

**Etablierung eines Systems zur reversiblen Geninduktion**  
**und**  
**Untersuchungen zur Funktion von Bmpr1a in ES-Zellen und**  
***in vitro* generierten neuronalen Vorläuferzellen**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Daniela Kessler

aus

Arnsberg

Bonn 2010

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

1. Referent: Prof. Dr. Oliver Brüstle

2. Referent: Prof. Dr. Hubert Schorle

Tag der Promotion: 07. September 2010

Erscheinungsjahr: 2010

Heiterkeit ist ohne Ernst nicht zu begreifen.

(Loriot)

Im Andenken an meinen Vater

**Abkürzungsverzeichnis**

AA	<i>Ascorbic acid</i>
Actr	Activin-Rezeptor
Acvr	Activin-Rezeptor
Alk	<i>Activin receptor like kinase</i>
AP	Alkalische Phosphatase
β-Gal	β-Galaktosidase
bHLH	<i>basic helix loop helix</i>
Bmp	<i>Bone morphogenic protein</i>
Bmpr	Bmp-Rezeptor
bp	Basenpaar
BrdU	5'-Bromo-2'-Deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
cDNA	<i>Copy DNA</i>
co-Smad	<i>common Smad</i>
CP	<i>Crossing point</i>
Cre	<i>Causes recombination</i>
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Diff	Differenzierungs
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EB	<i>Embryoid body</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EF	embryonale Fibroblasten
Egf	<i>Epidermal growth factor</i>
Erk	extrazelluläre Rezeptor-Kinase
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
Diff	Differenzierung
FCB	<i>Flp Concentration Buffer</i>
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
Fgf2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
Flpe	<i>Flp enhanced</i>
Fn	Fibronectin
FRT	<i>Flp recombinase recognition target</i>
FW	<i>Forward</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gdf6	<i>growth and differentiation factor 6</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
<i>gfp</i>	<i>green fluorescent protein</i>
Gsk3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
Gy	Gray
HEPESN-2	Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
hES-Zellen	humane ES-Zellen
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLH	<i>helix loop helix</i>
HMG	<i>High mobility group</i>
HTNCre	His-TAT-NLS-Cre
HTNFlpe	His-TAT-NLS-Flpe
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
Id1	<i>Inhibitor of differentiation / DNA binding 1</i>
Il-6	Interleukin-6
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<i>Irx</i>	Iroquois Homöobox Protein
<i>Isl</i>	<i>Islet</i>
I-Smad	inhibitorisches Smad

ITSFn	F-12 Medium mit Insulin, Transferrin, <i>Sodiumselenit</i> und Fibronectin zur Selektion neuraler Vorläuferzellen
kb	Kilobase
kDa	Kilo-Dalton
KO	<i>Knock out</i>
Konz.	Konzentration
LB	<i>Luria-Bertani</i>
Lefty1	<i>left right determination factor 1</i>
Lif	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
Lifr	Lif-Rezeptor
Ln	Laminin
loxP	<i>locus of crossover (x) in P1</i>
Mad	<i>mothers against dpp</i>
Mapk	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
Mash1	<i>Mammalian achaete-schute Homolog 1</i>
MCS	Multiple Klonierungsstelle ( <i>multiple cloning site</i> )
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MMC	Mitomycin C
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N3EFL	N2 Medium, FGF2, EGF und Laminin zur Kultivierung von glialen Vorläufern
Neo	Neomycin
N3FL	N2 Medium, FGF2 und Laminin zur Kultivierung von neuralen Vorläufern
Ng	Noggin
<i>Ngn</i>	Neurogenin
Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i>
NLS	Kernlokalisationssequenz ( <i>nuclear localisation signal</i> )
NS-Zellen	neurale Stammzellen
Oct4	Octamer 4
OD	Optische Dichte
p.a.	<i>pro analysis</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )

