombinierte Klone (*entry clone*) bei denen das Ausgangs-Gen von *attL*-Sequenzen flankiert ist und Nebenprodukte die aufgrund des *ccdB*-Gens in bakteriellen Klonierungsstämmen toxisch sind.

Nach Gateway Broschüre (2002, Invitrogen, Carlsbad, USA)

Bei der Rekombination von *attB*-Sequenzen (pBO1) mit *attP*-Sequenzen (*Donor*-Vektor) wird das im Donor-Vektor enthaltenen *ccdB*-Gen gegen das Gen aus pBO1 (hier HcRed) ausgetauscht. Das *ccdB*-Gen codiert ein für herkömmliche Klonierungsstämmen 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, dies ist die Grundlage für eine hohe Klonierungseffizienz. Die Klone sind bis zu 99 Prozent positiv für eine erfolgreiche Integration des Gens von Interesse.

Bei einem Test mit pBO1-Red und pDONR[™] (Invitrogen, Carlsbad, USA) waren nach der BP- Reaktion (nach Händlerangaben) und anschließender Transformation mit Kanamycin-Selektion auf LB-Platten 12 von 12 untersuchten Klonen positiv.

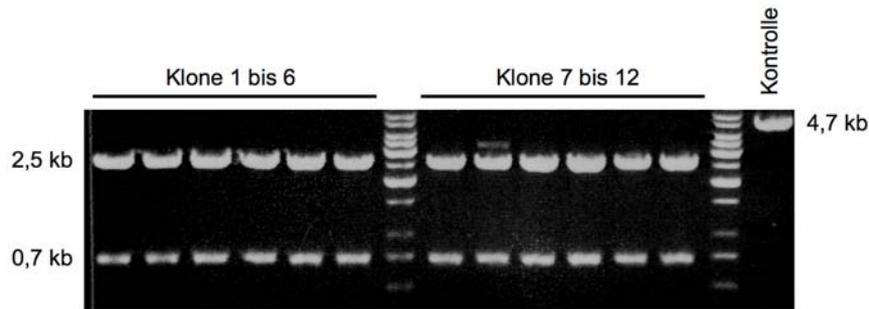


Abbildung 2.2: Gateway-Rekombination mit pBO1-Red

Nach der BP-Reaktion mit pBO1-Red und pDONRTM wurde eine Transformation durchgeführt und auf LB Platten mit Kanamycin ausplattiert. 12 Kolonien wurden gepickt, die DNA präpariert und zur Analyse mit EcoRV und NaeI verdaut. Als Kontrolle wurde pDONRTM DNA analog verdaut, dies entspricht dem nicht rekombinierten Vektor. Errechnete Bandengrößen: rekombinierter Vektor: 1x704 bp + 1x2556 bp, nicht rekombinierter Vektor: 1x4762 bp

2.3 Präparation rekombinanter Proteine

2.3.1 Proteinexpression

HTNCre (Peitz et al., 2002; Peitz et al., 2007)

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

Von einer Glycerin-Kultur oder von einer Agarplatte wurden 150 ml LB-Medium mit einem Prozent 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 einem Prozent Glukose, 100 µg/ml Ampicillin (und gegebenenfalls 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 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 1,5 wurde die Protein-Expression mit 0,5 mM IPTG induziert. 2 Stunden nach der Induktion wurden die Bakterien bei 4 °C mit 6000 g für 15 Minuten abzentrifugiert, der Überstand wurde vollständig abgegossen, das Pellet im Trockeneis/Ethanol-Bad eingefroren (10 Minuten) und bei – 20 °C gelagert.

Nanog-Proteine (*Nanog-TAT und Nanog Δ H Δ D*; Peitz, 2007)

Zur bakteriellen Überexpression, wurden Übernackulturen (LB mit 0.5 Prozent Glucose und 50 μ g/ml Carbenicillin) mit frisch transformierten BL21 (DE3) GOLD Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) angeimpft und über Nacht bei 30 °C im Schikanekolben kultiviert. Am nächsten Tag wurden Expressionskulturen (TB mit 0,5 Prozent Glucose und 100 μ g/ml Ampicillin) 1:50 mit den Übernackulturen angeimpft, bei 37 °C im Schikanekolben kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von 1,5 mit 0,5 mM IPTG für 1 Stunde induziert. Die Pellets wurden eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

2.3.2 Native Affinitäts-Chromatografie von HTN Δ Cre (Peitz et al., 2002; Peitz et al., 2007)

Das tiefgefrorene Bakterienpellet wurde in 10 ml Phosphatpuffer (PTB) pro Liter Expressionskultur resuspendiert. Zu dieser homogenen Suspension wurde *Lysozym* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mit einer finalen Konzentration von 1 mg/ml gegeben. Die Lösung wurde für 15 – 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer gerührt bis sie viskos wurde. Zur Viskositätssenkung wurde die Endonuklease *Benzonase* (Novagen, Darmstadt) im Verhältnis 1:1000 (v/v) hinzu pipetiert und für 15 – 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde auf Eis gekühlt und sonifiziert (1,5 Minuten mit einem Zyklus von 5 Sekunden bei 45 % Leistung). Danach wurde ein gleiches Volumen an TSB (Tartrat Salz Puffer) hinzu gegeben und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Der Puffer verhindert, dass das HTN Δ Cre später im Glycerinstock präzipitiert. Anschließend wurde das Zelllysate in einer Ultrazentrifuge (SS34 Rotor, Kendro, Hanau) für 30 Minuten mit 30.000 g bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig in 50-ml Plastikgefäße überführt und mit 2 ml Nickel-Agarose-Matrix (Ni-NTA, Qiagen, Hilden) pro Liter Expressionskultur versetzt und für 30 – 60 Minuten 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, München) gegeben, deren Fritte die Nickel-Agarose-Matrix zurückhält. Es folgten zwei Waschschrte mit Waschpuffer in einem fünffachen Volumen des Säulenbetts. Eluiert wurde das HTN Δ Cre 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.

<i>10 x PTB (Phosphatpuffer):</i>	<i>Waschpuffer:</i>
500 mM Na ₂ HPO ₄	500 mM NaCl
50 mM Tris	1 x PTB
pH 7.8	10 mM Imidazol
<i>TSB (Tartrat-Puffer):</i>	<i>Elutionspuffer:</i>
2 M Natrium-Tartrat	500 mM NaCl
1 x PTB	1 x PTB
20 mM Imidazol	250 mM Imidazol
<i>Lysepuffer (10 x PTB)</i>	<i>NaCl- Puffer:</i>
500 mM Na ₂ HPO ₄	2 M NaCl
50 mM Tris	1 x PTB (s. o.)
pH 7.8	20 mM Imidazol
<i>Waschpuffer:</i>	<i>Elutionspuffer:</i>
500 mM NaCl	750 mM NaCl
1 x PTB	1 x PTB
10 m Imidazol	250mM Imidazol

2.3.3 Native Affinitäts-Chromatografie von Nanog-Proteinen (Peitz, 2007)

Zur Aufreinigung wurden die eingefrorenen Bakterien von einem Liter Expressionskultur in 20 ml Lysepuffer aufgenommen. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Nach vollständigem Resuspendieren wurde die Suspension für den Zellaufschluss 20 Minuten mit *Lysozym* (1 mg/ml) und anschließend zur Senkung der Viskosität mit *Benzonase* (Novagen, Darmstadt) behandelt. Unlösliches Material im Lysat wurde durch einen Zentrifugationsschritt (35.000 g, 30 Minuten, 4 °C) entfernt. Der lösliche Überstand wurde dann 1 Stunde mit 1 ml Ni-NTA Suspension (Qiagen, Hilden) pro Liter initialer Bakterienkultur im Überkopfröller inkubiert. Das Säulenmaterial wurde in eine Plastiksäule (Econo-Pac, Bio-Rad, München) gegossen und zweimal mit 6 Bettvolumina Waschpuffer gewaschen. Zum Eluieren des Proteins wurden 8 Bettvolumina Elutionspuffer auf die Säule gegeben.

Lysepuffer:

2 mM Imidazol
500 mM NaCl
50 mM Na₂HPO₄,
5 mM Tris, pH 7,8

Waschpuffer:

20 mM Imidazol
500 mM NaCl
50 mM Na₂HPO₄
5 mM Tris, pH 7,8

Elutionspuffer:

250 mM Imidazol
500 mM NaCl
50 mM Na₂HPO₄
5 mM Tris, pH 7,8

2.3.4 Dialyse von HTNCRE in Glycerinpuffer (Peitz et al., 2007)

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 Wasser und dann mit Dialysemedium durchgespült. Das zu dialysierende Volumen wurde in den Schlauch gefüllt und dieser in ein Becherglas mit Dialysemedium gegeben. Dialysiert wurde gegen einen 50 – 100-fachen Überschuss an Dialysemedium. Dabei wurde zweimal nach 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 Minuten bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert, um den Elutionspuffer von Präzipitaten zu befreien. Anschließend wurde das Protein 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 prozentigen 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. Der Glycerinstock wurde bei – 20 °C gelagert. Die Lösung wurde zur Transduktion direkt ins entsprechende Zellkultur-Medium gegeben und dann sterilfiltriert.

Die Funktionalität von HTNCRE wurde mit CV1-5B Zellen (Kellendonk et al., 1996; Abschnitt 2.1.8) überprüft, die nach Cre-vermittelter Rekombination β -Galaktosidase exprimieren (Abschnitt 2.4.3).

Hochsalzpuffer:

600 mM NaCl
20 mM HEPES
pH 7,4

Glycerinpuffer:

500 mM NaCl
50 % (v/v) Glycerin
20 mM HEPES
pH 7,4

2.3.5 *In vitro* Cre-Rekombination

Zur funktionellen Überprüfung von aufgereinigtem HTNCRE Protein und zur Überprüfung neu eingebrachter *loxP* Sequenzen wurden verschiedene Plasmide *in vitro* mit HTNCRE rekombiniert. Dabei wurde die Plasmid-DNA zunächst linearisiert und nach Hitzeinaktivierung des entsprechenden Restriktionsenzym aufgereinigt (*QIAquick PCR Purification Kit*, Qiagen, Hilden).

Für die *in vitro* Rekombination wurden pro Ansatz 2 µg DNA mit 400 ng HTNCRE in 1 x Cre Puffer (aus 10 x Cre Puffer, Novagen, Darmstadt) in 20 µl Gesamtvolumen bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 bis 30 Minuten) durch Zugabe von 20 µl Phenol abgestoppt. Nach Zentrifugation (5 Minuten, 12.000 g, Raumtemperatur) konnte die DNA in der wässrigen oberen Phase direkt mit Laufpuffer gemischt werden (1:10) und zur Auswertung auf einem Agarosegel aufgetragen werden (Abschnitt 2.2.7).

1x Cre Puffer:

50 mM Tris-HCl pH 7.5
33 mM NaCl
10 mM MgCl₂

2.3.6 Dialyse von Nanog Proteinen und Herstellung des Nanog Transduktionsmediums

(Peitz, 2007)

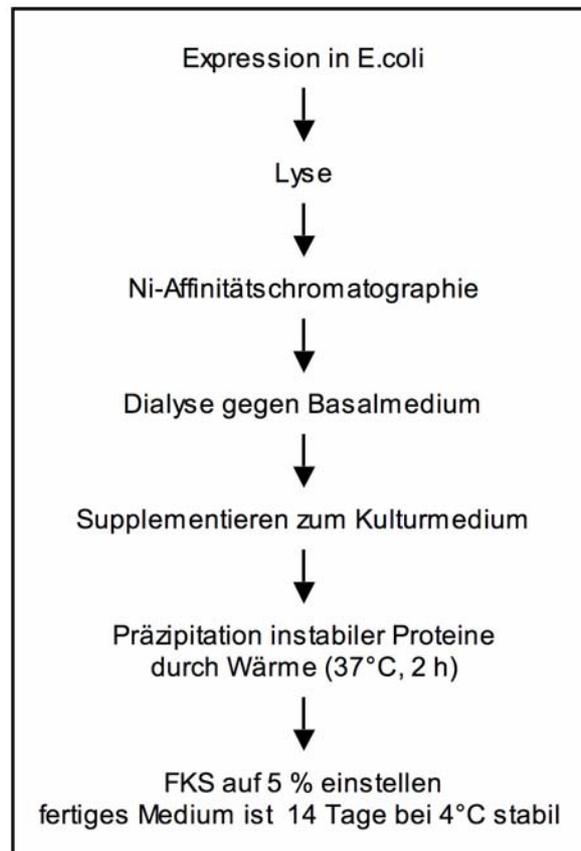


Abbildung 2.3: Ablauf der Herstellung des Mediums zur Nanog-Protein-Transduktion

Die eluierte Fraktion mit Nanog-TAT-Protein oder Nanog Δ HDL-Protein wurde zweimal für 1 Stunde gegen PBS und anschließend über Nacht gegen K.O.-DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA) dialysiert. Nach der Dialyse wurde das Dialysat zentrifugiert (30 Minuten, 6000 g, 4 °C) und sterilfiltriert (0,2 μ m). Anschließend wurde es im Verhältnis 1:1 mit zweifach-supplementierten Medium (Zusammensetzung: s. u.) gemischt und für 2 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, um die maximal mögliche Nanog-TAT-Konzentration bei 37 °C einzustellen. Das Medium wurde dann wieder zentrifugiert und sterilfiltriert um es von Präzipitaten zu befreien. Schließlich wurde die FKS-Konzentration auf 5 Prozent eingestellt. Das so fertig gestellte Medium hatte eine Konzentration von ca. 100 nM Nanog-TAT (Diplom-Biologe Bernhard Müntz, persönliche Mitteilung; Abschnitt 2.2.14). Das entsprechende Medium mit Nanog Δ HDL war höher konzentriert (ca. 900 nM Nanog Δ HDL, Bernhard Müntz, persönliche Mitteilung) und wurde daher entsprechend verdünnt und

ebenfalls auf 100 nM eingestellt (Abschnitt 2.2.14). Beide Medien wurden bei 4 °C gelagert und für maximal zwei Wochen verwendet.

Zweifach-supplementiertes Medium (100 ml):

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

2.4 Immunhistochemie und Zell-Färbungen

2.4.1 Immunhistochemie

Für Immunfärbungen wurden Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit *Blocking-Puffer* inkubiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Es folgte die Behandlung mit der Erst-Antikörperlösung bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 1 bis 2 Stunden abgedunkelt bei Raumtemperatur mit der Zweit-Antikörperlösung inkubiert. Bei Bedarf folgte eine 5 minütige Behandlung mit DAPI (1:1000 in PBS). Nach erneutem Waschen der Zellen mit PBS konnten sie mit Mowiol eingedeckelt werden. Sie konnten nun direkt unter dem Mikroskop beobachtet werden oder bei 4 °C abgedunkelt gelagert werden.

Blocking-Puffer

- 10 % FKS
- 0,1 % Triton
- 1x PBS

Erst-Antikörperlösung

- 5 % FKS
- 0,1% Triton
- 1x PBS
- Erst-Antikörper (Abschnitt 2.1.6)

Zweit-Antikörperlösung

5 % FKS

3 % NRS

0,1 % Triton

1x PBS

Zweit-Antikörper (Abschnitt 2.1.6)

2.4.2 Alkalische Phosphatase-Aktivität

Zum Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität wurden Zellen wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben fixiert und anschließend mit dem *Alkaline Phosphatase Substrate Kit III* (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) behandelt (erzeugt ein blaues Reaktionsprodukt). Das Kit wurde nach Herstellerangaben benutzt, aber der Färbelösung wurde zur Reduzierung der Oberflächenspannung 0,1 % Triton beigemischt.

2.4.3 X-Gal-Färbung

Die β -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- β -D-Galaktosid) zu einem blauen Farbstoff um, der in den Zellen leicht zu erkennen ist.

In der Vorliegenden Arbeit wurde die X-Gal-Färbung zur Qualitätskontrolle für die Cre-Aufreinigung verwendet. Es wurden Reporterzellen verwendet, die nur nach erfolgreicher Cre-Rekombination eine Expression der β -Galaktosidase aufweisen (Kellendonk et al., 1996; Abschnitt 2.1.8)

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

<i>X-Gal-Färbelösung:</i>	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 Fibroblasten, NIH 3T3 Zellen und murine, embryonale Fibroblasten (MEFs) wurden standardmäßig in folgendem Medium kultiviert: DMEM (high glucose) mit 10 Prozent FKS, 1 Prozent nicht-essentiellen Aminosäuren, Natrium-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin. Die Zellen wurden alle 3 – 7 Tage passagiert und alle 2 Tage das Medium gewechselt. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen mit in einer Mischung aus 90 Prozent FKS mit 10 Prozent DMSO versetzt und langsam in einer Styropor-Box eingefroren (bei – 80 °C oder – 180 °C).

NIH 3T3 Zellen und MEFs wurden für die Nanog Protein-Transduktion in Nanog-TAT Transduktionsmedium (Abschnitt 2.3.6) kultiviert.

2.5.2 Murine embryonalen Stammzellen

Embryonale Stammzellen der Maus wurden in mit Gelatine beschichteten Zellkulturschalen oder in Zellkulturschalen mit MEFs kultiviert. Die Kultur-Medien hatten folgende Zusammensetzung: Basalmedium mit 15 Prozent FKS, 1 Prozent nicht-essentielle Aminosäuren, Natrium-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin und 100 μ M β -Mercaptoethanol und 1000 U/ml LIF (Chemicon-Millipore, Billerica, USA) oder LIF Inhibitor (LI, 1:500). Als Basalmedium diente DMEM (*high glucose*) (Invitrogen, Carlsbad, USA). Für serumreduzierte Kulturen (bei Cre Protein-Transduktion) wurde *Advanced* DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit 2 bis 5 Prozent FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 μ M β -Mercaptoethanol und 1000 U/ml LIF oder LIF Inhibitor (LI, 1:500) genutzt.

Die Zellen wurden alle 2 – 4 Tage mit Trypsin oder Trypsin-ähnlichem Enzym (TrypLE, Invitrogen, Carlsbad, USA) abgelöst, vereinzelt und auf neue Kulturplatten ausgesät. Zur

Kryokonservierung wurden die Zellen mit in einer Mischung aus 90 Prozent FKS mit 10 Prozent DMSO versetzt und langsam in einer Styropor-Box eingefroren (bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.5.3 SSC-Zellen

SSC-Zellen wurden wie murine embryonalen Stammzellen kultiviert.

2.5.4 Feederpräparation

Zur Gewinnung von embryonalen Fibroblasten mit Oct4-GIP Reporterkonstrukt wurde in Zusammenarbeit mit Anke Leinhaas eine *Feederpräparation* durchgeführt. Es wurden Bruce4 Mäuse mit Oct4-GIP Mäusen verpaart. An Tag 14 wurde ein schwangeres Weibchen mit CO_2 getötet und in 70 % Ethanol desinfiziert. Nach dem Aufschneiden der Bauchdecke wurde der Uterus mit den Embryonen entfernt und in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt. An einer horizontalen Sterilbank wurde der Uterus in eine Petrischale mit PBS transferiert. Nun konnten die Embryonen vorsichtig einzeln aus dem Uterus entfernt werden und in eine Petrischale mit frischem PBS gegeben werden (hier 14 Embryonen). Der Kopf und die erkennbaren inneren Organe (Leber, Herzball) wurden entfernt. Anschließend wurden die Embryonen erneut in einer Petrischale mit frischem PBS gewaschen. In einer Petrischale ohne PBS wurden die Embryonen dann mit einer Schere zerkleinert. Die Gewebestücke wurden dann in 50 ml 1,5 x Trypsin aufgenommen und in einem Erlenmeyerkolben mit sterilisierten Glaskügelchen (4 bis 5 mm Durchmesser) in einem Zellkulturinkubator vorsichtig bei 37°C gerührt. Nach 30 Minuten wurden 100 ml EF Medium zugegeben und gesamte Suspension durch ein Zellsieb (40 μm , BD Falcon, Bedford, USA) gespült und in Petrischalen aufgefangen. Anschließend wurde die Suspension gleichmäßig auf 50 ml Plastikröhrchen verteilt und die Zellen gezählt. Das Medium wurde nach Zentrifugation (200 g, 5 Minuten, 4°C) entfernt und die Zellen in frischem EF Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann in diesem Medium auf 15 cm Zellkulturschalen verteilt (5 x 10^6 Zellen / Schale). Nach 3 Tagen wurden die Zellen als P0 Oct4-GIP MEFs, wie bei 2.5.1 beschrieben, eingefroren. Mit einer PCR wurde zuvor bestätigt, dass die Zellen das OCT4-GIP Reporterkonstrukt tragen (Abschnitt 2.2.15).

2.5.5 Elektroporation von NIH 3T3 Zellen und ES-Zellen

Zur stabilen Transfektion von NIH 3T3 Zellen und von ES-Zellen wurden pro Ansatz 20 - 40 µg linearisierte und aufgereinigte Plasmid DNA in 1 ml PBS steril resuspendiert. Die Zellen wurden mit Trypsin oder TrypleExpress (Invitrogen, Carlsbad, USA) von den Zellkulturschalen abgelöst und nach Medienzugabe mechanisch vereinzelt und gezählt. Pro Elektroporationsansatz wurden $1,0 \times 10^7$ Zellen in einem 15-ml Plastikröhrchen abzentrifugiert (200 g, 5 Minuten, 4 °C). Das Pellet wurde dann vorsichtig in der sterilen DNA-PBS-Lösung resuspendiert und 900 bis 1000 µl in eine 4 mm Elektroporationsküvette überführt. Anschließend wurde die Küvette in eine Elektroporationskammer eingesetzt und für 7 - 10 Millisekunden einem elektromagnetischem Feld von 230 V und 500 µF ausgesetzt. Die Suspension wurde im Anschluss daran für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und der Inhalt dann in 10 ml Zellkulturmedium blasenfrei gemischt. Die Zellen konnten dann auf Zellkulturplatten mit mitotisch inaktiven Fibroblasten gegeben werden. Pro 10 cm Platte wurden 1 bis 4×10^6 Zellen ausgesät. Die Selektion mit entsprechenden Antibiotika wurde bei NIH 3T3 Zellen 24 Stunden nach der Elektroporation gestartet, bei Oct4-GIP ES-Zellen 48 Stunden nach der Elektroporation.

2.5.6 Supertransfektion von E14T ES-Zellen

E14T ES-Zellen exprimieren das *Polyoma Large-T* Antigen und können daher *Polyoma*-basierte Vektoren episomal replizieren und so dauerhaft in sich tragen. Diese Art der Transfektion wird als Supertransfektion bezeichnet. Sie wird bis auf wenigen Ausnahmen wie die klassische Elektroporation (Abschnitt 2.5.5) durchgeführt. Die Plasmid DNA wird aber nicht linearisiert, sondern wird zirkulär eingesetzt. Aufgrund der besseren Effizienz reichen hier auch $0,5 \times 10^7$ Zellen pro Ansatz und nach der Elektroporation werden nur 0,5 bis 2×10^6 Zellen pro 10 cm Platte ausgesät. Die Selektion mit entsprechenden Antibiotika wird 24 Stunden nach der Supertransfektion gestartet.

2.5.7 Foci Test

NIH 3T3 Zellen wurden in Transduktionsmedium mit Nanog-TAT oder Nanog Δ HD in 12-well Platten in niedriger Dichte ausgesät (10^3 Zellen / $3,5 \text{ cm}^2$). Unbehandelte Zellen in Transduktionsmedium dienten als Kontrolle. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt. Nach 8 bis 10 Tagen wurde am Mikroskop die Anzahl der entstandenen *Foci* bestimmt.

2.5.8 Soft Agar

Die *Soft Agar* Versuche wurden in unbeschichteten 6 cm Petri-Schalen durchgeführt. In jede Schale wurde 5 ml Boden-Agar gegeben (Transduktionsmedium mit 0,5 Prozent Agarose), Dieser wurde aus autoklavierter 5 prozentiger Agarose (PeqGold *low melt* Agarose, Peqlab, Erlangen) und Transduktionsmedium hergestellt. Die 5 prozentige Agarose wurde im Wasserbad bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ geschmolzen und anschließend im Wasserbad auf $42 \text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt und mit $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen Transduktionsmedium gemischt. Der flüssige Boden-Agar wurde wie oben beschrieben in die Petrischalen gegeben und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ausgehärtet.