PCR	Polymerase Ketten Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
pFC	reversibel induzierbarer Vektor (Flp-ON-Cre-OFF)
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (Wasserstoffexponent)
PO	Polyornithin
polyA	Polyadenylierung
pRDR	<i>ROSA26 double reporter</i>
PTB	Phosphat-Tris-Puffer
PTD	Proteintransduktionsdomäne
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
<i>rfp</i>	<i>red fluorescent protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
R-Smad	Rezeptor-reguliertes Smad
RT	Reverse Transkriptase
<i>RV</i>	<i>Reverse</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodiumdodecylsulfate</i> )
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>Shh</i>	<i>Sonic hedghog</i>
Smurf	<i>Smad ubiquitination regulatory factor</i>
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
S-Phase	Synthese-Phase
Stat3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SV40	Simian Virus 40
T3	3,3,5-Triiodothyronin
TAE	Tris-Azetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAT	<i>transactivator of transcription</i>
TAT-HA	TAT-Hemagglutinin
TB	<i>Terrific-Broth</i>
TBS	Tris gepufferte Salzlösung ( <i>Tris buffered saline</i> )
TE	Tris/EDTA

TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Temp.	Temperatur
Tert	Telomerase reverse Transkriptase
Tgf $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TK	Thymidinkinase
Tlx3	<i>T cell leukemia 3</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
TSB	Tartrat-Puffer ( <i>tartaric salt buffer</i> )
U	<i>Unit</i>
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactosid

## Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
A 1	Embryonale Stammzellen.....	1
A 2	Pluripotente Zellen für therapeutische Zwecke.....	2
A 3	Molekulare Pluripotenz-Netzwerke.....	3
	A 3.1 ES-Zell Transkriptionsfaktoren.....	3
	A 3.2 Pluripotenz-assoziierte Signaltransduktionswege.....	3
	A 3.3 Signalwirkung von Bmps in ES-Zellen.....	5
A 4	Genetische Analyse von <i>bmpr1a</i> in der Maus.....	9
A 5	Ortsspezifische Rekombinasen zur Generierung konditionaler Allele....	10
A 6	Proteintransduktion.....	13
A 7	Zielsetzung der Arbeit.....	14
<b>B</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
B 1	Verbrauchsmaterialien.....	16
B 2	Chemikalien.....	16
B 3	Materialien für molekularbiologische Methoden.....	16
B 4	Materialien für proteinbiochemische Methoden.....	17
B 5	Materialien für immunzytochemische Methoden.....	18
B 6	Materialien für zellbiologische Methoden.....	18
B 7	Materialien für Karyotypisierungen.....	19
B 8	Bakterienstämme.....	19
B 9	Eukaryotische Zelllinien und Mausstämme.....	20
B 10	Molekularbiologische Methoden.....	20
	B 10.1 Methoden zur Arbeit mit RNA.....	20
	B 10.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA.....	21
	B 10.1.2 RT-Reaktion.....	21
	B 10.1.3 RT-PCR.....	21
	B 10.2 Methoden zur Arbeit mit DNA.....	25

B 10.2.1	PCR von Plasmid-DNA für Klonierungszwecke.....	25
B 10.2.2	Aufreinigung PCR-amplifizierter DNA-Fragmente	26
B 10.2.3	DNA-Restriktion.....	26
B 10.2.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel.....	26
B 10.2.5	DNA-Ligation.....	26
B 10.2.6	Oligo-Klonierung.....	27
B 10.2.7	DNA-Dephosphorylierung.....	27
B 10.2.8	Herstellung von glatten DNA-Enden.....	27
B 10.2.9	Amplifikation von Plasmid-DNA.....	27
B 10.2.10	Verfahren der „Blau-Weiß-Selektion“ zum Nachweis eingebauter DNA.....	28
B 10.2.11	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	29
B 10.2.12	DNA-Sequenzierung.....	29
B 10.2.13	Ungerichtete Klonierung.....	30
B 10.2.14	Gerichtete Klonierung.....	30
B 10.2.15	Klonierung eines Vektors zur reversiblen Geninduktion.....	30
B 10.2.16	Isolierung von genomischer DNA.....	32
B 10.2.17	PCR von genomischer DNA.....	32
B 10.3	Quantifizierung von (RT-)PCR-Produkten mit der ImageJ-Software .....	33
B 11	Proteinbiochemische Methoden.....	33
B 11.1	Expression rekombinanter Cre-Proteine in <i>E. coli</i> (TUNER DE3).....	33
B 11.2	Expression rekombinanter Flpe-Proteine in <i>E. coli</i> (BL21(DE3))	34
B 11.3	Native Aufreinigung von rekombinantem Flpe und Cre.....	34
B 11.4	Dialyse von aufgereinigtem Cre-Protein.....	36
B 11.5	Dialyse und Aufkonzentration von aufgereinigtem Flpe-Protein	36
B 11.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	37
B 11.7	SDS-PAGE.....	37
B 11.8	Coomassie-Färbung.....	38
B 11.9	Western-Analyse.....	38
B 12	Zellbiologische Methoden.....	41
B 12.1	Beschichtung von Zellkulturschalen.....	41