NIH 3T3 Zellen die für 6 Tage in Kontrollmedium, Nanog Δ HD Medium (100 mM) oder Nanog-TAT Medium (100 mM) vorinkubiert wurden, wurden vereinzelt und je 10.000 Zellen in 2 ml entsprechenden Medien mit 0,3 Prozent Agar resuspendiert. Dieser *Top-Agar* wurde analog zum Boden-Agar hergestellt. Der *Top-Agar* wurde auf den Boden-Agar gegeben (2 ml / 6 cm Petrischale) und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Alle 7 Tage wurde pro Schale 1 ml entsprechendes Medium zugegeben. Nach 19 Tagen wurden die im Agar entstandenen Kolonien am Mikroskop gezählt und vermessen

2.5.9 Wachstumskurven

Um das Proliferationsverhalten von Zellen über einen längeren Zeitraum beobachten zu können, wurden Wachstumskurven erstellt. Dabei wurden definierte Zellzahlen ausgesät und die Zellen bei jeder Passage vereinzelt und gezählt (Neubauer Zählkammer). In den folgenden Passagen wurden wiederum gleiche Zellzahlen ausgesät. Die kumulativen Zellzahlen über den gesamten Beobachtungszeitraum konnten dann mathematisch bestimmt werden.

2.5.10 Karyotyp-Analyse

Um den Karyotyp von MEFs zu untersuchen, wurden diese auf 15 cm Zellkulturschalen bis zum Erreichen von 80 prozentiger Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden dann für 16 Stunden mit 0,1 µg/ml Colcemid (*KaryoMax*, Invitrogen, Carlsbad, USA) behandelt und so in der Metaphase blockiert.

Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit TrypleExpress (Invitrogen, Carlsbad, USA) enzymatisch vereinzelt. Diese Reaktion wurde mit Zellkulturmedium abgestoppt und die Zellen wurden abzentrifugiert (200 g, 4 °C, 10 Minuten). Der Überstand wurde bis auf 500 µl abgesaugt. In diesen 500 µl wurde das Zellpellet vorsichtig resuspendiert. Bis zu einem Endvolumen von 6 ml wurde dann eine 75 mM KCL Lösung langsam zugegeben. Nach weiterer Zugabe von 8 Tropfen eiskalter Fixierlösung (Methanol : Essigsäure - 3:1) wurde für 5 Minuten bei 4 °C und 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut bis auf 500µl entfernt und die Zellen im Verbleibenden resuspendiert. Nach Zugabe von 5,5 ml eiskalter Fixierlösung wurde der Ansatz 20 Minuten auf Eis inkubiert und danach erneut zentrifugiert. Dieser Fixierschritt wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 1ml Fixierlösung resuspendiert und von ca. 25cm Höhe auf Objektträger getropft. Diese wurden bei 60 °C im Hybridisierungsofen über Nacht getrocknet und dann für 10 Minuten mit Gimsalösung gefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde mit destilliertem Wasser entfernt und die Objektträger für 30 Minuten getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger kurz in Xylol getaucht und dann mit Corbit und Deckgläsern eingedeckelt.

Die Chromosomen pro Metaphase konnten unter dem Mikroskop (400 bis 1000 fache Vergrößerung) gezählt werden.

2.5.11 Injektion von NIH 3T3 Zellen in immunsupprimierte Mäuse

NIH 3T3 Zellen wurden für acht Tage (zwei Passagen) mit oder ohne 50 nM Nanog-TAT vorbehandelt und dann in PBS gewaschen und enzymatisch vereinzelt (TrypleExpress, Invitrogen, Carlsbad, USA). Nach dem Abstoppen der Reaktion mit MEF – Medium wurden die vereinzelt Zellen gezählt und abzentrifugiert (5 Minuten, 200g, 4 °C). Es wurden jeweils $2,7 \times 10^5$ Zellen in 300 µl HBSS resuspendiert und anschließend subkutan in

Zusammenarbeit mit Anke Leinhaas und Michaela Segsneider in eine immundefiziente SCID/beige Maus injiziert. Dabei wurden die Zellen zwischen der Resuspendierung und der Injektion in die Mäuse auf Eis transportiert bzw. gelagert. Die behandelten Mäuse wurden täglich beobachtet. Nach 19 Tagen waren in mehreren Tieren Tumore zu erkennen. Es wurden alle Mäuse mit Trockeneis (CO₂) getötet und auf Tumore untersucht. Die entstandenen Tumore wurden entfernt, vom umgebenden Gewebe befreit, gewogen und mit 4 Prozent Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

3. Ergebnisse

3.1 Konditionale Überexpression des Stammzellfaktors Nanog in Maus-Zellen

3.1.1 Klonierung eines *Polyoma*-basierten Vektors zur konditionalen Überexpression

Die Überexpression von Genen ist eine wichtige Methode, um deren Funktionsweise in Zellen zu untersuchen. Um eine stabile konditionale Überexpression von Genen zu ermöglichen, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei bekannte Methoden kombiniert: a) die sogenannte Supertransfektion und b) die Rekombination mit transduzierbaren Rekombinasen. Bei der Supertransfektion werden Plasmide verwendet, die auf dem *Polyoma* Virus basieren und einen entsprechenden *origin of replication* (Sequenz, an der die Replikation startet) besitzen. In transgenen Zellen, die das *Large-T* Antigen von *Polyoma* exprimieren, liegen diese Plasmide extrachromosomal (episomal) vor und ermöglichen eine hohe und stabile Expression (Gassmann et al., 1995; Camenisch et al., 1996; Chambers et al., 2003).

Der Vektor pPyCAGIP (Abbildung 3.1A; Chambers et al., 2003) ist ein *Polyoma*-basierter Vektor, der eine Platzhalter-Sequenz, die durch Kandidatengene ausgetauscht werden kann, und ein Gen, welches Puromycin Resistenz vermittelt (*pac^r*) unter der Kontrolle des CAG Promotors besitzt. Dabei ist die Platzhalter-Sequenz und das *pac^r* Gen mit einer *IRES*-Sequenz verbunden (*IRES* = interne ribosomale Eintrittsstelle, engl. *internal ribosomal entry site*). Durch diese *IRES*-Sequenz wird eine spezifische Faltung (Sekundärstruktur) der messenger-RNA hervorgerufen, die ohne weitere Initiationsfaktoren die Bindung der mRNA an die Ribosomen vermittelt. Dadurch kann die Translation der RNA des hinter der *IRES*-Sequenz gelegenen Gens (hier: *pac^r* Gen) ohne weiteren Promotor unmittelbar gestartet werden und wird somit, wie das Kandidatengen vor der *IRES*-Sequenz, vom CAG Promotor kontrolliert. Dieser Promotor ist konstitutiv aktiv und besteht aus einem Aktin Promotor mit Zytomegalo-Virus Enhancer (Niwa et al., 1991).

Zur konditionalen Überexpression von Proteinen wurde der pPyCAGIP Vektor in der vorliegenden Arbeit umfangreich verändert. Das *IRES-pac^r* Fragment wurde entfernt und in mehreren Klonierungsschritten durch eine Kasette zur *loxP*-vermittelten konditionalen Überexpression ersetzt (Abbildung 3.1B). Beim resultierenden Vektor, der als pBO1 bezeichnet wird, befinden sich je nach Version ein *pac^r* Gen oder *neo^r* Gen (Neomycin Resistenzgen, vermittelt Resistenz gegenüber G418) unter der Kontrolle des CAG Promotors.

Die durch den CAG Promotor vermittelte Transkription bricht dann aufgrund einer Stopp-Sequenz (aus pbs302, Invitrogen, Carlsbad, USA) ab. Das *pac^r*-Stopp oder *neo^r*-Stopp Fragment ist von *loxP*-Sequenzen flankiert und kann durch Cre-vermittelte Rekombination entfernt werden (Abbildung 3.1B und 3.1C).

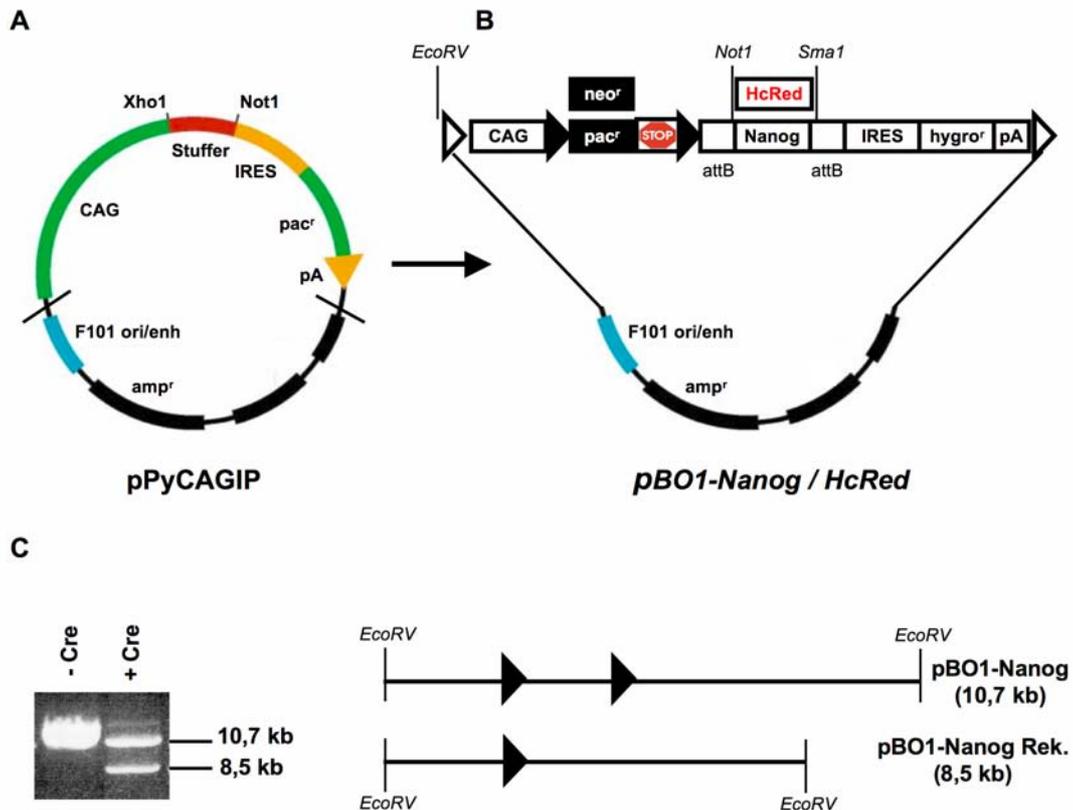


Abbildung 3.1: Klonierung eines Vektors zur Cre-induzierbaren Überexpression nach Supertransfektion

In den *Polyoma*-basierten Vektor pPyCAGIP (Chambers et al., 2003) (A) wurde in mehreren Klonierungsschritten eine *loxP* flankierte *pac^r*-Stopp Kassette oder *neo^r*-Stopp Kassette eingefügt (Details der Klonierung: siehe Abschnitt 2.2.17). Zusätzlich wurde *IRES-pac^r* durch *IRES-hygro^r* ersetzt. Mit einem Oligomer wurden *attB*-Sequenzen für die *Gateway*-Rekombination und eine *Not1* sowie eine *Sma1* Schnittstelle zwischen der 3'*loxP* Sequenz und dem *IRES* eingefügt. Zu untersuchende Gene (hier Nanog und HcRed) konnten dann über *Not1* und *Sma1* kloniert werden (B). (C) *In vitro* Rekombination mit HTNCre. Der pBO1-Nanog Vektor wurde mit *EcoRV* linearisiert, für 30 Minuten mit HTNCre behandelt und auf ein Agarosegel geladen. Der nicht rekombinierte Vektor ist 10,7 kb groß, der rekombinierte Vektor 8,5 kb.

Symbole: Schwarzes Dreieck: *loxP* Sequenz, weißes Dreieck: *Frt* Sequenz

Abkürzungen: F101 ori/enh, *Polyoma* Ausgangspunkt der Replikation (*origin of replication*) mit F101 Enhancer (Gassmann et al., 1996); *amp^r*, Ampecilin Resistenz; pA, Polyadenylierungssignal; *pac^r*, Puromycin Resistenz Gen; *neo^r*, Neomycin Resistenz Gen; *hygro^r*, Hygromycin Resistenz Gen; CAG, CAG Promotor; IRES, *internal ribosomal entry site - genetisches Element für die bicistronische Transkription*; *attB*, Erkennungssequenz für die *Gateway*-Rekombination; STOP, Stopp-Sequenz die einen Transkriptionsabbruch verursacht; Rek, Rekombiniert; kb, Kilobasen

Nach der Rekombination kontrolliert der CAG Promotor ein HcRed Reportergen (pBO1-Red) oder Nanog (BOI-Nanog). Zusätzlich wird über eine *IRES*-Sequenz die Expression von hygro^r vermittelt. Darüber hinaus ist das Kandidatengen von *attB*-Sequenzen flankiert, um eine *Gateway*-Rekombination (Invitrogen, Carlsbad, USA) zu ermöglichen. (Abschnitt 2.2.17; Abbildung 2.1, 2.2 und 3.1B).

Um eine Deaktivierung der Überexpression zu ermöglichen, wurde die gesamte Expressionskassette (vom CAG Promotor bis zum Poly-A) in Zusammenarbeit mit Katrin Hesse von *FRT*-Sequenzen flankiert. Dies erlaubt das Entfernen des gesamten Bereichs durch FLP-Rekombination (Hesse, 2007).

Vor dem Einsatz des pBO1 Vektors in Zellkulturexperimenten wurden mögliche Mutationen durch Sequenzierung ausgeschlossen. Darüber hinaus wurde *in vitro* die Funktionalität der FLP-, Cre- und *Gateway*-Rekombination getestet. Eine *in vitro* Rekombination von linearisiertem pBO1-Nanog mit HTNCre resultiert in einem um 2,2 kb verkürztem Plasmid. Dies entspricht der erwarteten Größe des mit Cre-rekombinierten pBO1-Nanog Plasmides (Abbildung 3.1C). Nach einer *BP*-Reaktion der *Gateway*-Rekombination mit pBO1-HcRed und *pDONRTM* (Invitrogen, Carlsbad, USA) zeigt ein analytischer Testverdau, dass alle untersuchten Klone (n=12) rekombiniert wurden (Abschnitt 2.17 und Abbildung 2.2). In Zusammenarbeit mit Katrin Hesse konnte auch eine Rekombination mit zellpermeablem FLP gezeigt werden (Patsch, 2005; Hesse, 2007).

3.1.2 Cre-induzierbare Überexpression von HcRed in murinen ES-Zellen

Zur Überprüfung der Funktionalität des pBO1 Vektors in ES-Zellen der Maus wurde eine Variante mit HcRed als Reportergen (pBO1-Red) in E14T ES-Zellen untersucht (Abbildung 3.2A). Diese transgenen Zellen mit stabil integriertem pMGD20neo Plasmid exprimieren das *Polyoma Large-T* Antigen und sind resistent gegen G418 (Gassmann et al., 1995; Chambers et al., 2003). Sowohl die Resistenz als auch die Expression des *Large-T* Antigens wurden vor den Experimenten erfolgreich getestet. Vor der Supertransfektion mit pBO1-Red wurden die E14T Zellen in Anwesenheit von G418 kultiviert. Dabei wurden teilweise MEF-Zellen verwendet, um die spontane Differenzierung der ES-Zellen zu minimieren. Es war aber auch möglich, die Experimente ohne Fibroblasten-Co-Kultur auf gelantinierten Zellkulturschalen durchzuführen.

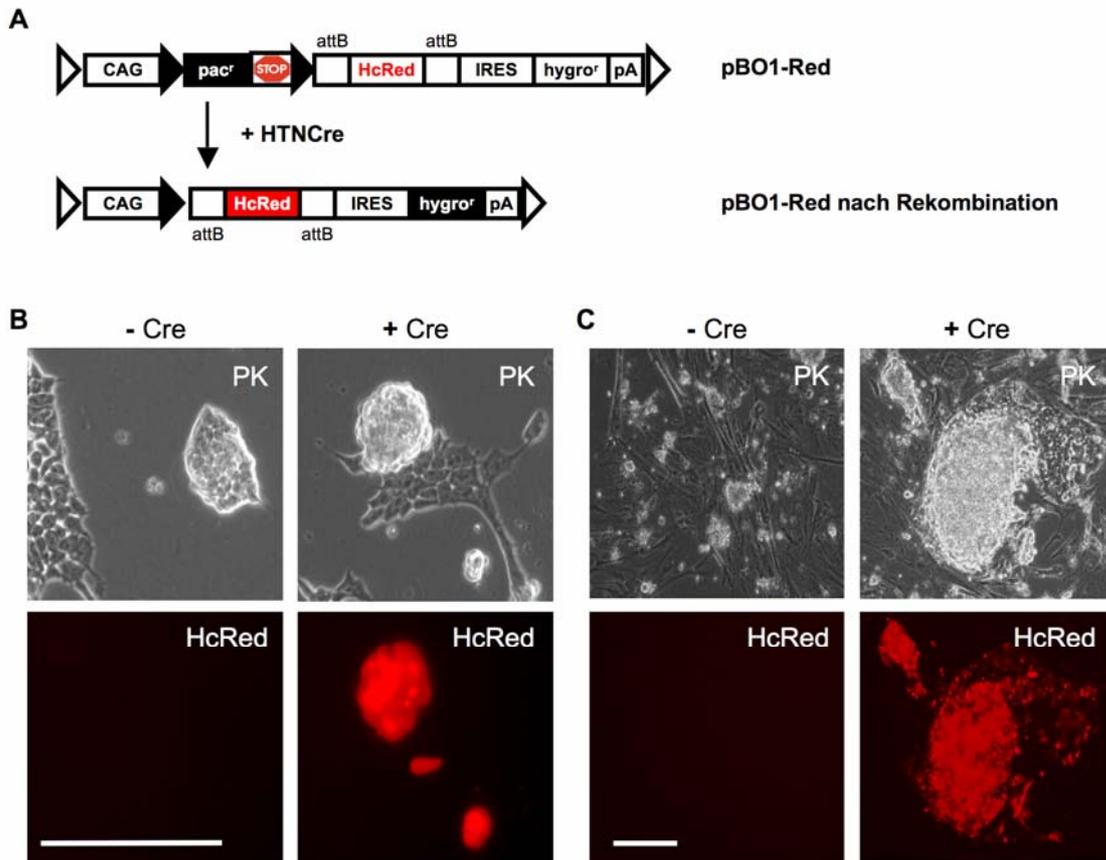


Abbildung 3.2: Cre-induzierbare Überexpression von HcRed in E14T ES-Zellen

(A) Expressionskassette von pBO1-Red vor und nach Rekombination mit HTNCre. Erst nach der Cre-vermittelten Deletion des *pac^f-Stop* Fragments werden das HcRed Gen und das *hygro^r* Gen vom CAG Promotor kontrolliert. (B) E14T ES-Zellen wurden mit dem pBO1-Red Vektor *supertransfiziert*. Der selektierte polyklonale Ansatz wurde dann vereinzelt, auf neue Zellkulturschalen ausgesät und mit transduzierbarem Cre-Protein behandelt (8 h, 4 μ M) und damit die Expression von HcRed und Hygromycin-Resistenz induziert. 24 h nach Ende der Cre-Transduktion wurden die Zellen mit Hygromycin selektiert (100 μ g/ml). Zwei Tage nach Cre-Behandlung war eine deutliche HcRed Expression zu beobachten. (C) 13 Tage nach der Cre-Transduktion waren die Kontrollzellen nahezu vollständig abgestorben. Die Cre-behandelten Zellen bildeten auch in Anwesenheit von Hygromycin HcRed positive Kolonien.

Skalierung: 200 μ m

Symbole: Schwarzes Dreieck: *loxP* Sequenz, weißes Dreieck: *Frt* Sequenz

Abkürzung: PK, Phasenkontrast; *pac^f*, Puromycin Resistenz Gen; *hygro^r*, Hygromycin Resistenz Gen; CAG, CAG Promotor; IRES, *internal ribosomal entry site* - genetisches Element für die biclonische Transkription; attB, Erkennungssequenz für die Gateway-Rekombination; STOP, Stopp-Sequenz die einen Transkriptionsabbruch verursacht; pA, Polyadenylierungssignal
Die HcRed Fluoreszenz wurde mit einem Rhodamin Filter aufgenommen

24 Stunden nach der Supertransfektion wurden die Zellen als polyklonaler Ansatz mit Puromycin selektiert, um Zellen anzureichern, die das funktionelle pBO1-Red Plasmid aufgenommen hatten. 24 Stunden vor der Cre-vermittelten Rekombination mit transduzierbarem HTNCre wurden die Zellen vereinzelt und in Antibiotika-freiem ES-Zell-

Medium auf neue Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden für acht Stunden mit HTNCre inkubiert. 24 Stunden nach Ende der Transduktion wurden die Zellen mit Hygromycin selektiert. Nur die HTNCre-behandelten Zellen bildeten Hygromycin resistente Kolonien und mehr als 50 Prozent dieser Kolonien besaßen auch eine deutlich sichtbare HcRed Expression (Abbildung 3.2). Dabei war die Expression von HcRed schon 24 Stunden nach Beginn der Cre-Behandlung deutlich sichtbar. Ohne Cre Behandlung überlebten nur wenige Zellen die Hygromycin-Selektion und von diesen zeigte keine eine detektierbare HcRed Expression (Abbildung 3.2).

Die klassische Transfektion (mit Elektroporation) von linearisiertem pBO1-Red Plasmid in Oct4-GIP ES-Zellen resultierte zwar in Hygromycin resistenten Kolonien (nach Cre-Rekombination), es war aber keine HcRed Expression zu detektieren.

3.1.3 Inhibition der Differenzierung durch Überexpression von Nanog in ES-Zellen

Nachdem die Funktionalität des Vektorsystems mit Hilfe des HcRed Reportergens gezeigt wurde, sollten im nächsten Schritt die Effekte einer Nanog Überexpression in E14T ES-Zellen untersucht werden. Es wurde ein Plasmid verwendet, das anstelle des HcRed Gens (bei pBO1-Red), für die cDNA von murinem Nanog kodierte (pBO1-Nanog). Das Plasmid wurde analog zu pBO1-Red durch Supertransfektion in die Zellen eingebracht und diese wurden als polyklonaler Ansatz ausgesät und mit Puromycin selektiert. Nach der Cre-Behandlung konnten die E14T-pBO1-Nanog ES-Zellen und die nicht Cre-behandelten Kontrollzellen ohne embryonale Fibroblasten auf gelatinisierten Zellkulturschalen kultiviert werden. Die Cre-vermittelte Induktion der Nanog Expression in E14T-pBO1-Nanog Zellen wurde mit einer Antikörperfärbung überprüft. Das Signal der Nanog-Färbung war in den E14T-pBO1-Nanog Zellen nach Cre-Behandlung deutlich intensiver als in Zellen ohne Cre-Behandlung. Ferner war zu beobachten, dass die Intensität der Färbung bei den Nanog überexprimierenden Zellen mosaikartig war (Abbildung 3.3A, 3.3B) Die Cre-induzierte Überexpression von Nanog ist spezifisch für das pBO1-Nanog Plasmid, da E14T-pBO1-Red Zellen sowohl mit als auch ohne Cre- Behandlung nur eine schwache Nanog Färbung zeigten (Abbildung 3.3C, 3.3D)

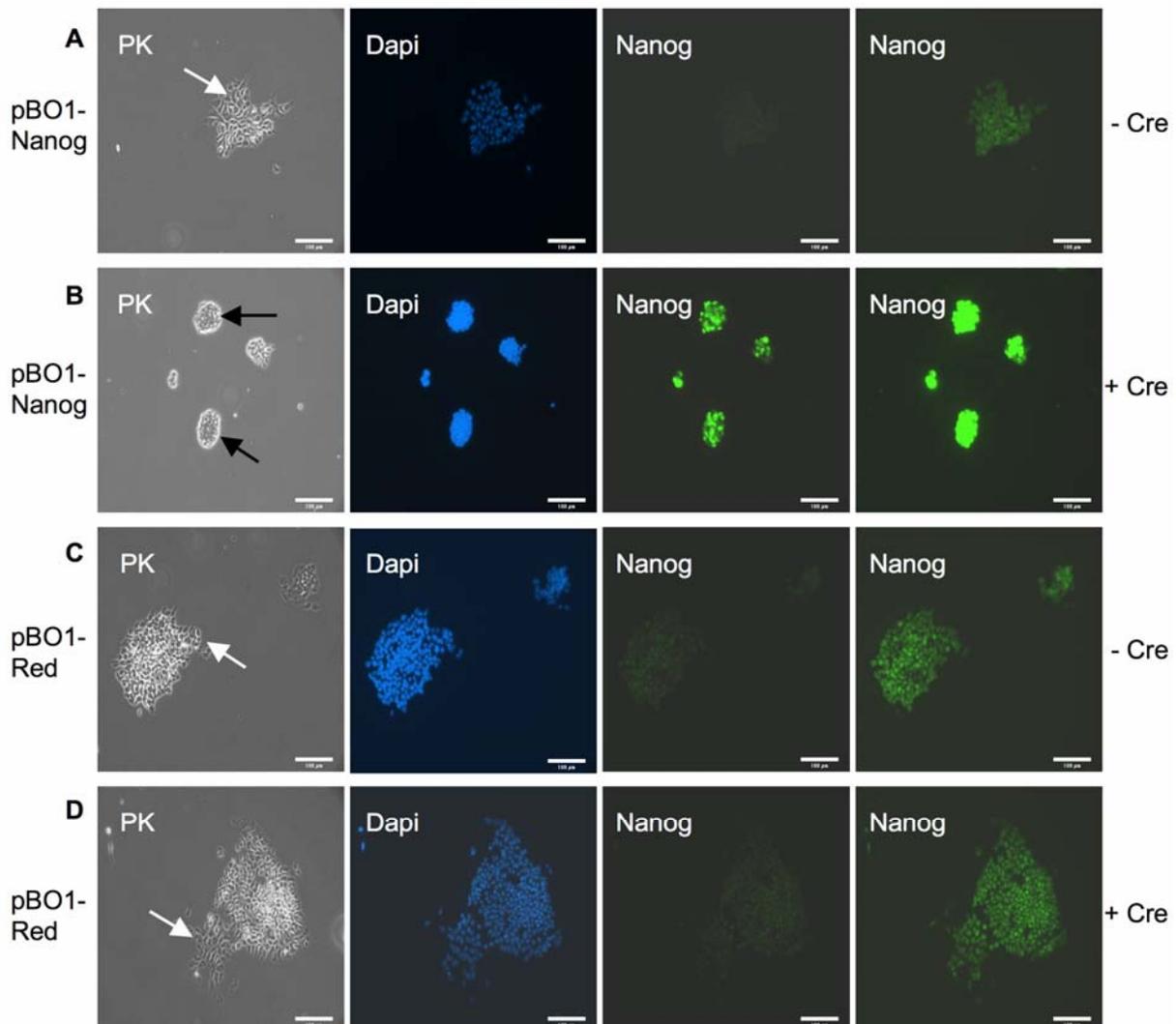


Abbildung 3.3: Nanog Expressionsniveaus in transgenen E14T Zellen

E14T ES-Zellen mit episomalem pBO1-Red oder pBO1-Nanog Vektor wurden mit oder ohne HTNCre behandelt und dann 11 Tage (2 Passagen) in ES-Zell Medium mit LIF kultiviert. Die Zellen wurden dann mit PFA fixiert und einer Nanog Antikörperfärbung unterzogen. **(A)** E14T-pBO1-Nanog Zellen ohne HTNCre: die Kolonien zeigten eine differenzierte Morphologie und nur ein schwaches Nanog-Signal. **(B)** E14T-pBO1-Nanog Zellen nach HTNCre-Transduktion: es war starke Überexpression von Nanog zu beobachten und morphologisch kaum Differenzierung zu sehen. **(C + D)** E14T-pBO1-Red Zellen zeigten unabhängig von HTNCre nur eine schwache Nanog Expression und eine differenzierte Morphologie.

Skalierung: 100 µm

Symbole: weiße Pfeile, Beispiele für differenzierte Kolonien mit großen und ungleichmäßigen Zellen; schwarze Pfeile, Beispiele für undifferenzierte Kolonien mit kleinen und abgerundeten Zellen

FITCs Belichtungszeiten: 3. Spalte 100 ms, 4. Spalte 500 ms

Abkürzungen: PK, Phasenkontrast

Die Überexpression von Nanog verursachte auch morphologische Effekte, es bildeten sich wesentlich gleichmäßigere Kolonien aus undifferenzierten Zellen, die durch ihre abgerundete Form mit großem Kern zu Zytoplasma Verhältnis charakterisiert waren. Im Gegensatz dazu zeigten E14T Zellen mit endogenem Nanog Expressionslevel ohne Fibroblasten-Co-Kultur auch in Anwesenheit von LIF spontane Differenzierung. Die Zellen waren teilweise ungleichmäßig und vergrößert. Außerdem wiesen viele Zellen eine multi-polare Form mit vielen Verästelungen und großen Anteil an Zytoplasma auf (Abbildung 3.3).

Erwartungsgemäß exprimierten unter diesen Kultivierungsbedingungen sowohl die E14T-pBO1-Red als auch die E14T-pBO1-Nanog Zellen nach Cre-vermittelter Rekombination die Pluripotenz-assoziierten Marker Oct4 und SSEA1 (Abbildung 3.4). Dabei war zu beobachten, dass die Nanog überexprimierenden Zellen beide Faktoren stärker und gleichmäßiger exprimierten als die Kontrollzellen (E14T-pBO1-Red) (Abbildung 3.4).

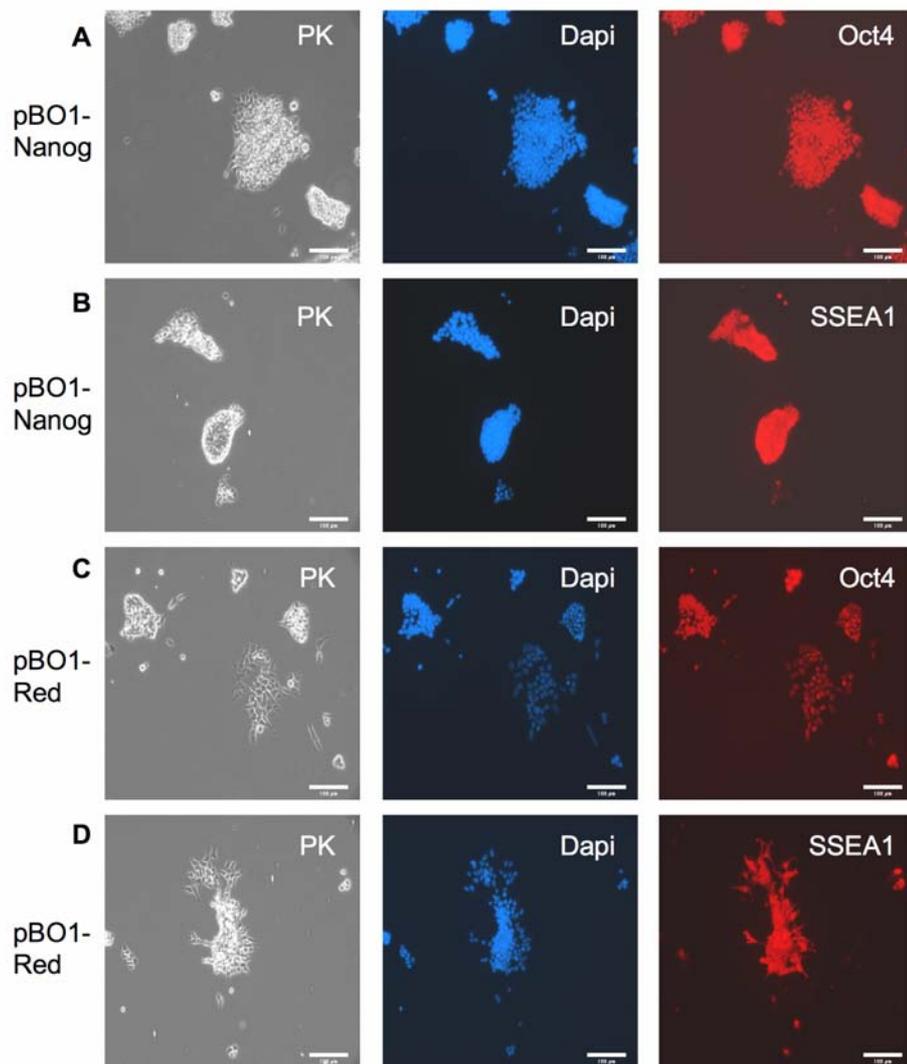


Abbildung 3.4: Expression der Pluripotenzmarker Oct4 und SSEA1 in transgenen E14T ES-Zellen

E14T-pBO1-Red und E14T-pBO1-Nanog ES-Zellen wurden nach Cre-Transduktion 11 Tage in ES-Zell Medium mit LIF kultiviert. Nach Fixierung mit PFA wurden die Kolonien auf Oct4 und SSEA1 gefärbt. (**A + B**) Nanog überexprimierende Zellen sind morphologisch wenig differenziert und zeigen eine starke homogene Expression von Oct4 (A) und SSEA1 (B). (**C+D**) E14T-pBO1-Red Zellen wurden als Kontrollzellen benutzt und zeigten eine differenziertere Morphologie sowie schwächere Färbungen für Oct4 und SSEA1.

Skalierung: 100 µM

Abkürzung: PK, Phasenkontrast

Um den Pluripotenz-fördernden Effekt der Nanog-Überexpression weiter zu untersuchen, wurden die E14T ES-Zellen mit pBO1-Red bzw. -Nanog in einem anderen Ansatz nach der Cre-Rekombination ohne LIF-Stimulation kultiviert. Dem Medium wurde kein LIF zugegeben und potenziell vorhandenes endogenes LIF wurde mit einem spezifischen Inhibitor blockiert (Vernallis et al., 1997). Unter diesen Kulturbedingungen verlieren E14Tg2a ES-

Zellen nach sieben Tagen ihre pluripotenten Eigenschaften und können nicht weiter passagiert werden (Chambers et al., 2003).

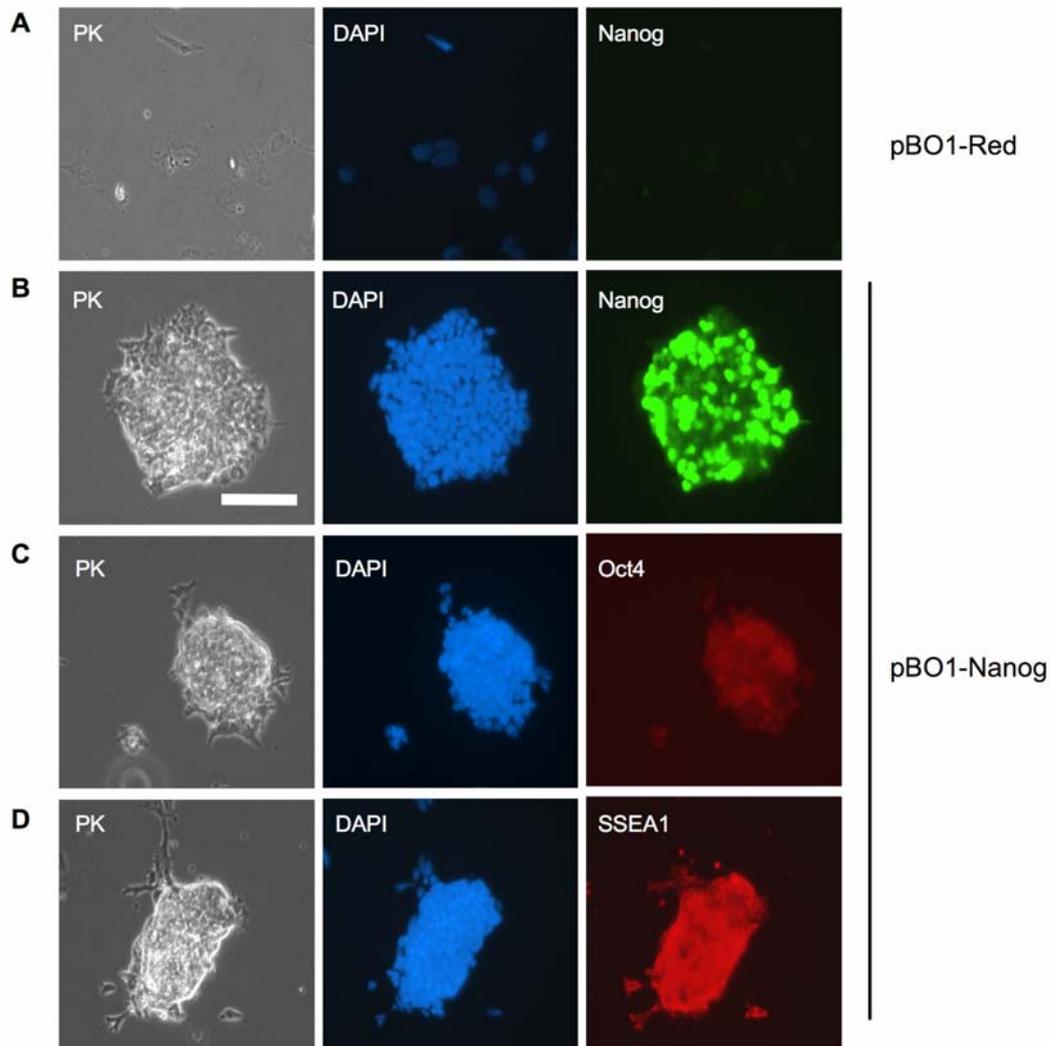


Abbildung 3.5: Überexpression von Nanog in E14T ES-Zellen erhält Pluripotenzmarker in LIF freier Kultur

E14T-pBO1-Red und -pBO1-Nanog ES-Zellen wurden nach Cre-Transduktion 14 Tage in LIF-freiem ES-Medium (mit LIF Inhibitor) mit Hygromycin kultiviert. (A) Die pBO1-Red Zellen konnten kaum noch expandiert werden und zeigten eine sehr differenzierte Morphologie. Es konnte keine Nanog Expression mehr nachgewiesen werden. (B) E14T-pBO1-Nanog Zellen zeigen eine deutliche Nanog Überexpression und eine überwiegend undifferenzierte Morphologie. Die Kolonien waren positiv für (C) Oct4 und (D) SSEA1.

Skalierung: 100 μ m

Abkürzungen: PK, Phasenkontrast

Die E14T-pBO1-Red Zellen zeigten unter diesen Bedingungen nach der Cre-Rekombination kaum noch Proliferation und sahen morphologisch stark differenziert aus. Es waren keine Zellen mehr zu erkennen, die eine ES-Zell-typische kleine und abgerundete Form besaßen. Endogenes Nanog konnte mit einer Antikörperfärbung nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 3.5A). Im Gegensatz dazu proliferierten die Nanog überexprimierenden Zellen auch ohne LIF-Stimulation und bildeten ES-Zell-typische Kolonien. Die meisten Zellen waren klein und hatten eine gleichmäßige abgerundete Morphologie. Nur im Randbereich der Kolonien waren einige differenzierte Zellen zu beobachten (Abbildung 3.5B-D). Nach zwei Wochen Kultur in Medium mit LIF-Inhibitor zeigten die Zellen noch eine starke mosaikartige Überexpression von Nanog und waren sowohl Oct4 als auch SSEA1 positiv (Abbildung 3.5 B-D).

3.1.4 Nanog Überexpression ermöglicht klonales Wachstum in Abwesenheit von LIF

Die Fähigkeit, in klonaler Dichte wachsen zu können, ist ein besonderes Merkmal von undifferenzierten ES-Zellen, welches bei der Differenzierung verloren geht. Um die oben beschriebene LIF-Kompensation durch Nanog weiter zu charakterisieren, wurde ein *Klonogenitäts*-Test durchgeführt. Dazu wurden E14T-pBO1-Nanog Zellen zunächst mit HTNCRE transduziert und dann in Abwesenheit von LIF mit Hygromycin für zehn Tage selektiert. Dabei starben die nicht Cre-behandelten Zellen ab. E14T Kontrollzellen ohne pBO1-Plasmid wurden ebenfalls mit HTNCRE behandelt und dann für sieben Tage in LIF freiem Medium inkubiert, aber nicht mit Hygromycin selektiert. Für den eigentlichen Klonogenitäts-Test wurden die so vorbehandelten Zellen in ES-Medium mit LIF-Inhibitor in klonaler Dichte (60 Zellen pro cm^2 ; Chambers et al., 2003) ausgesät. Jeweils nach acht Tagen wurde dieser Vorgang zweimal wiederholt, so dass die Zellen für drei Passagen (24 Tage) unter diesen Bedingungen kultiviert wurden. Bei jeder Passage wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt, bei denen Alkalische-Phosphatase-Aktivität (AP) nachgewiesen werden konnte.

In der ersten Passage des Klonogenitäts-Tests bildeten in Abwesenheit von LIF auch wildtypische E14T ES-Zellen noch schwach AP-positive Kolonien, aber nur drei Kolonien pro 10 cm^2 . Diese wenigen Zellen waren dann auch nicht weiter passagierbar (Abbildung 3.6). Dabei hatte die zu Kontrollzwecken durchgeführte Cre-Behandlung dieser Zellen keinen Einfluss auf die Proliferation und die Menge an AP-positiven Kolonien.

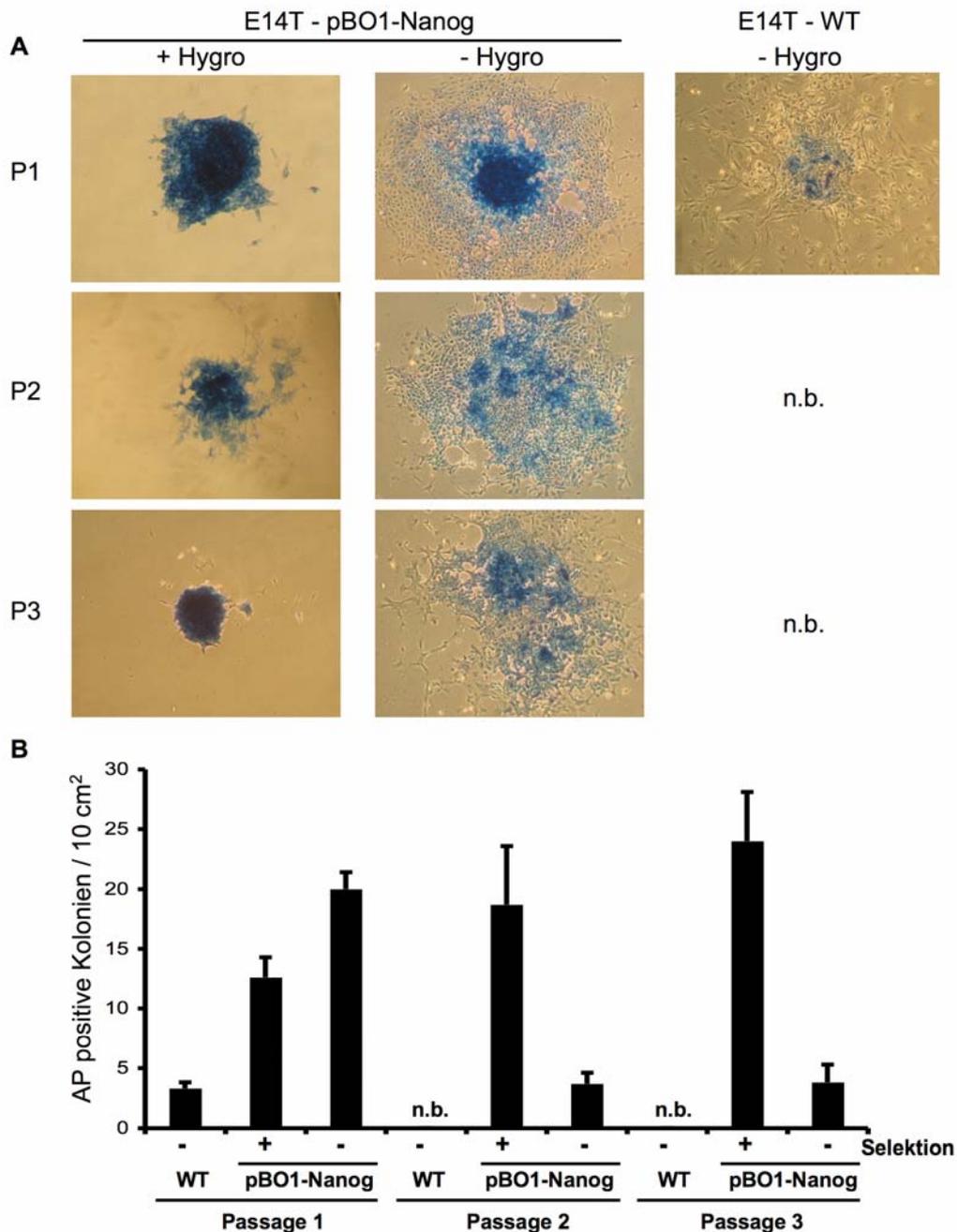


Abbildung 3.6: Nanog Überexpression in E14T ES-Zellen ermöglicht die Kultur in klonaler Dichte ohne LIF-Stimulation für drei Passagen

Wildtyp E14T ES-Zellen und E14T-pBO1-Nanog ES-Zellen werden 10 Tage nach Cre-Behandlung und Kultivierung in LIF-freiem ES-Medium (mit LI) mit Hygromycin in klonaler Dichte (60 Zellen/cm²) ausgesät und wie beschriftet mit Hygromycin (100 µg/ml) selektiert. **(A)** Jeweils nach 8 Tagen wurden die Zellen neu ausgesät und parallel weitere Ansätze mit PFA fixiert und auf Alkalischen-Phosphatase-Aktivität (AP) gefärbt. Die Wildtyp E14T Zellen konnten nach der ersten Passage wegen zu geringer Zellzahlen nicht weiter kultiviert werden und waren deshalb nicht bestimmbar (n.b.). **(B)** Quantitative Auswertung von (A). Daten sind Mittelwerte (Passage 1 und 2: n = 3, Passage 3: n = 5) mit Standardabweichung.

Abkürzungen: AP, Alkalische Phosphatase; WT, Wildtyp E14T Zellen; n.b., nicht bestimmbar

Die Nanog überexprimierenden E14T-pBO1-Nanog Zellen bildeten in der ersten Passage des Tests dagegen deutlich mehr AP-positive Kolonien und die AP-Färbung war auch wesentlich intensiver. Dabei war ein deutlicher Unterschied zwischen Kulturen mit und ohne Hygromycin zu erkennen. Die Zellen, die unter diesem Selektionsdruck wuchsen, bildeten in der ersten Passage zwar 37 Prozent weniger AP-positive Kolonien als die unselektierten Zellen, die AP-Färbung war aber intensiver und gleichmäßiger. Zudem waren kaum differenzierte Zellen zu erkennen (Abbildung 3.6). In der zweiten und dritten Passage des Klonogenitäts-Tests bildeten die selektierten Zellen weiterhin kompakte, stark AP-positive Kolonien aus und die Klonogenität nahm von Passage zu Passage zu und erreichte nach der dritten einen Mittelwert von 24 AP-positiven Kolonien pro 10 cm² (Abbildung 3.6).

Im Gegensatz dazu nahm die Klonogenität der nicht selektierten Zellen ab und erreichte nach der zweiten und dritten Passage nur noch einen Wert von drei bis vier AP-positiven Kolonien pro 10 cm² (Abbildung 3.6).

3.1.5 Analyse der Überexpression von HcRed und Nanog in NIH 3T3 Zellen

Nachdem das pBO1 Vektorsystem erfolgreich in E14T Zellen getestet wurde, sollte es auch auf somatische Zellen angewendet werden, um die Effekte einer Nanog Überexpression in Zellen, die kein endogenes Nanog exprimieren, zu untersuchen. Aufgrund der nötigen Selektion nach der Elektroporation und nach der Cre-Transduktion wurde mit den NIH 3T3 Zellen eine immortalisierte Linie verwendet, die dauerhaft eine hohe Proliferation zeigt.

In diesem Fall wurde die Technik der stabilen Integration gewählt, das heißt der pBO1 Vektor wurde vor der Elektroporation linearisiert. Dabei wurde zunächst der schon bei ES-Zellen verwendete pBO1-Red Vektor benutzt. Nach der Elektroporation wurden die transgenen NIH 3T3 pBO1-Red Zellen als polyklonaler Ansatz mit Puromycin selektiert, so dass Zellen mit Transkription des *pac^r* Gens angereichert wurden. Diese Zellen wurden dann mit HTNCre behandelt, um das Reporter-gen HcRed einzuschalten. Nach der Cre-Transduktion war zunächst keine HcRed Fluoreszenz detektierbar und auch die Hygromycinselektion war nicht stringent. Erst nach über 20 Tagen Selektion konnten Zellen gewonnen werden, die zu über 50 Prozent HcRed positiv waren und unter Hygromycin Selektionsdruck besser proliferierten als die nicht Cre-behandelte Kontrolle. Diese Kontrollzellen zeigten zwar unter dem Selektionsdruck noch eine schwache Proliferation, es wurde aber keine einzige rote Zelle beobachtet (Abbildung 3.7A, 3.7B).