B 12.2 Kultivierung muriner EF.....	42
B 12.2.1 Auftauen von EF.....	42
B 12.2.2 Passagieren von EF.....	42
B 12.2.3 Mitotische Inaktivierung von EF.....	43
B 12.2.4 Einfrieren von EF.....	44
B 12.2.5 Auftauen von mitotisch inaktivierten EF.....	44
B 12.3 Kultivierung muriner ES-Zellen.....	44
B 12.3.1 Auftauen von ES-Zellen.....	44
B 12.3.2 Passagieren von ES-Zellen.....	45
B 12.3.3 Einfrieren von ES-Zellen.....	45
B 12.3.4 Überführen in N2B27-ES-Medium.....	45
B 12.3.5 Passagieren in N2B27-ES-Medium.....	46
B 12.4 Neurale <i>in vitro</i> Differenzierung muriner ES-Zellen.....	46
B 12.4.1 Zeitlicher Verlauf.....	47
B 12.4.2 Differenzierung nach Brüstle <i>et al.</i> .....	47
B 12.4.3 Differenzierung nach Glaser <i>et al.</i> .....	52
B 12.5 Transiente Transfektion von murinen Fibroblasten.....	54
B 12.6 Stabile Transfektion von ES-Zellen.....	55
B 12.7 Isolierung von ES-Zell Klonen.....	55
B 12.8 Proteintransduktion.....	56
B 12.8.1 Cre-Transduktion von ES-Zellen.....	56
B 12.8.2 Cre-Transduktion von N3EFL-Zellen.....	56
B 12.8.3 Cre-Transduktion von NS-Zellen.....	56
B 12.8.4 Flpe-Transduktion von murinen Fibroblasten.....	57
B 12.8.5 Flpe-Transduktion von ES-Zellen.....	57
B 12.9 Ganciclovir-Selektion von ES-Zellen.....	57
B 13 Karyotypisierung von ES-Zellen.....	58
B 14 Immunzytochemie.....	59
B 14.1 Fixierung der Zellen.....	59
B 14.2 $\beta$ -Galactosidase-Färbung.....	59
B 14.3 Nachweis endogener alkalische Phosphatase-Aktivität.....	59
B 14.4 Nachweis von Oberflächen- und intrazellulären Proteinen.....	60