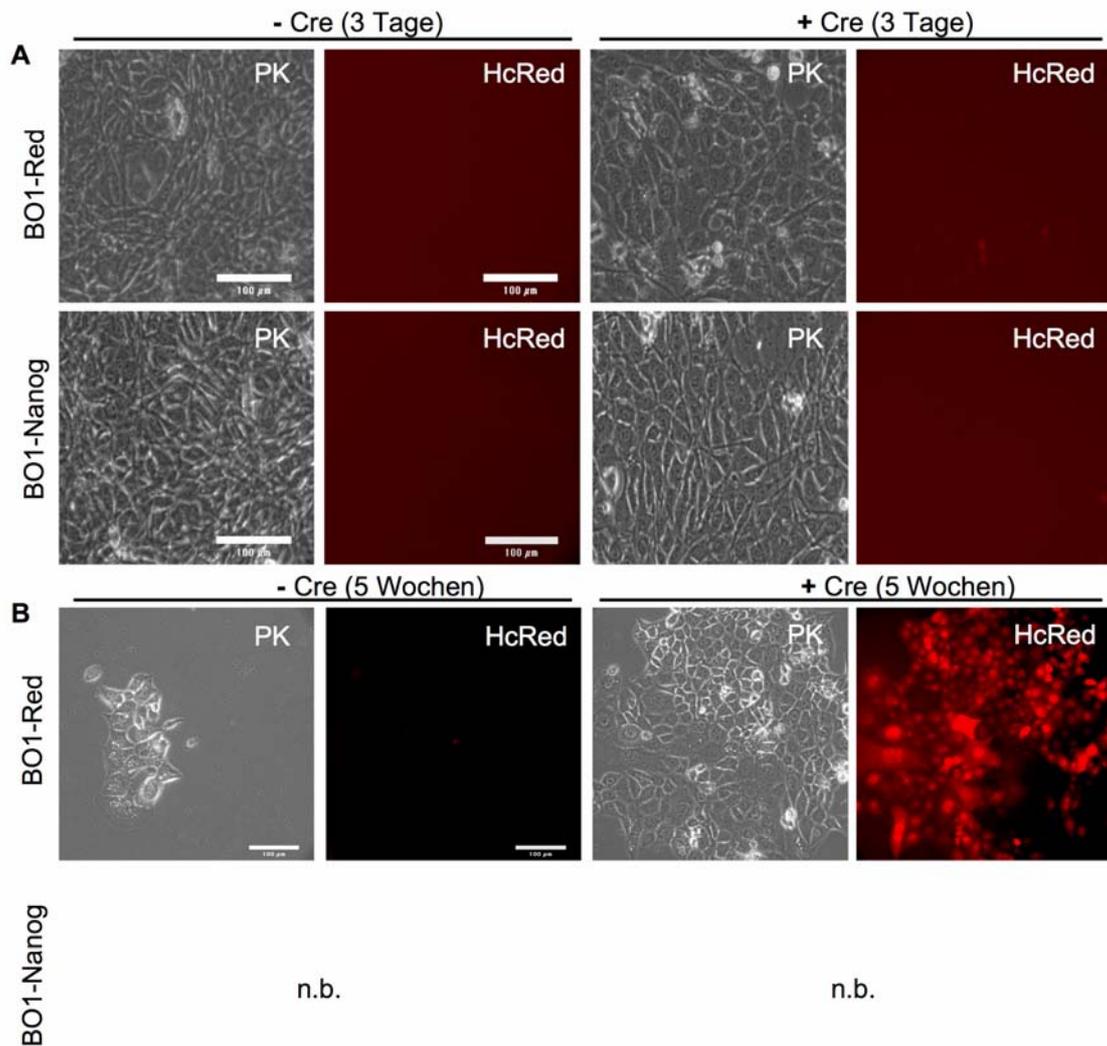
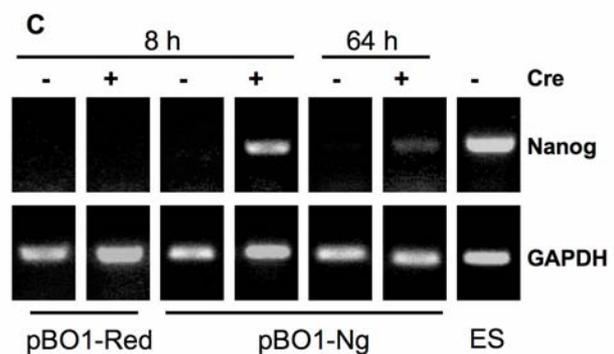


Abbildung 3.7:
Überexpression von HcRed und Nanog in NIH 3T3 Zellen

NIH 3T3 Zellen wurden mit linearisiertem pBO1-Red oder pBO1-Nanog Plasmiden transfiziert und polyklonal mit Puromycin selektiert. Nach Cre-Transduktion wurde der polyklonale Ansatz nach 24 Stunden mit Hygromycin selektiert (250 µg/ml). (A) Nach 3 Tagen und (B) nach 5 Wochen wurden die Zellen im Fluoreszenz Mikroskop auf HcRed Expression untersucht. Nach 5 Wochen war eine deutliche HcRed Fluoreszenz zu beobachten, die E14T pBO1-Nanog ES-Zellen waren abgestorben. (C) RT-PCR Analyse 8 Stunden und 64 Stunden nach Start der Cre-Transduktion, unbehandelte ES Zellen dienten als Positivkontrolle. Es wurden jeweils gleiche Mengen an RNA für die RT-Reaktion eingesetzt.

Skalierung: 100 µm

Abkürzungen: PK, Phasenkontrast; n.b., nicht bestimmbar; RT, Reverse Transkriptase
 Die HcRed Fluoreszenz wurde mit einem Rhodamin Filter aufgenommen



Eine analoge Behandlung der NIH 3T3 Zellen mit pBO1-Nanog führte bei der Hygromycin Selektion nach fünf bis zehn Tagen zum vollständigen Absterben der Kultur. Eine RT-PCR Analyse zwischen acht Stunden und 64 Stunden nach Start der Cre-Transduktion konnte aber zeigen, dass eine Cre-induzierte Nanog Expression auftritt. Bei den NIH 3T3 pBO1-Nanog Zellen konnte acht Stunden nach Start der Cre-Transduktion Nanog RNA nachgewiesen werden (Abbildung 3.7C). Die Expressionsstärke war aber deutlich niedriger als die von endogenem Nanog in ES-Zellen. Diese schwache Nanog Expression nahm im weiteren Verlauf ab und 64 Stunden nach Start der Cre-Transduktion war kaum noch Nanog Expression nachweisbar. Weitere Untersuchungen bezüglich der Effekte dieser Expression waren nicht möglich, da die Zellen nicht länger kultivierbar waren. Die als Kontrolle ebenfalls auf Nanog Expression untersuchten NIH 3T3 pBO1-Red Zellen zeigten keine nachweisbare Nanog Expression (Abbildung 3.7C).

3.2 Nanog Protein-Transduktion in somatischen Zellen der Maus

3.2.1 Zellpermeables Nanog-TAT Protein

Nachdem der genetische Ansatz zur Nanog Überexpression in somatischen Zellen (Abschnitt 3.1.5) durch toxische Effekte eingeschränkt wurde, sollte in einem alternativen Ansatz die Technik der Protein-Transduktion verwendet werden, um Nanog Aktivität in somatische Zellen einzubringen. Bei der Protein-Transduktion wird die genetische Information der Zellen nicht verändert und es ist keine Selektion nötig. Zu diesem Zweck wurde das in der Arbeitsgruppe entwickelte Nanog-TAT Protein eingesetzt (Peitz, 2007).

Dieses Protein besteht aus der Aminosäuresequenz von murinem Nanog und besitzt zusätzlich eine TAT Transduktionsdomäne, eine Kernlokalisationssequenz (NLS, *nuclear localisation signal*) und einen *Histidin-Tag* für die Aufreinigung (Abbildung 3.8A; Peitz, 2007). Es ist in *Advanced DMEM* Medium mit 5 Prozent FKS (Transduktionsmedium, Abschnitt 2.3.6) bis zu einer Konzentration von 100 nM löslich und die Behandlung von ES-Zellen mit diesem Protein induziert Nanog spezifische Effekte. In der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass es möglich ist die Ergebnisse zum Nanog-vermittelten Pluripotenzerhalt in ES-Zellen der Maus, die aus Experimenten der Nanog Überexpression bekannt sind (Chambers et al., 2003; Abschnitt 3.1.3, 3.1.4), mit Nanog-TAT Transduktion weitgehend zu reproduzieren (Peitz,

2007). Um mögliche Sekundärwirkungen der Proteinbehandlung auszuschließen zu können, wurde auch eine inaktive Variante von Nanog ohne Transduktionsdomäne und ohne Homeodomäne als Negativkontrolle verwendet. Dieses Nanog Δ HHD genannte Protein wurde in der Arbeitsgruppe entwickelt und wird analog zu Nanog-TAT aufgereinigt (Münst, persönliche Mitteilung; Abbildung 3.8A).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Protein-Transduktion von Nanog-TAT nun auf somatische Zellen übertragen werden, um dessen Einfluss auf die Proliferation, Transformation und Differenzierung von somatischen Zellen zu untersuchen. Dabei sollten sowohl eine immortalisierte Fibroblasten-Zell-Linie (NIH 3T3) als auch primäre Fibroblasten analysiert werden.

3.2.2 Nanog-TAT induziert eine erhöhte Proliferation von NIH 3T3 Zellen

Es wurde zunächst untersucht, ob NIH 3T3 Zellen in dem Nanog Transduktionsmedium kultiviert werden können. Die Zellen zeigten in diesem Medium eine Proliferation und Morphologie wie sie auch im Standard MEF-Medium zu beobachten ist. Im nächsten Schritt konnte untersucht werden, ob die Zugabe von Nanog-TAT oder dem Kontrollprotein Auswirkungen auf die Teilungsrate haben. Zu diesem Zweck wurden NIH 3T3 Zellen für zehn Tage kultiviert, wobei die Zellen nach dem dritten und siebten Tag passagiert wurden. Es zeigte sich, dass die Nanog-TAT-behandelten Zellen in allen Passagen einen dichteren Zellrasen bildeten als die unbehandelten oder die mit dem Kontrollprotein behandelten Zellen (Abbildung 3.8B-E). Die kumulative Zellzahl war nach zehn Tagen bei den Nanog-TAT-behandelten Zellen 3,7 mal so hoch wie die der unbehandelten Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu induzierte das Kontrollprotein nur eine geringe Proliferationssteigerung (1,4 fache Steigerung). Das schnellere Wachstum der Zellen ist also spezifisch auf Nanog-TAT zurückzuführen. Zur Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Nanog-TAT behandelt. Dabei war der Effekt mit 50 nM Nanog-TAT unwesentlich größer als mit 100 nM Nanog-TAT (Abbildung 3.8F).

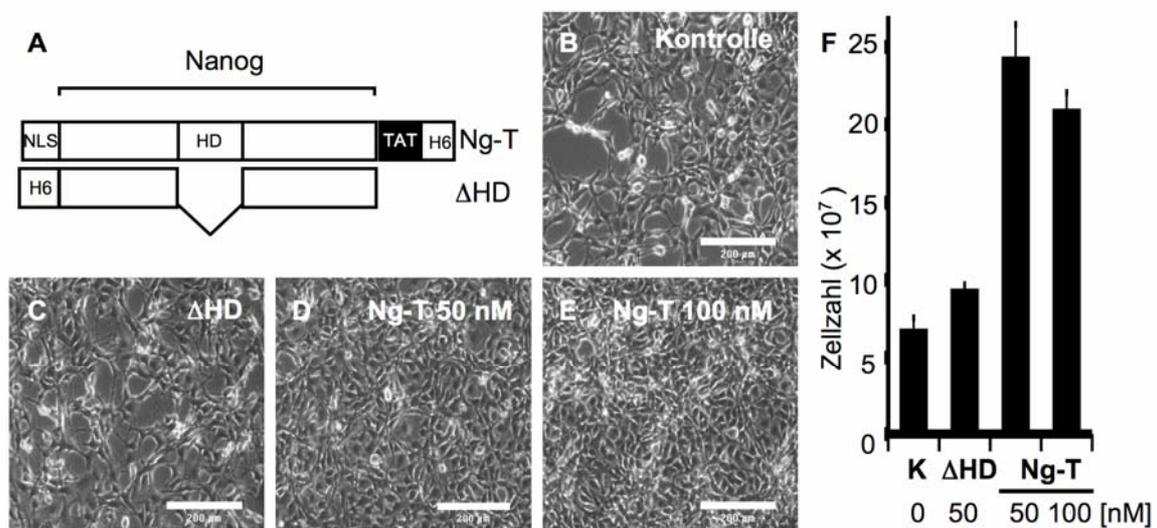


Abbildung 3.8: Nanog-TAT steigert spezifisch die Proliferation von NIH 3T3 Zellen

Um die Effekte von Nanog-TAT und NanogΔHD auf die Proliferation von NIH 3T3 Zellen zu untersuchen wurden jeweils $7,5 \times 10^4$ NIH 3T3 Zellen auf $3,5 \text{ cm}^2$ Zellkulturschalen in Transduktionsmedium für 10 Tage (3 Passagen) mit den beiden Proteinen behandelt und die kumulative Zellzahl bestimmt. (A) Schematischer Aufbau der rekombinanten Proteine NanogΔHD (ΔHD) und Nanog-TAT (Ng-T). (B-E) Phasenkontrastaufnahmen der unterschiedlich behandelten Zellen an Tag 10 des Experiments (3 Tage nach Aussaat). Die Zellen wurden in Transduktionsmedium kultiviert (B) welches 100 nM NanogΔHD Protein enthielt (C) oder 50 nM Nanog-TAT (D) oder 100 nM Nanog-TAT (E). (F) Kumulative Zellzahlen nach 10 Tagen Kultur unter den angegebenen Bedingungen. Daten sind Mittelwerte (n=2) mit Standardabweichung.

Skalierung: 200 μm

Abkürzungen: K, Kontrolle; ΔHD, NanogΔHD; Ng-T, Nanog-TAT; NLS, Kernlokalisationssequenz; H6, 6xHistidin; HD, Homeodomäne

3.2.3 Nanog-TAT induziert den Verlust der Kontaktinhibition von NIH 3T3 Zellen

Eine erhöhte Zellteilungsrate ist ein Charakteristikum von transformierten Zellen. Es wurde untersucht, ob die durch Nanog-TAT verursachte Proliferations-Steigerung mit weiteren Merkmalen der Transformation einhergeht. Ein experimenteller Ansatz um dies zu analysieren, ist die Untersuchung der Kontaktinhibition. NIH 3T3 Zellen wachsen normalerweise als *Monolayer*, weil sie eine strikte Kontaktinhibition besitzen, die dreidimensionales Wachstum blockiert. Die Überexpression von Onkogenen wie v-Raf oder Ras kann diese Kontaktinhibition aufheben und somit einen transformierten Phänotyp verursachen, der durch dreidimensionales Wachstum gekennzeichnet ist (Zohn et al., 1998; Rennefahrt et al., 2002). Um den Einfluss von Nanog-TAT auf die Kontaktinhibition von

NIH 3T3 Zellen zu untersuchen, wurden diese in der vorliegenden Arbeit in geringer Dichte auf Zellkulturschalen ausgesät und für sieben bis zehn Tage kultiviert. Unbehandelte Zellen bildeten dabei einen dichten Zellrasen, der wegen der vorhandenen Kontaktinhibition nur aus einer Zellschicht bestand (*Monolayer*) (Abbildung 3.9A-links).

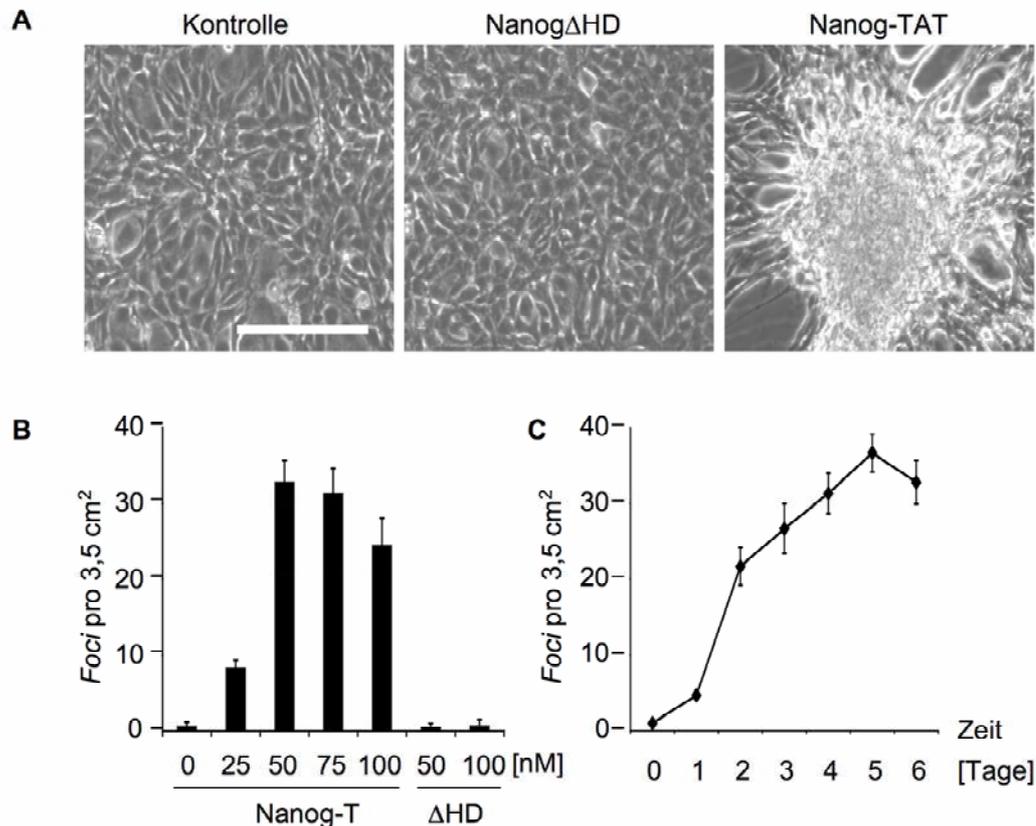


Abbildung 3.9: Nanog-TAT induziert zeit- und dosisabhängig das Wachstum ohne Kontaktinhibition

Um den Einfluss von Nanog-TAT auf die Kontaktinhibition von NIH 3T3 Zellen zu untersuchen wurden diese in geringer Dichte (1000 Zellen / 3,5 cm²) ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz in Transduktionsmedium mit oder ohne Nanog Δ HD bzw. Nanog-TAT kultiviert. **(A)** Phasenkontrastaufnahme nach 8 Tagen Kultivierung in den angegebenen Medien (Nanog Δ HD bzw. Nanog-TAT je 100 nM). **(B)** Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der *Foci* Bildung. Die Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert, wobei verschiedene Konzentrationen von Nanog Δ HD bzw. Nanog-TAT verwendet wurden. Die Anzahl der *Foci* wurde nach 8 Tagen bestimmt. Daten sind Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung. **(C)** Zeitabhängigkeit der *Foci* Bildung. NIH 3T3 Zellen wurden für 0 bis 6 Tage mit 50 nM Nanog-TAT behandelt und anschließend in Kontrollmedium bis zu einer Gesamtdauer von 8 Tagen weiter kultiviert. Anschließend wurde die Anzahl der *Foci* pro 3,5 cm² bestimmt. Daten sind Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

Skalierung: 200 μ M

Die Zugabe des Kontrollproteins Nanog Δ HD führte nicht zu veränderten Wachstumseigenschaften (Abbildung 3.9.A-mitte). Die Behandlung der Zellen mit Nanog-TAT induzierte dagegen die Bildung dreidimensionaler Zellhaufen, sogenannter *Foci*. Dabei

war auch die Morphologie der einzelnen NIH 3T3 Zellen verändert. Die Zellen waren deutlich kleiner als die Kontrollzellen und hatten eine abgerundete, meist bipolare Form (Abbildung 3.9A-rechts).

Die Verwendung verschiedener Nanog-TAT Konzentrationen zeigte dabei eine klare Konzentrationsabhängigkeit der *Foci*-Bildung. Mit steigenden Konzentrationen von Nanog-TAT nahm die Anzahl der *Foci* pro 3,5 cm² Kulturfläche zunächst deutlich zu. Im Bereich von 50 bis 75 nM war mit etwa 35 *Foci* pro 3,5 cm² das Maximum erreicht, weitere Konzentrationssteigerungen führten zu einer verringerten Anzahl an *Foci* (Abbildung 3.9B).

Ein großer Vorteil der Nanog Protein-Transduktion gegenüber genetischen Ansätzen ist auch die Kontrolle über die Dauer der Behandlung mit dem zellpermeablen Protein. Es besteht die Möglichkeit, Nanog-TAT zu jedem Zeitpunkt durch einen Wechsel auf Nanog-TAT freies Medium zu entfernen. Dies ermöglichte es, den Einfluss der Inkubationsdauer ebenfalls zu untersuchen. Dazu wurden die Zellen nach der Aussaat für null bis sechs Tage mit Nanog-TAT behandelt und dann jeweils in Kontrollmedium bis zu einer Gesamtinkubation von acht Tagen kultiviert. Anschließend wurden die entstandenen *Foci* gezählt. Bis zu einer Inkubationsdauer von fünf Tagen mit Nanog-TAT nahm die Anzahl der *Foci* pro 3,5 cm² mit der Dauer der Nanog-TAT Inkubation zu. Dabei war eine Inkubationsdauer von zwei Tagen mit Nanog-TAT bereits ausreichend, um 20 *Foci* pro 3,5 cm² zu induzieren. Eine Steigerung der Inkubationsdauer auf mehr als fünf Tage führte zu einer Reduktion der *Foci*-Anzahl (Abbildung 3.9 C).

3.2.4 Reversible Bildung der Nanog-TAT induzierten *Foci*

Nachdem eine klare Abhängigkeit der *Foci*-Bildung von der Nanog-TAT Inkubationsdauer innerhalb einer Passage festgestellt wurde, sollte nun untersucht werden, wie sich die Zellen der *Foci*-Kulturen nach dem Passagieren verhalten. NIH 3T3 Zellen wurden für acht Tage mit Nanog-TAT behandelt und zeigten dreidimensionales Wachstum. Sie wurden im folgenden als Einzelzellsuspension passagiert und mit oder ohne Nanog-TAT erneut für acht Tage kultiviert. Die NIH 3T3 Zellen bildeten dann in der zweiten Passage in Abwesenheit von Nanog-TAT keine *Foci* mehr aus und waren nicht von Zellen zu unterscheiden, die zu keinem Zeitpunkt mit Nanog-TAT behandelt wurden (Abbildung 3.10). Im Gegensatz dazu bildeten die NIH 3T3 Zellen wieder *Foci*, wenn sie weiterhin mit Nanog-TAT behandelt wurden,

dabei war die Anzahl der *Foci* in der zweiten Passage der Nanog-TAT Kultivierung nicht größer als in der ersten Passage (Abbildung 3.10).

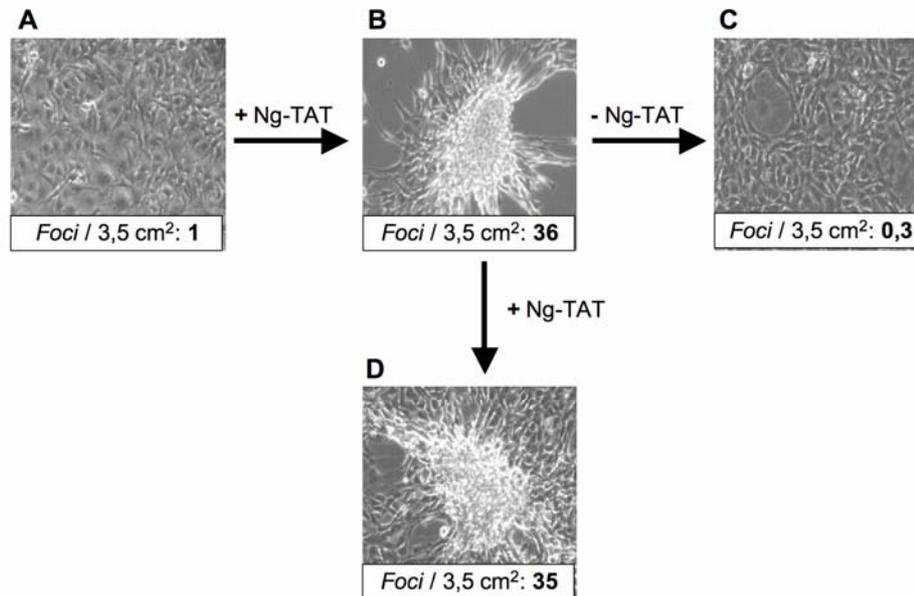


Abbildung 3.10: Die Nanog-TAT induzierte *Foci* Bildung ist reversibel

NIH 3T3 Zellen wurden in geringer Dichte (1000 Zellen / 3,5 cm²) ausgesät und für 8 Tage ohne Nanog-TAT kultiviert und wuchsen als Monolayer (A). Die Zellen wurden dann vereinzelt, erneut in geringer Dichte ausgesät und für 8 Tage in Anwesenheit von 50 nM Nanog-TAT kultiviert. Unter diesen Bedingungen bildeten sich zahlreiche *Foci* (B). Diese Zellen wurden erneut vereinzelt, in geringer Dichte ausgesät und im folgenden in Abwesenheit von Nanog-TAT kultiviert. Es bildeten sich keine *Foci* mehr (C). Die Zellen aus (B) wurden ebenfalls vereinzelt, in geringer Dichte ausgesät und im folgenden in Anwesenheit von 50 nM Nanog-TAT kultiviert. Es bildeten sich erneut *Foci* (D). Die entstandenen *Foci* wurden jeweils gezählt. Daten sind Mittelwerte (n=3).
Abkürzung: Ng-TAT, Nanog-TAT

3.2.5 Nanog-TAT behandelte Zellen bilden vermehrt Kolonien im *Soft-Agar*-Test

Um den Verlust der Kontaktinhibition Nanog-TAT behandelter NIH 3T3 Zellen zu bestätigen wurde ein *Soft-Agar*-Test durchgeführt. Diese Methode wurde auch bei der Analyse von Onkogen-vermittelter Transformation von NIH 3T3 Zellen verwendet (Zohn et al., 1998; Rennefahrt et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden NIH 3T3 Zellen für sechs Tage in Transduktionsmedium mit oder ohne NanogΔHD bzw. Nanog-TAT vorinkubiert. Anschließend wurden sie im *Top-Agar* (0,3 Prozent Agar) auf einer 0,5 Prozent Agar Bodenschicht in 6 cm Petrischalen kultiviert. Dabei wurden zweimal je 1 ml Medium mit bzw. ohne NanogΔHD oder Nanog-TAT auf den *Top-Agar* pipettiert. Nach 19 Tagen konnten

Größe und Anzahl der entstandenen Kolonien am Mikroskop gemessen bzw. gezählt werden. Es zeigte sich, dass die Nanog-TAT behandelten Zellen im *Soft*-Agar mehr als 250 Kolonien mit über 50 μm Durchmesser ausbildeten, von denen ca. 50 Kolonien größer als 200 μm waren (Abbildung 3.11). Das waren fünf bis zehn mal mehr Kolonien als im gleichen Zeitraum bei den unbehandelten Kontrollzellen und den Zellen, die mit Nanog ΔHD behandelt wurden entstanden waren (25 bis 50 Kolonien über 50 μm Durchmesser) Beide Kontrollansätze bildeten nur vereinzelt Kolonien über 200 μm (Abbildung 3.11).

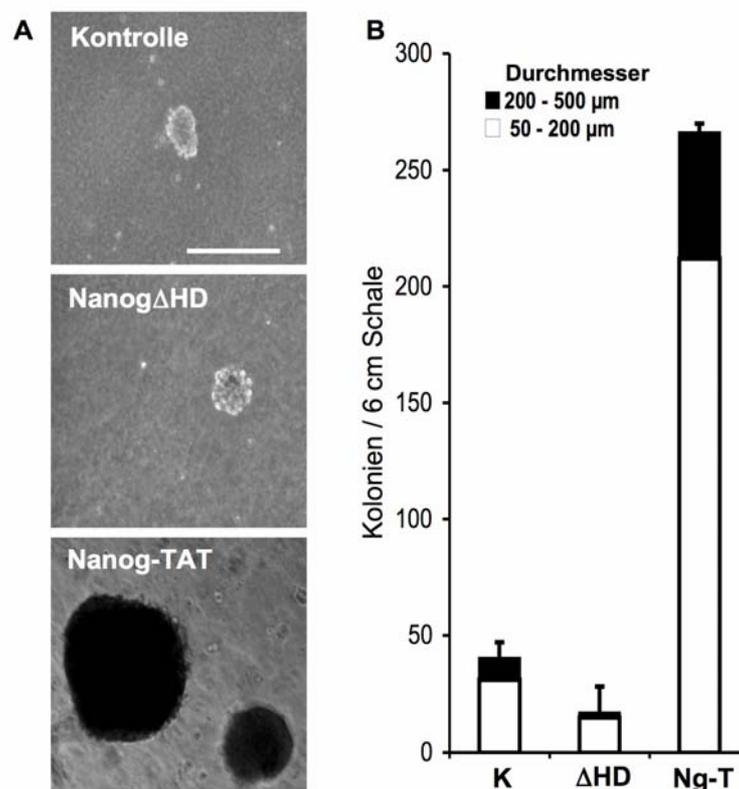


Abbildung 3.11: Nanog-TAT ermöglicht 3T3 Zellen die Koloniebildung im *Soft*-Agar

Zur weiteren Charakterisierung des Nanog-TAT induzierten Verlusts der Kontaktinhibition wurde ein *Soft*-Agar-Test durchgeführt. NIH 3T3 Zellen wurden für 6 Tage in Kontrollmedium, Medium mit 100 nM Nanog ΔHD oder Nanog-TAT vorinkubiert und anschließend im *Top*-Agar auf Petrischalen mit Bodenagar ausgesät. Alle 7 Tage wurde je ein ml Medium mit dem entsprechenden Protein zugegeben. Nach 19 Tagen wurden die entstandenen Kolonien im Phasenkontrast fotografiert (A) und deren Anzahl sowie Größe bestimmt (B).

Daten sind Mittelwerte ($n=2$) mit Standardabweichung.

Skalierung: 200 μm

Abkürzungen: K, Kontrolle; Ng-T, Nanog-TAT; ΔHD , Nanog ΔHD

3.2.6 Nanog-TAT induziert vergrößerte Tumore *in vivo*

Durch die Überexpression von E-Ras transformierte NIH 3T3 Zellen bilden nach Injektion in immunsupprimierte Mäuse vergrößerte Tumore aus (Takahashi et al., 2003). Um die möglicherweise im Vergleich zu unbehandelten NIH 3T3 Zellen veränderten tumorigenen Eigenschaften von Nanog-TAT behandelten Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden hier NIH 3T3 Zellen für acht Tage (zwei Passagen) mit oder ohne Nanog-TAT *in vitro* expandiert. Die Zellen wurden vereinzelt und je $2,7 \times 10^5$ Zellen subkutan in SCID/beige Mäuse injiziert. Diese Mäuse sind immundefizient, so dass körperfremde Zellen nicht abgestoßen werden. Nach 19 Tagen wurden die Tiere auf mögliche Tumore untersucht. Jedes der insgesamt 20 Tiere (11 x Kontrolle, 9 x Nanog-TAT) hatte einen Tumor im Bereich der Injektionsstelle gebildet.

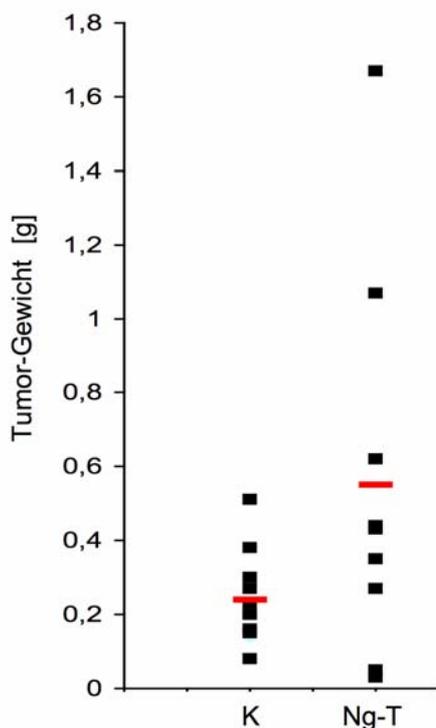


Abbildung 3.12:
Nanog-TAT behandelte 3T3 Zellen verursachen vergrößerte Tumore nach Injektion in immundefiziente Mäuse

NIH 3T3 Zellen wurden für 8 Tage (2 Passagen) mit oder ohne 50 nM Nanog-TAT vorbehandelt und dann subkutan in immundefiziente SCID/beige Mäuse injiziert ($2,7 \times 10^5$ Zellen/Maus). Nach 19 Tagen wurden die entstandenen Tumore präpariert und gewogen. Die roten Balken markieren jeweils das durchschnittliche Gewicht (Kontrolle: n=11, Nanog-TAT: n=9).
Abkürzungen: K, Kontrolle; Ng-T, Nanog-TAT

Die Tumore wurden vom übrigen Gewebe getrennt, mit PBS gewaschen und anschließend gewogen. Dabei zeigte sich, dass die Tumore aus den Tieren mit Nanog-TAT vorbehandelten NIH 3T3 Zellen im Durchschnitt 0,55 Gramm wogen. Sie waren mehr als doppelt so schwerer wie die Tumore, die aus unbehandelten NIH 3T3 Zellen entstanden waren

(durchschnittliches Gewicht: 0,24 Gramm). Auffällig war dabei, dass die maximale Größe der Tumore sehr unterschiedlich war. So wogen die zwei schwersten Tumore der Kontrollgruppe im Mittel 0,45 Gramm, die der Nanog-TAT behandelten dagegen 1,37 Gramm, also 3 mal so viel (Abbildung 3.12).

3.2.7 Einfluss der Phosphoinositid-3-Kinase auf die Nanog-TAT induzierte Transformation

Die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3Kinase) ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus und der Selbsterneuerung von Zellen (Paling et al., 2004). Um mögliche Einflüsse dieser Kinase bei der Nanog-TAT induzierten Proliferationssteigerung bzw. bei dem Verlust der Kontaktinhibition zu untersuchen, wurde ein spezifischer Inhibitor dieser Kinase verwendet (LY294002, Merck, Darmstadt). Es wurde ein Proliferations-Test in An- und Abwesenheit dieses Inhibitors durchgeführt. Die kumulative Zellzahl nach sechs Tagen Kultivierung war in Anwesenheit von DMSO als Kontrolle bei NIH 3T3 Zellen mit Nanog-TAT Behandlung 70 Prozent größer als bei unbehandelten Zellen. Wenn DMSO mit 10 μ M LY294002 verwendet wurde, nahm die Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen stark ab. Nanog-TAT konnte diesen Effekt nicht ausgleichen. Nach sechs Tagen Kultur mit Nanog-TAT und Inhibitor waren, verglichen zur Behandlung ohne Inhibitor, 84 Prozent weniger Zellen entstanden. Ohne Nanog-TAT waren mit Inhibitor 81 Prozent weniger Zellen im Vergleich zur Behandlung ohne Inhibitor vorhanden. Der proliferationsfördernde Effekt von Nanog-TAT im Vergleich zur Kontrolle nahm ebenfalls ab. So waren ohne Inhibitor bei Nanog-TAT behandelten Zellen 70 Prozent mehr Zellen zu beobachten als bei der Kontrolle. Mit Inhibitor betrug die Steigerung dagegen nur noch 40 Prozent (Abbildung 3.13A).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die PI3Kinase essentiell für die Proliferation von NIH 3T3 Zellen ist und auch der proliferationsfördernde Effekt von Nanog-TAT zumindest teilweise mit der Aktivität dieser Kinase verbunden ist, wurde im weiteren der Einfluß der PI3Kinase auf die *Foci* Bildung untersucht. Es wurde ein *Foci* Test von Kontrollzellen und Nanog-TAT behandelten Zellen in An- und Abwesenheit des LY294002 Inhibitors durchgeführt. Ohne Inhibitor (mit DMSO) bildeten die Zellen nur mit Nanog-TAT nach sechs Tagen zahlreiche *Foci* (30 pro 3,5 cm²). Bei Kultivierung mit dem Inhibitor dauerte die Bildung aufgrund der oben beschriebenen verlangsamten Proliferation länger. Nach neun

Tagen waren durchschnittlich 18 *Foci* pro 3,5 cm² zu beobachten. Dies entspricht 60 % der Menge verglichen mit der Nanog-TAT behandelten DMSO Kontrolle (Abbildung 3.13B).

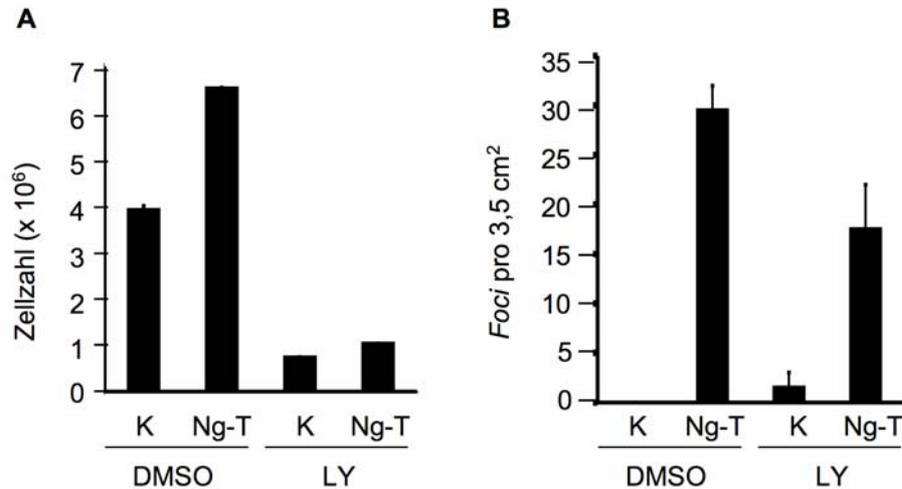


Abbildung 3.13: Einfluss der PI3Kinase auf den transformierenden Effekt von Nanog-TAT

Um den Einfluss der PI3Kinase auf die Nanog-TAT-vermittelten Effekte bezüglich der Transformation von NIH 3T3 Zellen zu untersuchen wurde sowohl die Proliferation als auch die *Foci*-Bildung in An- und Abwesenheit von Nanog-TAT und einem Inhibitor der PI3Kinase analysiert. **(A)** Je 5×10^4 NIH 3T3 Zellen pro 3,5 cm² wurden für 6 Tage in Medium mit oder ohne 50 nM Nanog-TAT und mit oder ohne 10 μ M LY294002 in DMSO kultiviert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen passagiert und gezählt, wobei jeweils gleiche Zellzahlen neu ausgesät wurden. Nach 6 Tagen wurden die kumulativen Zellzahlen bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte (n=2) mit Standardabweichung. **(B)**: Je 1000 NIH 3T3 Zellen pro 3,5 cm² wurden in Medium mit oder ohne 50 nM Nanog-TAT und mit oder ohne 10 μ M LY294002 in DMSO kultiviert. Nach 6 Tagen (*Mock* = DMSO) bzw. nach 9 Tagen (LY294002) wurden die entstandenen *Foci* gezählt. Die Daten sind

3.2.8 Transkriptionsanalyse Nanog-TAT behandelter Zellen

Mittels RT-PCR Analysen wurde untersucht, ob Nanog-TAT in den behandelten NIH 3T3 Zellen die Expression von endogenem Nanog oder anderer Pluripotenzfaktoren wie Oct4 und Rex1 induziert. Dabei zeigte sich, dass NIH 3T3 Zellen keine detektierbare Expression dieser Faktoren aufwiesen und dass Nanog-TAT diese auch nicht induzieren konnte. Die Nanog-TAT induzierten NIH 3T3 *Foci* zeigten zudem keine Alkalische Phosphatase-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Als Vertreter der klassischen Tumorsuppressoren wurde p53 auf RNA-Ebene untersucht. Auch hier konnte keine Nanog-TAT verursachte Veränderung festgestellt werden. Berichte über den Einfluß von Nanog Aktivität in NIH 3T3 Zellen auf JunB, FGFR 1 und BGT2 (Piestun et al., 2006) konnten über eine RT-PCR nicht bestätigt werden (Abbildung

3.14). Der molekulare Wirkmechanismus von Nanog-TAT in NIH 3T3 Zellen bleibt also unbekannt.

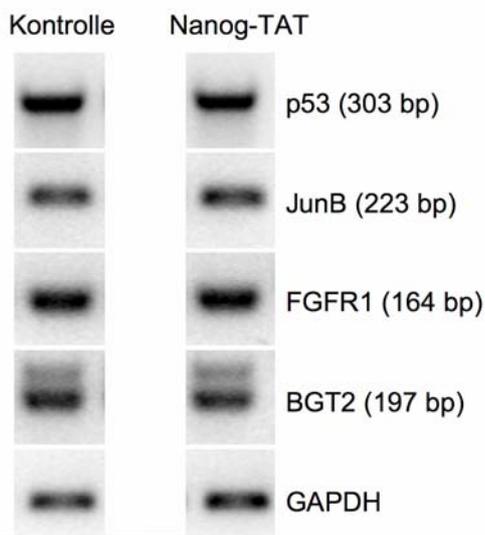


Abbildung 3.14:
Mögliche Signalwege von Nanog-TAT

RT-PCR Analyse von NIH 3T3 Zellen, die für 4 Passagen mit oder ohne Nanog-TAT kultiviert wurden. Die RNA wurde mit Trizol präpariert und mögliche DNA-Kontaminationen durch einen DNase Verdau entfernt. Es wurden jeweils gleiche Mengen an RNA für die RT Reaktion verwendet. Je 2 μ l der resultierenden cDNA wurden für eine PCR Reaktion mit den entsprechenden Primern eingesetzt. Schmelz-Temperatur und Zyklenzahl: P53, 58 °C, 33 Zyklen; JunB, FGFR1, BGT2: 52 °C, 33 Zyklen; GapDH, 55 °C, 23 Zyklen.
Abkürzung: bp, Basenpaare

3.2.9 Nanog-TAT Protein-Transduktion mit primären embryonalen Maus Fibroblasten

Nachdem mit den NIH 3T3 Zellen gezeigt werden konnte, dass die Protein-Transduktion von Nanog-TAT nicht nur bei ES-Zellen sondern auch bei somatischen Zellen spezifische Effekte induziert, wurde nun eine primäre Zell-Linie untersucht. Zu diesem Zweck wurden Oct4-GIP Mäuse mit *Black 6* Mäusen gepaart, um so primäre Fibroblasten-Zellen mit Oct4-GIP Reporter zu erhalten. Mit diesem Reporter kann eine mögliche Reaktivierung des Oct4-Promotors analysiert werden, da er ein *gfp* und ein *pac^r* Gen unter der Kontrolle des Oct4 Promotors trägt (Yeom et al., 1996; Ying et al., 2002). Oct4-GIP ES-Zellen zeigen daher eine deutliche GFP Fluoreszenz und sind Puromycin resistent. Bei den, in der vorliegenden Arbeit präparierten, embryonalen Oct4-GIP Fibroblasten-Zellen wurden mit einer PCR bestätigt, dass es sich um heterozygote Oct4-GIP Zellen handelt (im folgenden MEF Oct4-GIP genannt). Diese Zellen zeigten in Nanog Transduktionsmedium eine normale Proliferation und Morphologie, dabei ist keine GFP Fluoreszenz oder Puromycin Resistenz zu beobachten.

3.2.10 Nanog-TAT beschleunigt die Proliferation von murinen Fibroblasten-Zellen

MEF-Zellen haben im Allgemeinen, verglichen mit immortalisierten Zell-Linien wie den NIH 3T3 Zellen eine eingeschränkte Proliferation (Torado und Green, 1963). Dabei verlangsamt sich die Proliferation *in vitro* mit steigender Passagenzahl und die Zellen werden seneszent (Sherr und DePinho, 2000; Campisi, 2000). Um mögliche Effekte von Nanog-TAT auf das Wachstum, die Transformation und den Differenzierungsgrad von MEF Oct4-GIP Zellen zu untersuchen, wurden diese mit und ohne 50 nM Nanog-TAT kultiviert.

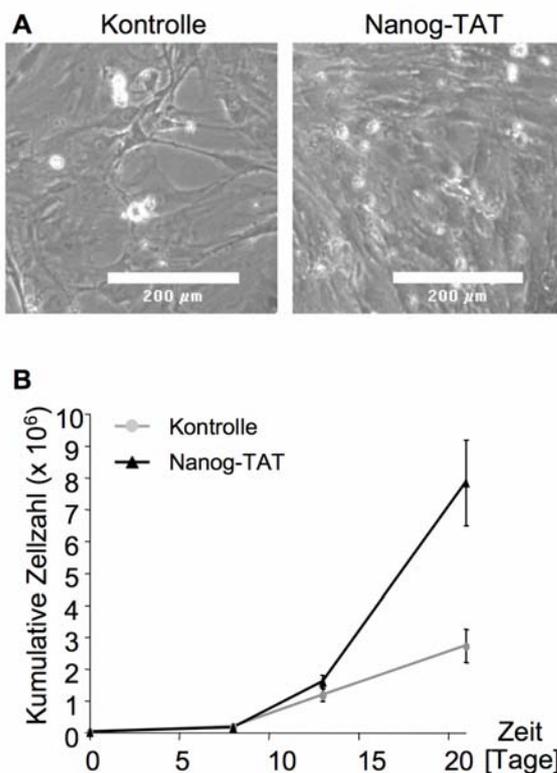


Abbildung 3.15:
Nanog-TAT ermöglicht eine verstärkte Expansion von primären Maus-Fibroblasten

Untersuchung der Proliferationseigenschaften von MEF Oct4-GIP Zellen in Abhängigkeit von Nanog-TAT. Passage 1 Zellen wurden in mittlerer Dichte (2×10^4 Zellen / $3,5 \text{ cm}^2$) ausgesät und in An- oder Abwesenheit von 50 nM Nanog-TAT kultiviert. An Tag 8 und 13 wurden die Zellen gezählt und je Ansatz wieder 2×10^4 Zellen / $3,5 \text{ cm}^2$ ausgesät. An Tag 21 (Passage 4) wurden die Zellen erneut gezählt und die kumulativen Zellzahlen bestimmt. (A) Phasenkontrastaufnahmen von Kontrollzellen und Nanog-TAT behandelten Zellen an Tag 21. (B) Graphischer Verlauf der kumulativen Zellzahlen über die Gesamtdauer von 21 Tagen. Daten sind Mittelwerte ($n=4$) mit Standardabweichung. Skalierung: $200 \mu\text{M}$

Nach 21 Tagen konnte man im Phasenkontrast erkennen, dass die Nanog-TAT behandelten Zellen deutlich dichter gewachsen waren als die entsprechende Kontrolle (Abbildung 3.15A). Die Bestimmung der Zellzahl zeigte, dass die Proliferation der Zellen über den gesamten Versuchszeitraum bei Anwesenheit von Nanog-TAT deutlich erhöht war und nach 21 Tagen 3-mal mehr Zellen entstanden waren als in der Kontrolle (Abbildung 3.15B). Die Nanog-TAT behandelten MEF Oct4-GIP Zellen hatten teilweise eine abgerundete, bipolare Form und

waren kleiner als unbehandelten Kontrollzellen. Es war kein dreidimensionales Wachstum der Zellen zu beobachten (Abbildung 3.15A). Eine GFP Fluoreszenz konnte nicht detektiert werden.

3.2.11 Nanog-TAT blockiert die zelluläre Seneszenz von murinen Fibroblasten-Zellen

Um neben dem proliferationsfördernden Effekt von Nanog-TAT bei MEF Oct-GIP Zellen mit niedriger Passagenzahl auch den Einfluss von Nanog-TAT auf die Seneszenz zu untersuchen, wurden die Zellen für über 100 Tage mit oder ohne Nanog-TAT kultiviert. Bei jeder Passage wurde die Zellzahl bestimmt.