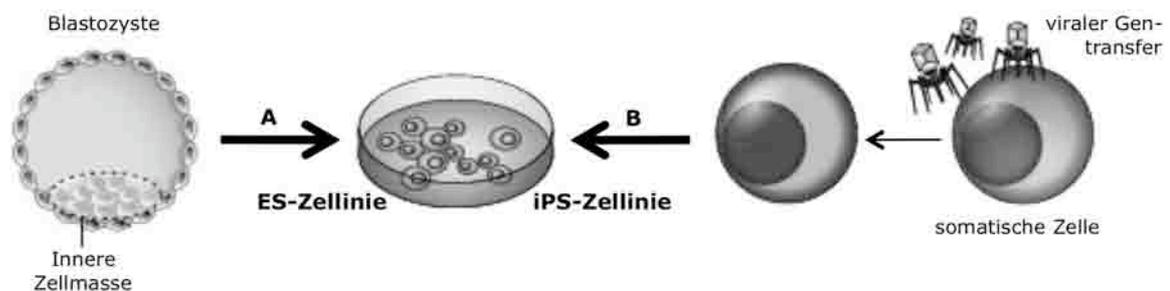
<b>C</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>62</b>
C 1	Reversible Geninduktion mit zellpermeablen Cre- und Flpe-Rekombinasen.....	62
C 1.1	pFC – ein Konstrukt zur reversiblen Geninduktion.....	62
C 1.2	Reinigung und Stabilität einer transduzierbaren Flpe-Rekombinase.....	65
C 1.3	Konzentrationsabhängigkeit der Rekombinationseffizienz von HTNFlpe.....	67
C 1.4	Transduktion von HTNFlpe in murine ES-Zellen.....	69
C 1.5	Transduktion des Flpe-Fusionsproteins unter Erhalt der Proliferation und chromosomaler Stabilität.....	70
C 1.6	Kontrollierte und reversible Geninduktion mit zellpermeablen Flpe- und Cre-Rekombinasen.....	72
C 2	Konditionale Inaktivierung von <i>bmpr1a</i> in murinen embryonalen Stammzellen.....	75
C 2.1	Deletion von <i>bmpr1a</i> in ES-Zellen.....	75
C 2.2	Blockierung der Smad-Phosphorylierung in ES-Zellen nach <i>bmpr1a</i> -Inaktivierung.....	80
C 2.3	Verminderte Proliferation von <i>bmpr1a</i> -mutanten ES-Zellen.....	81
C 2.4	Geringere Klonogenität von <i>bmpr1a</i> -defizienten ES-Zellen.....	84
C 2.5	Effekte auf Pluripotenz-assoziierte Gene durch Verlust von <i>bmpr1a</i> .....	86
C 2.6	Unveränderte Expression weiterer <i>bmp</i> -Rezeptoren in ES-Zellen mit inaktiviertem <i>bmpr1a</i> .....	87
C 2.7	Regulierung der <i>bmp</i> -Expression nach Inaktivierung von <i>bmpr1a</i> .....	88
C 2.8	Aktivierung von Stat3 und Erk in <i>bmpr1a</i> mutanten ES-Zellen...	90
C 2.9	Verstärkte $\beta$ -Catenin Expression in <i>bmpr1a</i> mutanten ES-Zellen.....	91
C 2.10	Inhibition der neuralen Differenzierung von ES-Zellen durch Bmpr1a.....	92
C 2.11	Unveränderte gliale Differenzierung von <i>bmpr1a</i> -mutanten ES-Zell-abgeleiteten Vorläuferzellen.....	94

<b>D</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>98</b>
D 1	Reversible Geninduktion durch sequentielle Applikation von Flpe- und Cre-Rekombinasen.....	98
D 2	Manipulation von ES-Zellen mit HTNFlpe.....	99
D 3	Zellpermeable Flpe- und Cre-Rekombinasen zur reversiblen Geninduktion in ES-Zellen.....	101
D 4	Weitere Anwendungsmöglichkeiten genetischer Schalter.....	102
D 5	Deletion von <i>bmpr1a</i> mit Cre-Proteintransduktion in mES-Zellen.....	103
D 6	Verminderte Proliferation und Klonogenität nach <i>bmpr1a</i> -Inaktivierung in ES-Zellen.....	104
D 7	Bmp4-unabhängige neurale Differenzierung von <i>bmpr1a</i> -defizienten ES-Zellen.....	111
D 8	Bmpr1a-unabhängiges gliales Differenzierungspotential von <i>in vitro</i> differenzierten neuronalen Vorläuferzellen.....	112
<b>E</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>115</b>
<b>F</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>116</b>
<b>G</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>128</b>
<b>H</b>	<b>Eigene Publikationen.....</b>	<b>129</b>
<b>I</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>130</b>

## A Einleitung

### A 1 Embryonale Stammzellen

Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und differenzierte Zelltypen zu bilden. Aufgrund ihres Entwicklungspotentials werden sie in verschiedene Kategorien eingeordnet. Befruchtete Eizellen und Blastomeren im Zweizellstadium sind totipotent, da sie durch Selbstorganisation einen ganzen Organismus ausbilden können. Embryonale Stamm- (ES-) Zellen besitzen die Fähigkeit, sich uneingeschränkt selbst zu erneuern und in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Sie können sich jedoch nicht in extraembryonale Gewebetypen entwickeln, die für die Einnistung der Blastozyste benötigt werden. Diese Eigenschaft wird als Pluripotenz bezeichnet. Adulte Stammzellen weisen Multipotenz auf. Sie sind darauf beschränkt, in verschiedene Zelltypen eines einzelnen Keimblatts zu differenzieren. Spermatogoniale Stammzellen sind unipotent, da sie nur Spermien generieren können (Jaenisch & Young, 2008).