Phasenkontrastaufnahmen nach 50 Tagen und nach 100 Tagen zeigen, dass zu beiden Zeitpunkten die Nanog-TAT behandelten Zellen dichter gewachsen waren und morphologisch weniger differenziert erschienen als die Kontroll-Zellen. Im Gegensatz zu den Nanog-TAT behandelten NIH 3T3 Zellen wuchsen die MEF Oct4-GIP Zellen aber ausschließlich als *Monolayer* mit intakter Kontaktinhibition (Abbildung 3.16A, 3.16B). Eine vom Oct4-GIP Reporter vermittelte GFP Fluoreszenz konnte nicht beobachtet werden.

Die graphische Auswertung der kumulativen Zellzahlen zeigte bei der Kontrolle eine nach zehn bis 20 Tagen einsetzende Seneszenz. Aus der Population langsam wachsender Kontrollzellen bildete sich erst um Tag 50 wieder eine etwas schneller wachsende Zell-Population. Im Gegensatz dazu zeigten die Nanog-TAT behandelten Zellen, wie schon in Abbildung 3.15 gezeigt, bis zum Tag 20 eine deutlich höhere Proliferation. Danach nahm die Teilungsrates der Zellen zwar auch vorübergehend ab, ihr Wert blieb aber zu jedem Zeitpunkt deutlich über dem der Kontrolle. Nach Tag 40 war eine dauerhaft hohe Proliferation der Zellen zu beobachten (Abbildung 3.16C).

Um die verstärkte Expansion der Zellen mit Nanog-TAT zu veranschaulichen, wurde die Vervielfältigung der Nanog-TAT behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle errechnet (Zellzahl Nanog-TAT / Zellzahl Kontrolle) und graphisch aufgearbeitet (Abbildung 3.16 D). Dabei ist zu erkennen, dass sich die Nanog-TAT induzierte Vervielfältigung über die gesamte Versuchsdauer erhöht war und nach 106 Tagen in Anwesenheit von Nanog-TAT die 3×10^5 fache Anzahl an Zellen entstanden war als in der Kontrolle.

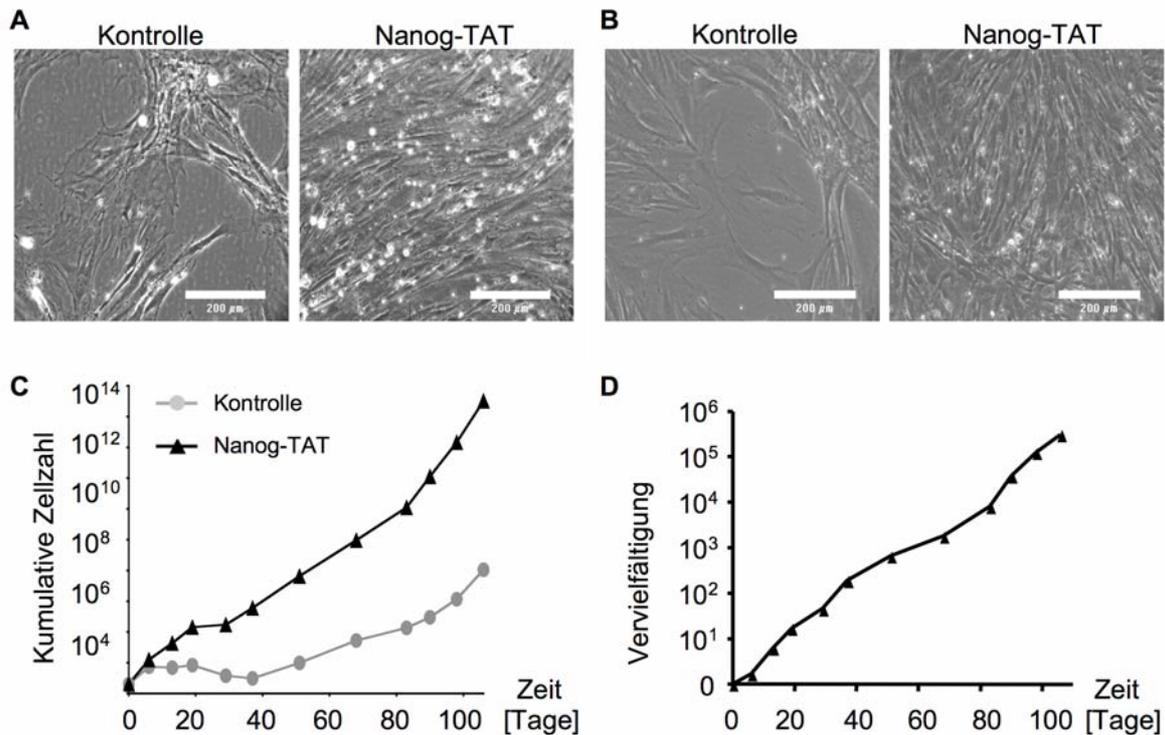


Abbildung 3.16: Nanog-TAT ermöglicht die Langzeitkultur von primären Fibroblasten

MEF Oct4-GIP Zellen wurden für insgesamt 106 Tage mit oder ohne 50 bis 100 nM Nanog-TAT kultiviert. Bei jeder Passage wurden die Zellen gezählt und jeweils gleiche Zellzahlen pro Ansatz neu ausgesät. **(A)** Phasenkontrastaufnahme von Kontroll-Zellen und Nanog-TAT behandelten Zellen nach 50 Tagen Gesamtversuchsdauer; **(B)** wie **(A)** aber nach 100 Tagen Versuchsdauer. **(C)** Graphischer Verlauf (logarithmische Skala) der kumulativen Zellzahlen über den gesamten Versuchszeitraum. **(D)** Nanog-TAT induzierte Vervielfältigung der Gesamtzellzahl im Vergleich zu den Kontrollzellen (logarithmische Skala). Skalierung: 200 μm

3.2.12 Nanog-TAT induzierte Verminderung der zellulären Seneszenz ist mit chromosomaler Stabilität assoziiert

Eine erhöhte Proliferation von Fibroblasten kann durch chromosomale Aberrationen hervorgerufen werden. Dabei kommt es meist zu einer erhöhten Expression von Onkogenen oder einer reduzierten Expression von Tumorsuppressorgenen (Abschnitt 1.6). Um zu untersuchen ob solche Veränderungen der Proliferationssteigerung Nanog-TAT behandelter Zellen zugrunde liegen, wurde der Karyotyp bestimmt. MEF Oct4-GIP Zellen der Ausgangskultur (Passage drei) wurden ebenso analysiert wie MEF Oct4-GIP Zellen, die elf

Passagen mit Nanog-TAT oder ohne Nanog-TAT, wie oben beschrieben (Abschnitt 3.2.11), kultiviert wurden (jeweils Passage 14; Abbildung 3.17).

Dabei zeigte sich, dass die Zellen der Ausgangskultur, bis auf wenige Ausnahmen, mit 40 Chromosomen pro Zelle einen normalen Karyotyp besaßen. Nach der Langzeitkultivierung dieser Zellen (11 Passagen) in Kontrollmedium etablierte sich dagegen eine Zellpopulation mit aberrantem Karyotyp (hypotetraploid). Von 32 untersuchten Metaphasen wies keine einen normalen 2n Chromosomensatz von 40 auf (Abbildung 3.17B).

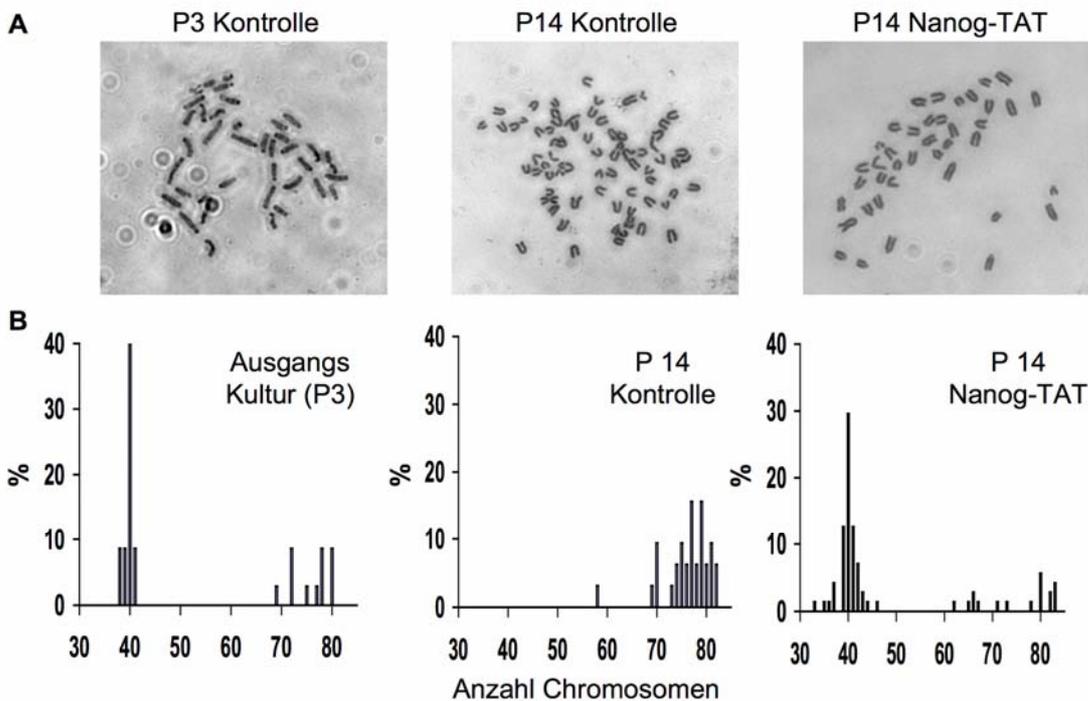


Abbildung 3.17: Nanog-TAT induzierte Verminderung der zellulären Seneszenz ist mit chromosomaler Stabilität assoziiert

MEF Oct4-GIP Zellen aus Abbildung 3.16 wurden auf chromosomale Stabilität untersucht. Dazu wurden Zellen der Ausgangskultur (Passage 3) und Zellen nach 11 Passagen in Kontrollmedium oder Nanog-TAT Medium (jeweils Passage 14) mit *Colcemid* behandelt und nach Inkubation mit hypotonischer KCL Lösung mit Eisessig und Methanol fixiert. Die Chromosomen wurden mit Giemsa-Farbstoff gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt. (A) typische Metaphasen der Zellen nach angegebener Behandlung. (B). Quantitative Auswertung der gezählten Metaphasen (Ausgangskultur P3: n=37 ; Kontrolle P14: n=32; Nanog-TAT P14: n=71).

Vergrößerung: 400x

Abkürzung: P, Passage

71 Metaphasen von MEF Oct4-GIP Zellen, die für den gleichen Zeitraum in Anwesenheit von Nanog-TAT kultiviert wurden und dabei aufgrund der erhöhten Proliferation deutlich mehr Zellteilungen durchlaufen hatten, wurden ebenfalls untersucht. Es zeigte sich, dass diese

Zellpopulation noch einen überwiegend normalen Karyotyp besaß. Dabei wurden bei 30 Prozent der Zellen exakt 40 Chromosomen gezählt und bei 55 Prozent der Zellen 40 Chromosomen +/- 1. Diese Werte sind denen der Ausgangskultur sehr ähnlich, dort waren bei 40 Prozent der Zellen 40 Chromosomen gezählt worden und bei 60 Prozent der Zellen 40 Chromosomen +/- 1 (Abbildung 3.17B).

3.2.13 Die Nanog-TAT Protein-Transduktion ist auf spermatogonialen Stammzellen der Maus anwendbar

Neben ES-Zellen gibt es auch andere Zellen mit pluripotenten Eigenschaften. Ein Beispiel für solche Zellen sind die spermatogonialen Stammzellen (SSC, *spermatogonial stem cells*) die aus dem Hoden von adulten Mäusen gewonnen wurden (Guan et al., 2006). Um zu untersuchen ob die Nanog-TAT Protein-Transduktion auch auf diesen Zellen anwendbar ist, wurden erste Untersuchungen zur Proliferation und zum Pluripotenzerhalt von SSC-Zellen in Anwesenheit von Nanog-TAT durchgeführt.

Die SSC-Zellen können in dem bereits für die Nanog-TAT Behandlung von ES-Zellen, NIH 3T3 Zellen und MEF Oct4-GIP Zellen etabliertem Transduktionsmedium kultiviert werden. Um mögliche Effekte von Nanog-TAT auf die Proliferation der SSC-Zellen zu untersuchen, wurden diese in Medium mit oder ohne Nanog-TAT für zwei Passagen vorinkubiert und dann die Proliferation für fünf Tage beobachtet (Abbildung 3.18A). Es zeigte sich, dass die hohe Proliferation der SSC-Zellen in Anwesenheit von LIF durch die Zugabe von Nanog-TAT kaum weiter gesteigert werden konnte. In Abwesenheit von LIF nahm die Proliferation der Zellen in Kontrollmedium sehr stark ab. Diese Abnahme konnte durch Nanog-TAT teilweise kompensiert werden, so dass nach fünf Tagen Kultivierung in LIF-freiem Medium bei Nanog-TAT Behandlung 3,3 mal mehr Zellen als in der Kontrolle zu beobachten waren.

Im Anschluss wurde die Alkalische-Phosphatase-Aktivität in den unterschiedlich kultivierten SSC-Zellen analysiert. Dabei zeigte sich, dass in Anwesenheit von LIF eine hohe Alkalische-Phosphatase-Aktivität anhand der Blaufärbung der Zellen beobachtet werden konnte, die weitgehend unabhängig von der Nanog-TAT Behandlung war (Abbildung 3.18B). Bei Kultivierung ohne LIF-Zugabe und mit LIF-Inhibitor war in Abwesenheit von Nanog-TAT kaum noch eine Blaufärbung zu beobachten. Die Zugabe von 50 nM Nanog-TAT konnte diesen Verlust etwas reduzieren (Abbildung 3.18B).

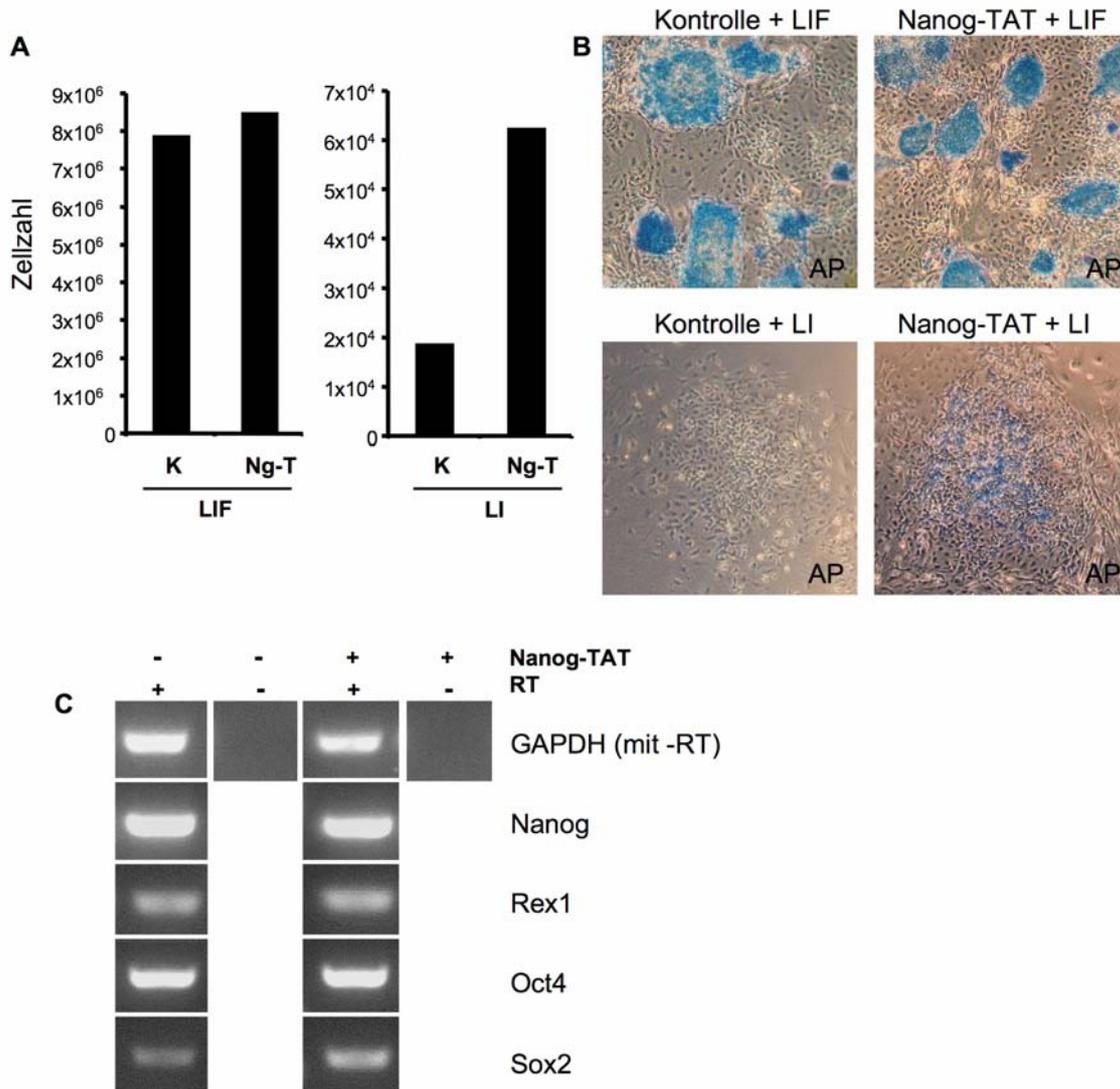


Abbildung 3.18: Nanog-TAT steigert die Proliferation und hemmt die Differenzierung von SSC-Zellen

Um zu untersuchen, ob die Nanog Protein-Transduktion auch auf SSC-Zellen anzuwenden ist, wurden diese in Anwesenheit von Nanog-TAT kultiviert und Effekte auf Proliferation und Pluripotenz erhalten untersucht. SSC-Zellen wurden 6 Tage mit LIF oder LIF-Inhibitor (LI) in Kontrollmedium oder Medium mit 50 nM Nanog-TAT vorinkubiert und anschließend in den entsprechenden Medien neu ausgesät (5000 Zellen / 3,5 cm²). Nach 5 Tagen wurde (**A**) die Zellzahl bestimmt, (**B**) die Zellen mit PFA fixiert und auf Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP) gefärbt und (**C**) die Zellen in *Trizol* aufgenommen und die RNA präpariert. Anschließend wurde eine RT-PCR Analyse mit spezifischen Primern für die angegebenen Gene durchgeführt (dies war für die Ansätze ohne LIF nicht möglich, weil die Zellzahl zu gering war). Es wurden jeweils gleiche RNA Mengen für die RT-Reaktion eingesetzt. PCR Bedingungen (Schmelztemperatur und Zyklenzahl): GAPDH, 55 °C, 23 Zyklen; Nanog, 52 °C, 30 Zyklen; Rex1, 52 °C, 30 Zyklen; Oct4, 52 °C, 30 Zyklen; Sox2, 59 °C, 30 Zyklen.

Vergrößerung: 50x

Abkürzungen: K, Kontrolle; Ng-T, Nanog-TAT; LI, LIF-Inhibitor; AP, Alkalische Phosphatase; RT, Reverse Transkriptase

Eine RT-PCR Analyse der LIF-behandelten Zellen zeigte, dass die Pluripotenzmarker Nanog, Oct4, Rex1 und Sox2 in Kontrollzellen und Nanog-TAT behandelten Zellen exprimiert wurden. Dabei konnten nur minimale Nanog-TAT induzierte Veränderungen der Expressionsmuster festgestellt werden (Abbildung 3.18C).

4. Diskussion

Die Untersuchung transkriptioneller Netzwerke ist essentiell, um die molekularen Mechanismen von (ES)-Zellen zu verstehen. *Gain of function* Studien von Transkriptionsfaktoren können neue Einblicke in deren Wirkungsweisen liefern. Der ES-Zell spezifische Transkriptionsfaktor Nanog ist ein wichtiger Regulator der Pluripotenz und Selbsterneuerung. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Nanog die Reprogrammierung und Transformation von Zellen beeinflussen kann. Die molekulare Analyse dieses Faktors mittels klassischer Überexpression weist aber eine Reihe von Limitierungen auf: a) weder die Stärke noch der zeitliche Verlauf der Expression ist steuerbar; b) durch die Integration der DNA in das Wirtsgenom kann es zur insertionalen Mutagenese kommen (Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Glover et al., 2005) und die eingebrachte DNA kann von regulatorischen Sequenzen des Wirtsgenoms beeinflusst werden; c) die nötige Selektion kann unerwünschte Nebenwirkungen in den Zellen auslösen, welche die Interpretation der Überexpression erschweren.

Ziel dieser Arbeit war es daher ein System zur extrachromosomalen konditionalen Überexpression von Nanog zu etablieren und den Transkriptionsfaktor Nanog mit Hilfe der Proteintransduktion zu untersuchen.

4.1 Etablierung eines *Polyoma*-basierten Vektors zur konditionalen Überexpression

Zur Etablierung eines Überexpressionssystems, das induzierbar ist und möglichst konstante Expressionsleistungen ermöglicht, wurden in der vorliegenden Arbeit die zwei bekannten Techniken Supertransfektion und Rekombination kombiniert: a) Es wurde ein Vektor kloniert, der *Polyoma*-Virus basiert ist und daher in Zellen mit Expression des *Large-T* Antigens extrachromosomal vorliegt und autonom repliziert wird (Gassmann et al., 1995; Camenisch et al., 1996). Zudem besitzt er eine, verglichen mit klassischer Elektroporation, um drei Größenordnungen höhere Transfektionseffizienz (Chambers et al., 2003). b) Die Induzierbarkeit wurde über das Cre/*loxP* System eingebracht. Eine *loxP* flankierte Stopp Kassetten verhindert zunächst die Expression des Zielgens. Die Deletion dieser Kassetten mit dem transduzierbaren HTNCre Protein (Peitz et al., 2002) sollte die Expression des Zielgens ermöglichen.

Mit HcRed als Reporter gen konnte gezeigt werden, dass eine Cre-induzierte Überexpression möglich war. In murinen ES-Zellen mit episomalem pBO1-Red Plasmid konnte nach Cre Transduktion in mehr als 50 Prozent der Zellen eine HcRed Expression beobachtet werden. Als Vorteil gegenüber anderen konditionalen Systemen ist zu bemerken, dass ohne Cre-vermittelte Rekombination keine einzige Zelle eine detektierbare HcRed Expression aufwies. In der Literatur wird beschrieben das im Gegensatz dazu bei Tetracyclin-abhängigen Genexpressionsystem (Tet-System) häufig auch ohne Induktion eine Hintergrundexpression beobachtet wurde oder die durch Tet regulierte Genaktivität nicht wieder vollständig herstellbar war (Deans et al., 2007; Zhu et al., 2007). In den E14T ES-Zellen wird eine mögliche Hintergrundexpression auch vermieden, weil das Plasmid extrachromosomal vorliegt und daher nicht von regulatorischen Sequenzen der Chromosomen beeinflusst wird (Gassmann et al., 1995; Camenisch et al., 1996). Diese können unter anderem durch *Enhancer* Sequenzen die Expression anschalten (Kühn und Schwenk, 1997). Die in dieser Arbeit ausgeführten Expressionsanalysen haben gezeigt, dass für die dauerhafte Expression von HcRed ein Selektionsdruck nötig ist. Dazu hat es sich als sehr nützlich erwiesen, dass das HcRed Gen über eine *IRES* Sequenz mit einem Resistenzgen ($hygro^r$) verbunden ist. Wurde dieser Selektionsdruck entfernt war nach wenigen Passagen nur noch eine vereinzelte HcRed Expression zu beobachten. Ursache dafür könnten toxische Effekte des HcRed sein, die zu einer verminderten Expression führen können (Mutskov und Felsenfeld, 2004), wie sie auch bei der Expression von GFP beobachtet wurden (Lui et al., 2001).

Es kann festgehalten werden, dass mit dem pBO1-Vektorsystem in E14T ES-Zellen die stabile Überexpression von Genen mit hohem Expressionsniveau möglich ist. Die Expression ist induzierbar und weist ohne Induktion keine Hintergrundexpression auf. Die verwendeten Zellen müssen aber das *Polyoma Large-T* Antigen exprimieren.

In NIH 3T3 Zellen, die kein *Large-T* Antigen exprimieren, kann das Plasmid nur linearisiert für die klassischen Transfektion mit Integration in das Wirtsgenom eingesetzt werden, weil das Plasmid extrachromosomal nicht stabil repliziert werden würde. Es war möglich, nach Transfektion von NIH 3T3 Zellen mit pBO1-Red eine puromycinresistente Zellpopulation zu gewinnen. Nach Cre-vermittelter Rekombination war aber zunächst keine HcRed Expression zu beobachten. Erst nach Selektion mit Hygromycin konnte eine HcRed positive Zellpopulation gewonnen werden. Möglicherweise war das Expressionsniveau anfangs zu niedrig, so dass die Fluoreszenz nicht detektiert werden konnte. Der CAG-Promotor war zumindest vor der Cre-Rekombination funktionsfähig, da die Zellen Puromycin resistent waren und das pac^r Gen auch unter der Kontrolle dieses Promotors liegt (Abbildung 3.1)

Bereits erwähnte toxische Effekte könnten auch hier von Bedeutung sein. Die Verwendung von NIH 3T3L Zellen mit Expression des *Large-T* Antigens würden eine Supertransfektion ermöglichen bei der höhere Expressionsleistungen gezeigt werden konnten (Camenisch et al., 1996). Dies könnte auch hier eine stärkere Überexpression von pBO1-Red in NIH 3T3L Zellen zur Folge haben, wie es in E14T ES-Zellen beobachtet wurde.

4.2 Überexpression von Nanog in ES-Zellen und somatischen Zellen

Nachdem mit HcRed als Reportergen die Funktionalität des pBO1-Vektorsystems gezeigt wurde, sollte mit diesem System die konditionale Überexpressions von Nanog in ES-Zellen analysiert werden. Nach Cre-vermittelter Induktion konnte tatsächlich eine deutliche Überexpression von Nanog mit Antikörperfärbungen nachgewiesen werden. Verglichen zu Zellen ohne das pBO1-Nanog Plasmid oder ohne Cre-vermittelte Induktion war die Antikörperfärbung wesentlich intensiver. Vorangegangene Studien zur Überexpression von Nanog in ES-Zellen haben ebenfalls Systeme verwendet, die eine, bezogen auf endogenes Niveau, um 4 bis 5 fache Menge an Nanog Protein exprimieren (Mitsui et al., 2003, Yates und Chambers 2005).

Die Nanog-überexprimierenden Zellen der vorliegenden Arbeit waren auch morphologisch von den Kontrollzellen zu unterscheiden, da kaum noch spontane Differenzierung zu beobachten war. Eine Antikörperfärbung gegen die Stammzellmarker Oct4 und SSEA1 zeigte, dass diese Marker in ES-Zellen mit Nanog Überexpression stärker und gleichmäßiger exprimiert wurden, als in Kontrollzellen. Auch die Morphologie der Nanog-überexprimierenden Zellen war sehr gleichmäßig und es war kaum Differenzierung zu beobachten. Bemerkenswert ist dabei, dass die Nanog Überexpression in den Zellen unterschiedlich stark war und in einer entsprechenden Antikörperfärbung ein mosaikartiges Muster zeigte. Entweder ist die starke Nanog Expression in etwa 50 Prozent der Zellen einer ES-Zell-Kolonie ausreichend, um die Differenzierung der gesamten Kolonie zu blockieren oder die schwächer gefärbten Zellen exprimieren bereits eine für die Blockierung der Differenzierung hinreichende Menge an Nanog. Die letztere Erklärung ist wahrscheinlicher, da die Antikörperfärbung dieser Zellen immer noch intensiver ist als die von ES-Zellen ohne Nanog Überexpression.

Der Pluripotenz-fördernde Effekt von Nanog wurde mit einem Klonogenitätstest in Abwesenheit von LIF weiter untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur ES-Zellen mit Nanog

Überexpression in ES-Zell-Medium ohne LIF für mehr als eine Passage AP-positive Kolonien bilden konnten. Auch bei der Nanog Überexpression durch klassische Transfektion in E14Tg2a und ZIN40 ES-Zell-Linien konnte gezeigt werden, dass Nanog die Bildung von ES-Zell-Kolonien in einem LIF-freien Kolonogenitätstest fördert. Allerdings wurde bei dieser Studie der Klonogenitätstest nur für eine Passage durchgeführt, so dass keine Aussagen zur Stabilität der Nanog-Expression möglich sind (Chambers et al., 2003). Im Gegensatz zu dieser Studie konnten die Nanog überexprimierenden ES-Zellen in der vorliegenden Arbeit für drei Passagen LIF-unabhängig in klonaler Dichte wachsen und konnten danach ohne LIF expandiert werden. Dieser Befund bestätigt die dauerhafte und hohe Expressionsleistung mit dem verwendeten Vektorsystem pBO1. Dabei waren die meisten AP-positiven Kolonien in Anwesenheit eines Selektionsdrucks, der vermutlich zu einer Anreicherung von Zellen mit einer hohen Nanog Expression führt, zu beobachten. Eine besonders starke Nanog Überexpression in ES-Zellen scheint also die Selbsterneuerung in Abwesenheit von LIF am effektivsten zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu gibt es bei der Überexpression von Oct4 einen relativ engen Bereich, in dem die ES-Zellen in Anwesenheit von LIF pluripotent bleiben. Sowohl eine Verringerung als auch eine Erhöhung der Oct4 Konzentration führen zur Differenzierung (Niwa et al., 2000; Abbildung 1.2).

In NIH 3T3 Zellen wurde das pBO1-Nanog Plasmid analog zu pBO1-Red durch Transfektion eingebracht, um zu analysieren, ob die Überexpression des Stammzell-Faktors Nanog in diesen somatischen Zellen mit dem pBO1 Vektorsystem möglich ist. Tatsächlich war acht Stunden nach Start der HTNCre Behandlung eine Nanog Transkription zu beobachten, die aber deutlich schwächer war als die endogene Nanog Transkription in ES-Zellen. Die Stärke der Transkription nahm in den folgenden 56 Stunden deutlich ab und war dann mit RT-PCR kaum noch nachweisbar. Ohne Cre-Behandlung war keine Hintergrundtranskription von Nanog detektierbar. Spätere Zeitpunkte konnten nicht analysiert werden, weil die Zellen abstarben, was für eine toxische Wirkung der Nanog Überexpression spricht. Zellen die analog mit pBO1-Red behandelt wurden, konnten für mehrere Wochen kultiviert werden, woraus geschlossen werden kann, dass der Grund für das Absterben der Zellen Nanog spezifisch sein muss. Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden zwei Publikationen veröffentlicht, welche die Überexpression von Nanog in NIH 3T3 Zellen beschreiben. Dabei wurde in einer Studie murines Nanog stabil in NIH 3T3 Zellen transfiziert. Auch in dieser Studie waren sowohl die Nanog RNA-Menge als auch die Proteinmenge deutlich geringer als bei ES-Zellen (Zhang et al., 2005). Ein zeitlicher Verlauf der Expression wurde nicht

untersucht. Nanog überexprimierende Zellen konnten aber für mindestens sieben Tage kultiviert werden und zeigten eine leicht erhöhte Proliferation, so dass die hier beobachteten toxischen Effekte nicht bestätigt wurden. In der zweiten Studie wurden NIH 3T3 Zellen mit Viren transduziert die eine ektopische Expression von humanem Nanog induzieren. Hier zeigt sich eine leicht erhöhte Proliferation der Zellen und ein transformierter Phänotyp. Die Expressionsstärke und deren zeitlicher Verlauf ist in dieser Studie ebenfalls nicht gezeigt (Piestun et al., 2006).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass der neu entwickelte pBO1 Vektor besonders in ES-Zellen erfolgreich eingesetzt werden konnte. Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Vektorsystem bildete darüberhinaus die Grundlage für eine Reihe von Überexpressionsanalysen in der Arbeitsgruppe. So konnte gezeigt werden, dass mit einem pBO1-Sox2 Plasmid eine induzierbare Überexpression von Sox2 in E14T ES-Zellen erreicht werden kann, die eine verstärkte Nanog Transkription bewirkt (Hesse, 2007). Auch die Deaktivierung der Überexpressionskassette durch FLP-vermittelte Deletion konnte in Zusammenarbeit mit Katrin Hesse mittels einer PCR gezeigt werden (Hesse, 2007).

In humanen ES-Zellen ist mit dem pBO1 Vektorsystem ebenfalls eine konditionale Überexpression möglich. Hier konnte sowohl HcRed als auch eGFP Expression induziert werden. Dabei war es mit entsprechender Selektion möglich, eine humane ES-Zell-Population zu isolieren, die zu 98 Prozent eGFP positiv war. Zudem wurde eine Deaktivierung der Überexpression in 20 Prozent der Zellen durch FLP-vermittelte Rekombination gezeigt (Jungverdorben, 2007). Dabei hat eine vergleichende Studie gezeigt, dass nur der im pBO1 Vektor verwendete CAG Promotor mit dem PyF101 *Enhancer* eine dauerhafte Expression von mehr als 120 Passagen in humanen ES- und EC-Zellen ermöglicht (Liew et al., 2007).

4.3 Proteintransduktion von Nanog-TAT in somatische Zellen

Um die zeit- und dosisabhängige Wirkung des Nanog-Proteins in somatischen Zellen zu analysieren, wurde die Protein-Transduktion von Nanog auf diesen Zellen etabliert. Grundlage dieser Arbeit war das in der Arbeitsgruppe generierte Nanog-TAT (Peitz, 2007). Dieses zellpermeable Protein kann in *E.coli* Bakterien exprimiert werden und anschließend über einen *His-Tag* mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Das rekombinante Nanog-TAT Protein kann in den Zellkern gelangen und ist biologisch aktiv. Dies ermöglicht

eine LIF-freie Kultur von ES-Zellen über mehrere Passagen durch die Zugabe von Nanog-TAT (Peitz, 2007), wie sie auch durch die Nanog Überexpression erreicht werden kann (Abschnitt 4.2; Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Vorausgegangene Studien zur Transduktion von Proteinen mit den Rekombinasen Cre (Peitz et al., 2002) und Flp (Patsch, 2005) haben gezeigt, dass die Transduktionseffizienz bei Fibroblasten-Zellen besonders hoch ist. Dabei sind, verglichen zu ES-Zellen, geringere Konzentrationen von HTNFlp und HTNCre ausreichend, um Rekombinationseffizienzen von mehr als 70 Prozent (HTNFlp) bzw. 95 Prozent (HTNCre) zu erzielen. Da die Löslichkeit von Nanog-TAT limitiert ist und in dem verwendeten Transduktionsmedium maximal 100 nM beträgt, wurden auch für die Etablierung der Nanog-TAT Protein-Transduktion auf somatischen Zellen Fibroblasten gewählt. Diese Zellen sind darüber hinaus ein gut charakterisiertes System zur Untersuchung von Proliferation, Transformation und Reprogrammierung.

4.4 Reversible Transformation von NIH 3T3 Zellen durch Nanog-TAT

Die Behandlung von NIH 3T3 Zellen mit Nanog-TAT führte zur reversiblen Bildung von dreidimensionalen *Foci* und die Zellen konnten vermehrt Kolonien im *Soft-Agar* formen. Das dreidimensionale Wachstum und die vermehrte Koliniebildung von NIH 3T3 Zellen in *Soft-Agar* ist auch bei der Überexpression von Onkogenen wie E-Ras (Takahashi et al., 2003), v-Ras oder v-Raf (Zohn et al., 1998; Rennefahrt et al., 2002) beobachtet worden und geht mit einer beschleunigten Teilungsrate einher. Auch die Nanog-TAT behandelten Zellen proliferierten schneller als die unbehandelte Kontrolle. Zusätzlich konnte mit einer inaktiven, nicht transduzierbaren Variante von Nanog (Nanog Δ HD) keiner der oben genannten Effekte beobachtet werden. Deswegen kann ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte durch bakterielle Verunreinigungen bei der Proteinaufreinigung verursacht wurden, da Nanog-TAT und Nanog Δ HD analog aufgereinigt wurden. Nanog-TAT verursacht also spezifisch eine reversible Transformation der NIH 3T3 Zellen, die durch den Verlust der für diese Zellen charakteristischen Kontaktinhibition und einer erhöhten Proliferation gekennzeichnet war.

Mit der Methode der Protein-Transduktion war es möglich, die Effekte von Nanog-TAT zeit- und dosisabhängig zu untersuchen. Dabei zeigte sich sowohl bei der erhöhten Teilungsrate als auch bei der *Foci*-Bildung eine Abhängigkeit von der Nanog-TAT Konzentration. Konzentrationen von 25 nM oder weniger bewirkten kaum Effekte, die höchste Teilungsrate

und *Foci*-Bildung war bei 50 nM zu beobachten. Eine weitere Steigerung der Nanog-TAT Konzentration führte letztlich zu einer geringeren Teilungsrate und *Foci*-Bildung. Dies könnte auf toxische Effekte bei zu hoher Nanog-TAT Konzentration in den Zellen zurückzuführen sein, wie sie auch schon bei der Überexpression von Nanog beobachtet wurden (Abschnitt 4.2). Diese Effekte sind zwar bei der Behandlung von ES-Zellen mit Nanog-TAT nicht zu beobachten, aber in ES-Zellen ist auch ein anderes Transkriptionsmuster aktiv, welches deutlich höhere Mengen von endogenem Nanog bewirkt, als es in NIH 3T3 Zellen durch Überexpression erreichbar ist (Abschnitt 4.2). Außerdem wird vermutet, dass Fibroblasten-Zellen das Nanog-TAT Protein effizienter aufnehmen als ES-Zellen, wie es für HTN^{Cre} und HTN^{Flp} beschrieben wurde. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Nanog-TAT Konzentration in den Fibroblasten-Zellen bei gleicher Konzentration im Medium höher ist als in ES-Zellen. Es ist aber auch möglich, dass die toxische Wirkung nicht von dem aufgenommenen Nanog-TAT Protein bewirkt wird, sondern durch bakterielle Verunreinigungen.

Nicht nur die Konzentration von Nanog-TAT hat Einfluss auf die Anzahl der sich bildenden *Foci* einer NIH 3T3 Kultur, sondern auch die Inkubationsdauer. Erst ab einer Behandlungsdauer von 48 Stunden war die Bildung von mehr als 20 *Foci* pro 3,5 cm² zu beobachten. Die Anzahl der *Foci* konnte mit verlängerter Inkubationsdauer dann nur noch leicht gesteigert werden und erreichte ihr Maximum nach fünf Tagen. Danach traten wieder toxische Effekte auf. Wie lange aktives Nanog-TAT in den Zellen verbleibt, bevor es abgebaut wird, ist dabei nicht bekannt, da weder die intrazelluläre Halbwertszeit von Nanog noch die von Nanog-TAT experimentell bestimmt werden konnte. Grund dafür ist unter anderem die Tatsache, dass transduzierte Proteine zum Großteil in Vesikeln verbleiben und nicht in das Zytoplasma gelangen (Wadia et al., 2004; Tünnemann et al., 2006; Peitz et al., 2007). Die in den Vesikeln eingeschlossenen Proteine können keine biologische Aktivität ausüben, verfälschen aber Konzentrations-Messungen oder mikroskopische Analysen, da sie die aktiven Proteine im Zytoplasma überlagern.

Wenn man nach der Vereinzelung einer *Foci*-Kultur das Nanog-TAT Protein aus dem Medium entfernt, bilden sich keine *Foci* mehr. Der Verlust der Kontaktinhibition ist also reversibel. Diese Feststellung wurde erst durch die kontrollierte Anwendung der Nanog-TAT Protein-Transduktion ermöglicht.

Der transformierte Phänotyp der Nanog-TAT behandelten NIH 3T3 Zellen wurde auch in einem *Soft-Agar* Test und mit *in vivo* Versuchen analysiert. Dabei bildeten die Nanog-TAT behandelten Zellen deutlich mehr Kolonien im *Soft-Agar* als die Kontrollzellen. Dies bestätigt

den Verlust der Kontaktinhibition. Die Kolonien waren zudem deutlich größer, was zusätzlich auf eine erhöhte Teilungsrateschließen lässt. Nach Injektion von Nanog-TAT behandelten NIH 3T3 Zellen in *Scid/beige* Mäuse bilden diese vergrößerte Tumore aus, verglichen zur Injektion mit Kontrollzellen. Der Unterschied zwischen Nanog-TAT behandelten Zellen und Kontrollzellen ist hier aber wesentlich geringer als bei der *Foci*-Bildung und dem *Soft-Agar* Test. Die Ursache liegt vermutlich in der Reversibilität der Nanog-TAT induzierten Transformation. Nach Injektion der Zellen in die Mäuse ist keine weitere Nanog Behandlung mehr möglich. Daher verlieren die Nanog-TAT behandelten Zellen im Verlauf der Versuchsdauer (19 Tage) vermutlich ihren transformierten Phänotyp. Das höhere Gewicht der Tumore von Nanog-TAT behandelten Zellen ist wahrscheinlich auf eine verstärkte Proliferation nach Injektion der Zellen zurückzuführen, als diese noch biologisch aktives Nanog-TAT enthielten.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zur Transformation von NIH 3T3 Zellen durch Nanog-TAT korrelieren teilweise mit zwei in jüngster Zeit veröffentlichten Studien zur Überexpression von Nanog in diesen Zellen (Zhang et al., 2005; Piestun et al., 2006). Allerdings induzierte in einer Veröffentlichung die Überexpression von murinem Nanog in NIH 3T3 Zellen nur eine Proliferationssteigerung über eine Passage. Die zweite Studie untersuchte die Überexpression von humanem Nanog in NIH 3T3 Zellen und zeigte eine beschleunigte Proliferation sowie einen Verlust der Kontaktinhibition, welcher zur *Foci*-Bildung führte und Wachstum im *Soft-Agar* ermöglichte. Dies bestätigt die Befunde der vorliegenden Arbeit. Dabei ist zu beachten, dass schon bei der Analyse des Nanog Proteins in ES Zellen gezeigt werden konnte, dass die Effekte von humanem Nanog in murinen Zellen deutlich geringer sind als die von Maus Nanog (Chambers et al., 2003). Möglicherweise ist diese geringere Aktivität des humanen Nanogs ursächlich für die geringere Toxizität, verglichen zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zur Überexpression von Nanog. Bei dem verwendeten viralen Überexpressionssystem gibt es keine Möglichkeit, die Dauer oder die Intensität der Überexpression zu beeinflussen und es werden keine Aussagen über eine Reversibilität der beobachteten Transformation gemacht.

Den Zusammenhang zwischen Stammzellfaktoren und Transformation belegt die Tatsache, dass nicht nur Nanog zur Transformation von NIH 3T3 Zellen führt, sondern auch der Stammzellfaktor Oct4. Swiss 3T3 Zellen, die Oct4 überexprimieren, verlieren ebenfalls die Kontaktinhibition und bilden Kolonien im *Soft-Agar* und Tumore in *cd1 nude* Mäusen

(Gidekel et al., 2003). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Überexpression von Oct4 in Mäusen zur Tumorbildung in epitelialen Geweben führt (Hochedlinger et al., 2005).

Eine Überexpression des ES-Zell-spezifischen Faktors E-Ras führt bei NIH 3T3 Zellen nicht nur zu einer beschleunigten Proliferation *in vitro*, sondern verursacht auch vergrößerte Tumore nach Injektion in immundefiziente Mäuse (Takahashi et al., 2003).

Es gibt also eine Reihe von Hinweisen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, die eine transformierende Wirkung von Stammzellfaktoren in somatischen Zellen nahe legen. Über die molekularen Mechanismen dieser Transformation ist dagegen wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss der PI3Kinase gezeigt werden. Wenn diese Kinase durch einen spezifischen Inhibitor gehemmt wird, kann Nanog-TAT bei NIH 3T3 Zellen keinen proliferationsfördernden Effekt mehr bewirken. Der Verlust der Kontaktinhibition scheint aber durch die Inaktivierung dieser Kinase kaum beeinflusst zu werden. In Anwesenheit von Nanog-TAT und des PI3Kinase Inhibitors bildeten sich zwar weniger *Foci* als mit Nanog-TAT alleine, ursächlich für diese Reduzierung scheint aber hauptsächlich die deutlich verlangsamte Proliferation der Zellen in Anwesenheit des Inhibitors zu sein. Die PI3Kinase spielt auch bei der E-Ras vermittelten Proliferationssteigerung in NIH 3T3 Zellen eine entscheidende Rolle. Auch hier kann der Effekt durch einen PI3Kinase Inhibitor blockiert werden (Takahashi et al., 2003). Bei der Überexpression von humanem Nanog in NIH 3T3 Zellen wurde eine verstärkte Transkription von *Jun-b*, *BGT2* und *FGFR1* beschrieben (Piestun et al., 2006). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden und könnte daher ein sekundärer Effekt der genetischen Manipulation sein. Bei der Überexpression von Oct4 *in vivo* geht die Transformation mit einer gesteigerten β -catenin Expression einher (Hochedlinger et al., 2005). Ob dies bei der Behandlung mit Nanog-TAT auch der Fall ist, bleibt zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit hat neue Erkenntnisse über die Wirkung von Nanog-TAT in NIH 3T3 Zellen geliefert. Erstmals konnte eine Zeit- und Dosisabhängigkeit der Nanog-TAT induzierten Effekte zur Proliferationssteigerung und Transformation gezeigt werden. Darüber hinaus wurde die Reversibilität der Transformation beobachtet und es konnten erste *in vivo* Daten zur Transformation von NIH 3T3 Zellen generiert werden.

4.5 Expansion primärer Zellen mit Nanog-TAT

NIH 3T3 Zellen sind immortalisiert und besitzen einen hypotetraploiden Karyotyp (Torado und Green, 1963). Sie sind daher mit Zellen, die in der regenerativen Medizin eingesetzt werden könnten, schlecht zu vergleichen. Deshalb wurde die Wirkung von Nanog-TAT auch auf primären Fibroblasten-Zellen untersucht, die nicht immortalisiert sind und in der Regel einen intakten Chromosomensatz besitzen. Um zusätzlich eine mögliche Reaktivierung des Oct4 Promotors beobachten zu können wurden MEF Zellen hergestellt, die das Oct4-GIP Transgen tragen und bei aktivem Oct4 Promotor grün fluoreszieren und Puromycin-resistent sind (Yeom et al., 1996; Ying et al., 2002). In den experimentellen Ansätzen der vorliegenden Arbeit bewirkte Nanog-TAT eine erhöhte Proliferation von MEF Oct4-GIP Zellen, die über mehr als 12 Passagen zu beobachten war. Auch die in Kontrollzellen einsetzende zelluläre Seneszenz konnte inhibiert werden. Dabei zeigten Nanog-TAT behandelte MEF-Oct-GIP Zellen auch nach über 100 Tagen in Kultur noch einen überwiegend normalen Karyotyp. Nanog-TAT scheint also die Proliferation von MEF-Zellen zu fördern und gleichzeitig den Karyotyp zu erhalten. Dies ist mit der Selbsterneuerung in ES-Zellen vergleichbar. MEF-Zellen, die ohne Nanog-TAT dauerhaft in Kultur gehalten wurden, zeigten dagegen eine langsamere Teilungsrates und einen hypotetraploiden Karyotyp, wie er charakteristisch für transformierte Zell-Linien ist, die aus MEF-Zellen etabliert werden (Todaro und Green, 1963; Campisi, 2001). Neben dem stabilen Karyotyp zeigten die Nanog-TAT behandelten MEF-Zellen auch keinen Verlust der Kontaktinhibition, wie er bei den NIH 3T3 Zellen beobachtet wurde. Nanog-TAT scheint also eine bereits immortalisierte Zell-Linie wie die NIH 3T3 Linie weiter zu transformieren, primäre Zellen wie ES-Zellen oder MEF-Zellen zeigen dagegen keine Anzeichen einer Transformation, wenn durch Überexpression (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003) oder Protein-Transduktion (Peitz, 2007; Abschnitt 3.2.11 und 3.2.12) vermehrt Nanog Protein in den Zellen vorliegt. Eine durch GFP-Fluoreszenz angezeigte Reaktivierung des Oct4-Promotors der MEF-Oct4-GIP Zellen konnte mit der Nanog-TAT Behandlung nicht induziert werden. Nanog alleine scheint also nicht auszureichen, um in MEF Zellen Pluripotenz zu induzieren, obwohl Nanog bei der Zellfusion den Transfer von Pluripotenz fördert (Silva et al., 2006).