**Abb. A 1: Möglichkeiten zur Gewinnung von Stammzellen.**

**(A)** ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste extrahiert und unter spezifischen Bedingungen gehalten, um den undifferenzierten Status der Zellen zu bewahren.

**(B)** Induzierte pluripotente Stamm- (iPS-) Zelllinien werden durch die Dedifferenzierung von somatischen Zellen generiert. Hierzu werden retrovirale Vektoren, die für definierte Faktoren, u.a. Oct4 und Sox2, kodieren, in die Zelle eingebracht. Abbildung adaptiert von Chidgey *et al.*, 2008.

ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen (siehe Abb. A 1A). Murine ES-Zellen wurden erstmals 1981 (Evans & Kaufmann; Martin) und humane ES- (hES-) Zellen 1998 (Thomson *et al.*) isoliert. Seit kurzem ist es außerdem möglich, sowohl humane als auch murine somatische Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) zu reprogrammieren (Takahashi & Yamanaka, 2006; Maherali *et al.*,

2007; Okita *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007). Dies erfolgt durch retrovirale Transduktion von definierten Faktoren, hierunter die intrinsischen Pluripotenzfaktoren *oct4* und *sox2* (siehe Abb. A 1B).

Die Verwendung von ES-Zellen ist in zwei verschiedenen Bereichen von besonderem Interesse. Sie werden zur Untersuchung von Genfunktionen *in vivo* und *in vitro* eingesetzt und könnten zukünftig auch therapeutischen Zwecken dienen.

## **A 2            Pluripotente Zellen für therapeutische Zwecke**

Für die Differenzierung muriner ES-Zellen wurden zahlreiche *in vitro* Protokolle, u.a. zur Gewinnung von neuronalen Zellen, peripheren Neuronen, Kardiomyozyten, Hepatozyten oder hämatopoetischen Vorläufern entwickelt. Diese wurden zur Geweberegeneration in bestrahlte Mäuse und Tiermodelle für Parkinson, Myelin-Defizienzen, Herzinfarkt, Leberversagen etc. transplantiert (Brüstle *et al.*, 1997; Brüstle *et al.*, 1999; Daley, 2003; Glaser *et al.*, 2007; Gossrau *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2002; Klug *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 2003). Das *in vitro* Differenzierungspotential humaner ES-Zellen unterstreicht deren therapeutischen Nutzen. So könnten hES-Zell-abgeleitete neurale Zellen zukünftig für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen eingesetzt werden (Nolden & Brüstle, 2008). Bislang haben neben der ethischen Problematik bei der Verwendung von differenzierten Zellen aus hES-Zellen Abstoßungsreaktionen durch das Immunsystem einen limitierenden Faktor dargestellt (Chidgey *et al.*, 2008). In neueren Publikationen wurde gezeigt, dass patientenspezifische iPS-Zellen aus humanen somatischen Zellen gewonnen werden können (Dimos *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008). Mit der gerichteten Differenzierung von diesen patientenspezifischen iPS-Zellen würden diese Einschränkungen aufgehoben. Bevor sie für therapeutische Zwecke eingesetzt werden können, muss sicher gestellt sein, dass die viral eingebrachten Faktoren nicht in das humane Genom integrieren und in Tumoren resultieren. Kürzlich ist es gelungen, sowohl murine (Okita *et al.*, 2008) als auch humane iPS-Zellen ohne virale Vektoren herzustellen (Kaji *et al.*, 2009; Woltjen *et al.*, 2009). Um ES- und iPS-Zellen zuverlässig zu differenzieren ist es weiterhin wichtig, auch ihre Pluripotenz-erhaltenden Mechanismen zu verstehen.

### A 3 Molekulare Pluripotenz-Netzwerke

Das Genexpressionsmuster von ES-Zellen wird durch spezifische Transkriptionsfaktoren, Chromatin-modifizierende Enzyme, regulatorische RNA-Moleküle und Signaltransduktionswege kontrolliert.

#### A 3.1 ES-Zell Transkriptionsfaktoren

Oct4 (Octamer 4), Sox2 und Nanog spielen in dem Transkriptionsnetzwerk, das die Aufrechterhaltung der Pluripotenz gewährleistet, eine Schlüsselrolle. In genetischen Studien wurde gezeigt, dass die Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog essentielle Regulatoren für die frühe Entwicklung und ES-Zellidentität sind (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003; Nichols *et al.*, 1998). Diese Transkriptionsfaktoren werden sowohl in ES-Zellen als auch der inneren Zellmasse der Blastozyste exprimiert. Bei Oct4-Defizienz kann die Pluripotenz der ES-Zellen und inneren Zellmasse nicht weiter aufrechterhalten werden, und sie differenzieren in Trophektoderm und extraembryonales Endoderm. In ES-Zellen kann Oct4 mit dem HMG- (*high mobility group*) Box Transkriptionsfaktor Sox2 heterodimerisieren, wobei Sox2 durch Regulierung der *oct4*-Expression zur Pluripotenz beiträgt (Masui *et al.*, 2007). Die Expression von *oct4* wird während der frühen zellulären Differenzierung schnell und nahezu komplett gestoppt. In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass Oct4, Sox2 und Nanog in humanen (Boyer *et al.*, 2005) und murinen (Loh *et al.*, 2006) ES-Zellen an ihre eigenen Promotoren und die der anderen beiden Faktoren binden und damit eine ineinandergreifende autoregulatorische Schleife bilden. Die drei Faktoren cookkupieren außerdem häufig ihre Zielgene und unterstützen so die Expression von Pluripotenz-assoziierten Genen bzw. blockieren die Expression von Genen, die zur Zelldifferenzierung führen.

#### A 3.2 Pluripotenz-assoziierte Signaltransduktionswege

In murinen ES-Zellen sind im wesentlichen die extrinsischen Faktoren Lif (*Leukemia Inhibitory Factor*) / Stat3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*), Wnt und Bmp (*Bone morphogenic protein*) von Bedeutung, die über Bindung an entsprechende Rezeptoren

ihre Pluripotenz-erhaltende Wirkung entfalten. Die Verknüpfung zwischen Pluripotenz-assoziierten Signaltransduktionswegen und ES-Zell Transkriptionsfaktoren ist bislang noch weitestgehend unbekannt. Suzuki *et al.* (2006) konnten zeigen, dass die Expression von *nanog* durch die Bindung von Stat3 und Brachyury, einem frühen mesodermalen Marker, an ein *Enhancer*-Element im *nanog*-Gen verstärkt wird. Nanog blockiert ferner eine Bmp-induzierte mesodermale Differenzierung durch direkte Bindung an Smad1. Dies verhindert die Heterodimerisierung von Smad und dessen Coaktivatoren und damit die Bildung eines aktiven Smad-Transkriptionskomplexes.

Murine ES-Zellen wurden ursprünglich auf einer Lage von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) kultiviert. Von MEFs konditioniertes Medium kann die Selbsterneuerung von murinen ES-Zellen unterstützen sodass die MEF-Cokultivierung nicht weiter erforderlich ist. Es wurde dann gezeigt, dass MEFs die ES-Zelldifferenzierung durch Sekretion des Il-6 (Interleukin-6) Zytokins Lif unterbinden (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988). Viele ES-Zelllinien können daher bei Zugabe eines rekombinanten Lif-Proteins ohne MEFs kultiviert werden.