Die Möglichkeit, mit Nanog-TAT primäre Zellen zu expandieren, ohne eine zelluläre Transformation zu bewirken, könnte für die Gewebersersatztherapie von großem Nutzen sein. Bei diesen Therapien ist die schlechte Proliferation von primären Zellen *in vitro* eine

Hauptlimitierung (Sipe, 2002). Die molekularen Mechanismen, die der dauerhaften Proliferation von Nanog-TAT behandelten MEF-Zellen zugrunde liegen, sind noch unbekannt. Erste Untersuchungen mit MEF-Oct-GIP-Zellen zeigen, dass p53 nicht von Nanog beeinflusst wird, aber das Tumorsuppressorgen p27 in Anwesenheit von Nanog-TAT schwächer exprimiert wird (Münst, persönliche Mitteilung).

Die Nanog Protein-Transduktion hat wesentliche Erkenntnisse über den Einfluss von Nanog-TAT auf das Proliferationsverhalten von MEF-Zellen geliefert und einen neuen Weg zur Expansion von primären Zellen aufgezeigt.

4.6 Übertragung der Nanog Protein-Transduktion auf weitere Zell-Linien

Mit der Protein-Transduktion von Nanog-TAT ist es möglich, auch in anderen als den oben beschriebenen Zell-Linien Nanog *gain of function* Studien durchzuführen. Aufgrund der Löslichkeitslimitierungen von Nanog-TAT in Serum-freien Medien ist dies zur Zeit jedoch nur mit Zellen möglich, die in Anwesenheit von ein bis fünf Prozent FKS kultiviert werden können. Pluripotente SSC-Zellen, die aus dem Hoden adulter Mäuse gewonnen wurden (Guan et al., 2006), können in Nanog Transduktionsmedium kultiviert werden. Hier zeigten erste Versuche mit Nanog-TAT eine erhöhte Proliferation und eine geringere Differenzierung bei LIF Entzug. Die Übertragung der Nanog-TAT Protein-Transduktion auf neue Zell-Linien ist also möglich und kann zu neuen Erkenntnissen über den Einfluss von Nanog auf unterschiedliche Zellen führen.

4.7 Ausblick

Das Vektorsystem pBO1, das sowohl in murinen als auch in humanen ES-Zellen eine konditionale Überexpression ermöglicht, kann auf weitere Zell-Linien und mit verschiedenen Zielgenen angewendet werden. Ein Screen nach neuen Faktoren, welche die Reprogrammierung, Transformation oder Differenzierung bewirken, ist ebenfalls möglich. Um Nanog Aktivität in neuralen Zellen untersuchen zu können, die nicht in Anwesenheit von FKS kultiviert werden können und daher zur Zeit nicht mit Nanog-TAT behandelbar sind, sollen ES-Zellen mit pBO1-Nanog Plasmid zu neuralen Vorläuferzellen differenziert werden (Brüstle et al, 1997; Conti et al., 2005). Mit HTNCRE könnte dann zu verschiedenen Zeitpunkten der neuralen Differenzierung die Expression von Nanog induziert werden (Haupt et al., 2007). Um die konditionale Überexpression von Nanog und weiteren Kandidatengenen in NIH 3T3 Zellen zu verbessern, ist es geplant, 3T3 Zellen zu verwenden, die das *Polyoma Large-T* Antigen exprimieren und so eine Supertransfektion ermöglichen.

Die Protein-Transduktion von Nanog-TAT in MEF-Zellen und NIH 3T3 Zellen hat gezeigt, dass Nanog-TAT einen Einfluss auf die Proliferation und die Transformation dieser Zellen hat. Die molekularen Mechanismen sind bis heute weitgehend unbekannt und müssen noch analysiert werden. Zu diesem Zweck eignet sich die Nanog-TAT-Transduktion, weil eine zeit- und dosisabhängige Untersuchung möglich ist.

Die Nanog Überexpression verbessert den Transfer der Pluripotenz bei der Reprogrammierung nach Fusion (Silva et al., 2006). Nanog-TAT könnte also eingesetzt werden, um bestehende Verfahren zur Reprogrammierung zu verbessern (Abschnitt 1,7; Abbildung 1.3). Andere Techniken, die bis heute nur zu einer partiellen Reprogrammierung führen, wie die Behandlung von somatischen Zellen mit Extrakten aus EC-Zellen (Taranger et al., 2005, Fredberg et al, 2007; Neri et al., 2007), könnten durch Anwesenheit von Nanog-TAT optimiert werden.

Schließlich soll versucht werden, die Reprogrammierung mit den vier Faktoren Klf4, Oct4, cMyc und Sox2 (Abschnitt 1.7) mit einem kontrollierbaren *gain of function* Ansatz zu erreichen. Dazu ist der Einsatz des Vektorsystems pBO1 geplant oder die Faktoren werden analog zu Nanog-TAT so modifiziert, dass sie transduzierbar werden. Dies würde neue Möglichkeiten für die Erforschung und Anwendung der Reprogrammierung eröffnen, weil die Dauer der Behandlung kontrolliert werden kann und keine genetischen Veränderungen nötig wären.

5. Zusammenfassung

Embryonale Stamm (ES)-Zellen besitzen im Gegensatz zu somatischen Zellen die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und in alle Zelltypen zu differenzieren. Die Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog bilden ein transkriptionelles Netzwerk, das diese ES-Zell-Identität determiniert.

Um die Effekte von Nanog sowohl in ES-Zellen als auch in primären Fibroblasten und immortalisierten Zell-Linien zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei experimentelle Strategien verfolgt: a) in einem genetischem Ansatz wurde ein Vektorsystem zur konditionalen Überexpression kloniert, welches über Transfektion bzw. Supertransfektion eine Cre-Rekombinase-vermittelte Überexpression von Nanog ermöglicht. b) In einem Protein-biochemischen Ansatz wurden somatische Zellen mit rekombinanten zell-permeablem Nanog (Nanog-TAT) zeit- und dosisabhängig behandelt.

Mit Hilfe des genetischen Ansatzes konnte bestätigt werden, dass die Überexpression von Nanog in ES-Zellen die Differenzierung in Abwesenheit von LIF inhibiert. In somatischen Zellen führte die Überexpression von Nanog zu toxischen Effekten.

Die Anwendung des zell-permeablen Nanog-TAT Proteins zeigte, dass Nanog-TAT, aber nicht ein Kontrollprotein ohne Homeodomäne (Nanog Δ H Δ D) bei NIH 3T3 Zellen einen transformierten Phänotyp verursacht, der durch erhöhte Proliferation und den Verlust der Kontaktinhibition charakterisiert ist. Dabei bildeten nur Nanog-TAT behandelte Zellen dreidimensionale *Foci* und in einem *Soft-Agar* Test führten Nanog-TAT-vorbehandelte Zellen zu deutlich mehr Kolonien als unbehandelte oder mit dem Kontrollprotein behandelte Zellen. Die Bildung der *Foci* war reversibel und abhängig von der Nanog-TAT Konzentration und Expositionsdauer, aber weitgehend unabhängig von der PI(3)Kinase Aktivität. Nach Injektion in SCID/beige Mäuse verursachten Nanog-TAT-vorbehandelte Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen vergrößerte Tumore.

In primären Zellen wie murinen embryonalen Fibroblasten-Zellen (MEF-Zellen) induzierte Nanog-TAT eine deutlich erhöhte Proliferation und die für MEF-Zellen typische Seneszenz nach vier bis sieben Passagen konnte durch die Nanog-TAT-Behandlung inhibiert werden. Dabei zeigten die mit Nanog-TAT behandelten Zellen auch nach 100 Tagen in Kultur noch einen überwiegend normalen Karyotyp, während die Kontroll-Zellen ausschließlich hypotetraploid waren.

6. Literaturverzeichnis

- Asano, T., K. Sasaki, et al. (2006). "In vivo tumor formation from primate embryonic stem cells." Methods Mol Biol **329**: 459-67.
- Baker, D. E., N. J. Harrison, et al. (2007). "Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo." Nat Biotechnol **25**(2): 207-15.
- Boyer, L. A., T. I. Lee, et al. (2005). "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells." Cell **122**(6): 947-56.
- Boyer, L. A., D. Mathur, et al. (2006). "Molecular control of pluripotency." Curr Opin Genet Dev **16**(5): 455-62.
- Brustle, O., K. N. Jones, et al. (1999). "Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants." Science **285**(5428): 754-6.
- Brustle, O., A. C. Spiro, et al. (1997). "In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14809-14.
- Camenisch, G., M. Gruber, et al. (1996). "A polyoma-based episomal vector efficiently expresses exogenous genes in mouse embryonic stem cells." Nucleic Acids Res **24**(19): 3707-13.
- Campisi, J. (2000). "Cancer, aging and cellular senescence." In Vivo **14**(1): 183-8.
- Campisi, J. (2001). "Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism." Trends Cell Biol **11**(11): S27-31.
- Cavaleri, S. and H. Schöler (2003). "Molecular Facts of Pluripotency." Handbook of Stem Cells **1**: 27-39.
- Chambers, I., D. Colby, et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell **113**(5): 643-55.
- Chambers, I. and A. Smith (2004). "Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells." Oncogene **23**(43): 7150-60.
- Chickarmane, V., C. Troein, et al. (2006). "Transcriptional dynamics of the embryonic stem cell switch." PLoS Comput Biol **2**(9): e123.
- Chung, C. T., S. L. Niemela, et al. (1989). "One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2172-5.

-
- Conti, L., S. M. Pollard, et al. (2005). "Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell." PLoS Biol **3**(9): e283.
- Daley, G. Q. (2003). "From embryos to embryoid bodies: generating blood from embryonic stem cells." Ann N Y Acad Sci **996**: 122-31.
- Deans, T. L., C. R. Cantor, et al. (2007). "A tunable genetic switch based on RNAi and repressor proteins for regulating gene expression in mammalian cells." Cell **130**(2): 363-72.
- Dietz, G. P. and M. Bahr (2004). "Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach." Mol Cell Neurosci **27**(2): 85-131.
- Donovan, P. J. and J. Gearhart (2001). "The end of the beginning for pluripotent stem cells." Nature **414**(6859): 92-7.
- Egli, D., J. Rosains, et al. (2007). "Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes." Nature **447**(7145): 679-85.
- Elliott, G. and P. O'Hare (1997). "Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein." Cell **88**(2): 223-33.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-6.
- Ezeh, U. I., P. J. Turek, et al. (2005). "Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma." Cancer **104**(10): 2255-65.
- Falnes, P. O. and K. Sandvig (2000). "Penetration of protein toxins into cells." Curr Opin Cell Biol **12**(4): 407-13.
- Fawell, S., J. Seery, et al. (1994). "Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 664-8.
- Francke, B. and W. Eckhart (1973). "Polyoma gene function required for viral DNA synthesis." Virology **55**(1): 127-35.
- Frankel, A. D. and C. O. Pabo (1988). "Fingering too many proteins." Cell **53**(5): 675.
- Freberg, C. T., J. A. Dahl, et al. (2007). "Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract." Mol Biol Cell **18**(5): 1543-53.
- Fried, M. (1970). "Characterization of a temperature-sensitive mutant of polyoma virus." Virology **40**(3): 605-17.

-
- Fried, M. and C. Prives (1986). "The biology of simian virus 40 and polyomavirus." Cancer Cells **4**: 1-16.
- Gassmann, M., G. Donoho, et al. (1995). "Maintenance of an extrachromosomal plasmid vector in mouse embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1292-6.
- Gidekel, S., G. Pizov, et al. (2003). "Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant." Cancer Cell **4**(5): 361-70.
- Glover, D. J., H. J. Lipps, et al. (2005). "Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans." Nat Rev Genet **6**(4): 299-310.
- Green, M. and P. M. Loewenstein (1988). "Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein." Cell **55**(6): 1179-88.
- Guan, K., K. Nayernia, et al. (2006). "Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis." Nature **440**(7088): 1199-203.
- Gurdon, J. B. and J. A. Byrne (2003). "The first half-century of nuclear transplantation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8048-52.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. von Kalle, et al. (2003). "A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." N Engl J Med **348**(3): 255-6.
- Hamazaki, T., M. Oka, et al. (2004). "Aggregation of embryonic stem cells induces Nanog repression and primitive endoderm differentiation." J Cell Sci **117**(Pt 23): 5681-6.
- Hart, A. H., L. Hartley, et al. (2005). "The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors." Cancer **104**(10): 2092-8.
- Haupt, S. (2004). "Analyse der Cre Protein-Transduktion in ES-Zell-abgeleiteten neuronalen Vorläufern." Diplomarbeit.
- Haupt, S., F. Edenhofer, et al. (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**(1): 181-8.
- Hesse, K. (2007). "Recombinase-mediated conditional overexpression of transcription factor Sox2 in mouse ES cells." Masterarbeit.
- Hochedlinger, K., Y. Yamada, et al. (2005). "Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues." Cell **121**(3): 465-77.
- Hooper, M., K. Hardy, et al. (1987). "HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells." Nature **326**(6110): 292-5.

- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Gene **96**(1): 23-8.
- Itahana, K., G. Dimri, et al. (2001). "Regulation of cellular senescence by p53." Eur J Biochem **268**(10): 2784-91.
- Jacobs, J. J., P. Keblusek, et al. (2000). "Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses *Cdkn2a* (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers." Nat Genet **26**(3): 291-9.
- Jans, D. A. and G. Hassan (1998). "Nuclear targeting by growth factors, cytokines, and their receptors: a role in signaling?" Bioessays **20**(5): 400-11.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, et al. (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." Nature **418**(6893): 41-9.
- Jungverdorben, J. (2007). "Etablierung eines reversibel-induzierbaren Überexpressionssystems in humanen ES-Zellen und die exemplarische Anwendung auf *Cdx2*." Diplomarbeit.
- Kellendonk, C., F. Tronche, et al. (1996). "Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486." Nucleic Acids Res **24**(8): 1404-11.
- Kim, J. H., J. M. Auerbach, et al. (2002). "Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease." Nature **418**(6893): 50-6.
- Kodama, S., I. Mori, et al. (2001). "Culture condition-dependent senescence-like growth arrest and immortalization in rodent embryonic cells." Radiat Res **155**(1 Pt 2): 254-262.
- Kuhn, R. and F. Schwenk (1997). "Advances in gene targeting methods." Curr Opin Immunol **9**(2): 183-8.
- Liew, C. G., J. S. Draper, et al. (2007). "Transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells." Stem Cells **25**(6): 1521-8.
- Loh, Y. H., Q. Wu, et al. (2006). "The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells." Nat Genet **38**(4): 431-40.
- Lui, V. W., L. D. Falo, Jr., et al. (2001). "Systemic production of IL-12 by naked DNA mediated gene transfer: toxicity and attenuation of transgene expression in vivo." J Gene Med **3**(4): 384-93.
- Maherali, N., R. Sridharan, et al. (2007). "Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution." Cell Stem Cell **1**(1): 55-70.

- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7634-8.
- Masui, S., Y. Nakatake, et al. (2007). "Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells." Nat Cell Biol **9**(6): 625-35.
- Matsuda, T., T. Nakamura, et al. (1999). "STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells." Embo J **18**(15): 4261-9.
- Mayhall, E. A., N. Paffett-Lugassy, et al. (2004). "The clinical potential of stem cells." Curr Opin Cell Biol **16**(6): 713-20.
- Mitsui, K., Y. Tokuzawa, et al. (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." Cell **113**(5): 631-42.
- Murriel, C. L. and S. F. Dowdy (2006). "Influence of protein transduction domains on intracellular delivery of macromolecules." Expert Opin Drug Deliv **3**(6): 739-46.
- Mutskov, V. and G. Felsenfeld (2004). "Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9." Embo J **23**(1): 138-49.
- Nagahara, H., A. M. Vocero-Akbani, et al. (1998). "Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration." Nat Med **4**(12): 1449-52.
- Neri, T., M. Monti, et al. (2007). "Mouse fibroblasts are reprogrammed to oct-4 and rex-1 gene expression and alkaline phosphatase activity by embryonic stem cell extracts." Cloning Stem Cells **9**(3): 394-406.
- Nichols, J., D. Davidson, et al. (1996). "Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis." Mech Dev **57**(2): 123-31.
- Nichols, J., B. Zevnik, et al. (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." Cell **95**(3): 379-91.
- Niwa, H. (2007). "How is pluripotency determined and maintained?" Development **134**(4): 635-46.
- Niwa, H., J. Miyazaki, et al. (2000). "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells." Nat Genet **24**(4): 372-6.
- Niwa, H., K. Yamamura, et al. (1991). "Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector." Gene **108**(2): 193-9.
- Nolden, L., F. Edenhofer, et al. (2006). "Site-specific recombination in human embryonic stem cells induced by cell-permeant Cre recombinase." Nat Methods **3**(6): 461-7.

-
- Okita, K., T. Ichisaka, et al. (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." Nature **448**(7151): 313-7.
- Paling, N. R., H. Wheadon, et al. (2004). "Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling." J Biol Chem **279**(46): 48063-70.
- Parrinello, S., E. Samper, et al. (2003). "Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts." Nat Cell Biol **5**(8): 741-7.
- Patsch, C. (2005). "Untersuchungen zur Proteintransduktion der Flp-Rekombinase in Säugerzellen." Diplomarbeit.
- Patsch, C. and F. Edenhofer (2007). "Conditional mutagenesis by cell-permeable proteins: potential, limitations and prospects." Handb Exp Pharmacol(178): 203-32.
- Peitz, M. (2007). "Untersuchungen zur Cre-Proteintransduktion in murine embryonale Stammzellen und Etablierung einer membranpermeablen Variante des Homeobox-Proteins Nanog zur Modulation von Stammzeleigenschaften." Doktorarbeit.
- Peitz, M., R. Jäger, et al. (2007). "Enhanced purification of cell-permeant Cre and germline transmission after transduction into mouse embryonic stem cells." Genesis **45**(8): 508-17.
- Peitz, M., K. Pfannkuche, et al. (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**(7): 4489-94.
- Piestun, D., B. S. Kochupurakkal, et al. (2006). "Nanog transforms NIH3T3 cells and targets cell-type restricted genes." Biochem Biophys Res Commun **343**(1): 279-85.
- Prochiantz, A. (2000). "Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others." Curr Opin Cell Biol **12**(4): 400-6.
- Rennefahrt, U. E., B. Illert, et al. (2002). "Constitutive JNK activation in NIH 3T3 fibroblasts induces a partially transformed phenotype." J Biol Chem **277**(33): 29510-8.
- Sherr, C. J. and R. A. DePinho (2000). "Cellular senescence: mitotic clock or culture shock?" Cell **102**(4): 407-10.
- Silva, J., I. Chambers, et al. (2006). "Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion." Nature **441**(7096): 997-1001.
- Sipe, J. D. (2002). "Tissue engineering and reparative medicine." Ann N Y Acad Sci **961**: 1-9.
- Smith, A. G., J. K. Heath, et al. (1988). "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides." Nature **336**(6200): 688-690.

-
- Smith, J. R. and O. M. Pereira-Smith (1996). "Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression." Science **273**(5271): 63-7.
- Solter, D. (2006). "From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research." Nat Rev Genet **7**(4): 319-27.
- Suzuki, A., A. Raya, et al. (2006). "Maintenance of embryonic stem cell pluripotency by Nanog-mediated reversal of mesoderm specification." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **3 Suppl 1**: S114-22.
- Tada, M., Y. Takahama, et al. (2001). "Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells." Curr Biol **11**(19): 1553-8.
- Takahashi, K., K. Mitsui, et al. (2003). "Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells." Nature **423**(6939): 541-5.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-76.
- Taranger, C. K., A. Noer, et al. (2005). "Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells." Mol Biol Cell **16**(12): 5719-35.
- Thompson, S., A. R. Clarke, et al. (1989). "Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells." Cell **56**(2): 313-21.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-1147.
- Todarò, G. J. and H. Green (1963). "Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines." J Cell Biol **17**: 299-313.
- Tunnemann, G., R. M. Martin, et al. (2006). "Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells." Faseb J **20**(11): 1775-84.
- Vernallis, A. B., K. R. Hudson, et al. (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**(43): 26947-52.
- Wadia, J. S., R. V. Stan, et al. (2004). "Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis." Nat Med **10**(3): 310-5.
- Wernig, M., A. Meissner, et al. (2007). "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state." Nature.

-
- Williams, R., D. Hilton, et al. (1988). "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells." Nature **336**(6200): 684-7.
- Wright, W. E. and J. W. Shay (2000). "Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology." Nat Med **6**(8): 849-51.
- Yamanaka, S. (2007). "Strategies and new Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells." Cell Stem Cell **1**: 39-49.
- Yates, A. and I. Chambers (2005). "The homeodomain protein Nanog and pluripotency in mouse embryonic stem cells." Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1518-21.
- Yeom, Y. I., G. Fuhrmann, et al. (1996). "Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells." Development **122**(3): 881-94.
- Ying, Q. L., J. Nichols, et al. (2003). "BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3." Cell **115**(3): 281-92.
- Ying, Q. L., J. Nichols, et al. (2002). "Changing potency by spontaneous fusion." Nature **416**(6880): 545-8.
- Zhang, J., X. Wang, et al. (2005). "Expression of Nanog gene promotes NIH3T3 cell proliferation." Biochem Biophys Res Commun **338**(2): 1098-102.
- Zhou, Q., H. Chipperfield, et al. (2007). "A gene regulatory network in mouse embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(42): 16438-43.
- Zhu, P., M. I. Aller, et al. (2007). "Silencing and un-silencing of tetracycline-controlled genes in neurons." PLoS ONE **2**(6): e533.
- Zohn, I. M., S. L. Campbell, et al. (1998). "Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested." Oncogene **17**(11 Reviews): 1415-38.

7. Eigene Publikationen

Michael Peitz*, Dirk Winnemoeller*, Bernhard Muenst*, Shinya Yamanaka, Oliver Bruestle und Frank Edenhofer “Modulating stem cell properties by cell-permeable Nanog protein.”
Cell Stem Cell (unter Begutachtung),

**diese Autoren haben in gleicher Weise zu der Arbeit beigetragen*

Dirk Winnemoeller, Claudia Wellbrock und Manfred Scharl “Activating mutations in the extracellular domain of the melanoma inducing receptor Xmrk are tumorigenic in vivo.”
Int J Cancer, **117**, 723-9 (2005)

8. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei Herrn Prof. Dr. Brüstle sowohl für die exzellenten Arbeitsbedingungen und das spannende Forschungsumfeld am Institut für Rekonstruktive Neurobiologie als auch für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Scheidtmann danke ich sehr für seine Bereitschaft, diese Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu betreuen und das zweite Gutachten anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Hoch und Herrn Prof. Dr. Schorle danke ich für ihre spontane Zusage, der Prüfungskommission als fachnahes und fachangrenzendes Mitglied beizutreten.

Herrn Dr. Edenhofer danke ich für die interessanten und herausfordernden Projekte, die wissenschaftlichen Diskussionen und das mir stets entgegengebrachte Vertrauen bei der strategischen Ausrichtung der Arbeit.

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 Müntz und Michael Peitz für die gute Zusammenarbeit in den Nanog Projekten.

Frau Anke Leinhaas und Frau Michaela Segschneider möchte ich für Ihre Unterstützung bei den *in vivo* Experimenten und der Fibroblasten-Präparation danken.

Allen Mitarbeitern der Rekonstruktiven Neurobiologie möchte ich für die angenehme Atmosphäre am Institut danken.

Ich danke ganz besonders meinen Eltern für die moralische und finanzielle Unterstützung, die sie mir im Studium und während der Promotion zukommen ließen und für das Durchhaltevermögen, das sie mir beigebracht haben.

Ich bedanke mich auch bei meiner Oma, die mich immer motiviert hat zu promovieren, es ist sehr traurig, dass sie die Vollendung dieser Arbeit nicht mehr miterleben kann.

Bei Sonja und Bodo bedanke ich für Ihre Unterstützung und das beste biologische Ereignis während meiner Promotion: der Geburt von Freda.

Außerdem gilt mein Dank Verena, die mich auch in schweren Zeiten während dieser Arbeit immer unterstützt hat und immer an mich und den Erfolg der Arbeit geglaubt hat.

Nicolas danke ich für die treue Hilfe und die wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Diskussionen der letzten 10 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 November 2007

Dirk Winnemöller