Die Lif-induzierte Signalkaskade verläuft über die direkte Bindung von Lif an den Lif-Rezeptor (Lifr). Der Lifr rekrutiert daraufhin mit seiner zytoplasmatischen Domäne den Transmembranrezeptor gp130. Anschließend erfolgen Phosphorylierung und Translokation von Stat3 in den Nukleus (Boeuf *et al.*, 1997; Niwa *et al.*, 1998). Bei Lif-Abwesenheit oder Expression einer dominant negativen Form von Lif differenzieren ES-Zellen in eine morphologisch uneinheitliche Zellpopulation, die endo- und mesodermale Marker exprimiert.

Die Selbsterneuerung von humanen ES-Zellen ist Lif-unabhängig (Dahéron *et al.*, 2004; Humphrey *et al.*, 2004). Auch die Pluripotenz muriner ES-Zellen kann durch Lif nur unter Serum-haltigen Bedingungen aufrechterhalten werden, da andernfalls eine neurale Differenzierung induziert wird (Ying *et al.*, 2003a). Daher kann davon ausgegangen werden, dass mindestens ein zusätzlicher Faktor erforderlich ist, der zusammen mit Lif zu einer kontinuierlichen Selbsterneuerung von murinen ES-Zellen beiträgt.

Eine Wnt-Signalwirkung kann in undifferenzierten ES-Zellen nachgewiesen werden und wird während der Differenzierung herabreguliert. Für die Selbsterneuerung von

ES-Zellen ist es ausreichend, wenn die Wnt-Kaskade durch einen pharmakologischen Inhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase 3 (Gsk3) aktiviert wird (Sato *et al.*, 2004). Extrazelluläre Wnt-Proteine binden an Frizzled-Rezeptoren und stabilisieren damit intrazelluläres  $\beta$ -Catenin, das dann in den Nukleus transloziert und dort in Verbindung mit anderen Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen aktiviert (Schmidt & Patel, 2005). Eine Verbindung von Bmp- und Wnt-Signalwegen wurde in Epithelzellen des Darms beobachtet. Hier scheinen Bmps die Wnt-Signalwirkung und damit die Selbsterneuerung von Stammzellen zu inhibieren (He *et al.*, 2004).

### A 3.3 Signalwirkung von Bmps in ES-Zellen

Die Kultivierung von murinen ES-Zellen kann unabhängig von MEFs und Serum erfolgen, wenn ein Medium verwendet wird, das LIF und entweder Bmp2, Bmp4 oder den Bmp-verwandten *growth and differentiation factor 6* (Gdf6) enthält (Ying *et al.*, 2003b). In humanen ES-Zellen induzieren BMPs dagegen Differenzierung in extraembryonale Gewebetypen (Xu *et al.*, 2002; Pera *et al.*, 2004). Bmps gehören zu der *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) Super-Familie. Die Knochen-induzierende Aktivität von Bmps wurde bereits 1965 beobachtet (Urist), aber die Proteine, die hierfür verantwortlich waren, wurden erst in den späten 1980ern charakterisiert (Wozney *et al.*, 1988; Luyten *et al.*, 1989; Wozney, 1992). Bislang wurden mehr als zwanzig verschiedene Bmps identifiziert (Chen *et al.*, 2004).

Das Bmp-Signal wird durch Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren intrazellulär weitergeleitet und beeinflusst damit die Transkription von Zielgenen. Zwei Rezeptortypen (Typ I und Typ II) sind hierfür erforderlich (siehe Tabelle A 1). Diese können laut Nomenklatur mehrere Synonyme haben: Bmp-Rezeptoren (Bmpr), Activin Rezeptor *like* Kinasen (Alk) oder Activin-Rezeptoren (Actr/Acvr), da sie zum Teil auch Activin, ein anderes Mitglied der TGF $\beta$ -Super-Familie, binden. Es existieren drei Typ II Rezeptoren: BmprII, ActrII (Acvr2) und ActrIIb (Acvr2b) sowie vier Typ I Rezeptoren: Bmpr1a (Alk3), Bmpr1b (Alk6), Alk2 (ActrI/Acvr1) und Alk1 (Acvr11) (zur Übersicht siehe Schmierer & Hill, 2007 und Derynck & Zhang, 2003). Verschiedene Kombinationen der Typ I und II Rezeptoren können die Spezifität des Signals

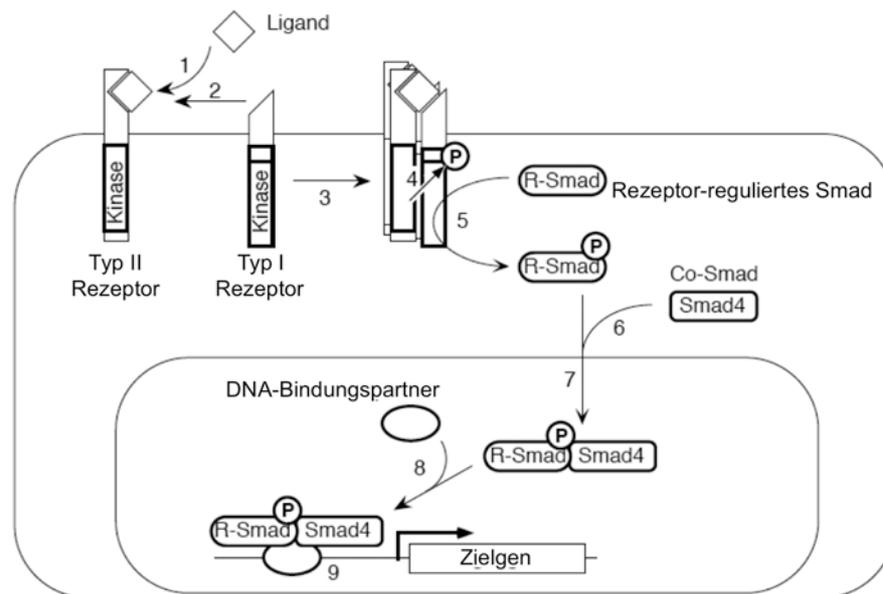
bestimmen und in der Aktivierung unterschiedlicher Zielgene wie z.B. *id1* resultieren (Derynck & Feng, 1997).

**Tabelle A 1: Bmp-Rezeptoren und ihre Synonyme**

Rezeptor	Synonym	Typ
Bmpr1a	Alk3	I
Bmpr1b	Alk6	I
Alk2	ActrI, Acvr1	I
Alk1	Acvr11	I
BmprII	/	II
ActrII	Acvr2	II
ActrIIb	Acvr2b	II

Durch die Bindung des Bmp-Liganden an den Typ II Rezeptor im Zusammenspiel mit dem Typ I Rezeptor wird die Bildung eines heteromeren Komplexes induziert. In diesem Komplex phosphoryliert der Typ II Rezeptor den Typ I Rezeptor. Der damit aktivierte Typ I Rezeptor phosphoryliert anschließend R-Smads (Smad1, -5 oder -8). Die Namensgebung der Smads beruht auf ihrer Homologie zu dem Drosophila Gen *mothers against dpp* (Mad). Zwei phosphorylierte R-Smads (Rezeptor-regulierte Smads) bilden einen heterotrimerischen Komplex mit dem *common* Smad4 (co-Smad). Dieser transloziert in den Nukleus und moduliert zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen (siehe Abb. A 2) (Shi & Massagué, 2003).

Die Aktivität von Bmps wird auf verschiedene Weisen reguliert. Im Extrazellularraum binden Bmp-Antagonisten (z.B. Noggin oder Chordin) spezifisch an Bmps und inhibieren ihre Funktion (Balemans & van Hul, 2002). Die Signalweiterleitung in die Zelle kann durch den Pseudorezeptor Bambi verhindert werden (Onichtchouk *et al.*, 1999). Im Zytoplasma kann die Aktivierung der R-Smads durch inhibitorische Smads (die I-Smads 6 und 7) blockiert werden (Itoh *et al.*, 2001). Diese besitzen zwar eine Domäne, welche Smad-Oligomerisierung und Smad-Rezeptorinteraktion vermittelt, ihnen fehlt jedoch die DNA-Bindedomäne. Weiterhin können Typ I Rezeptoren und R-Smads durch eine Smurf- (*Smad ubiquitination regulatory factor*) vermittelte Ubiquitinierung degradiert werden (Ebisawa *et al.*, 2001).



**Abb. A 2: Der Bmp/Smad-Signaltransduktionsweg.**

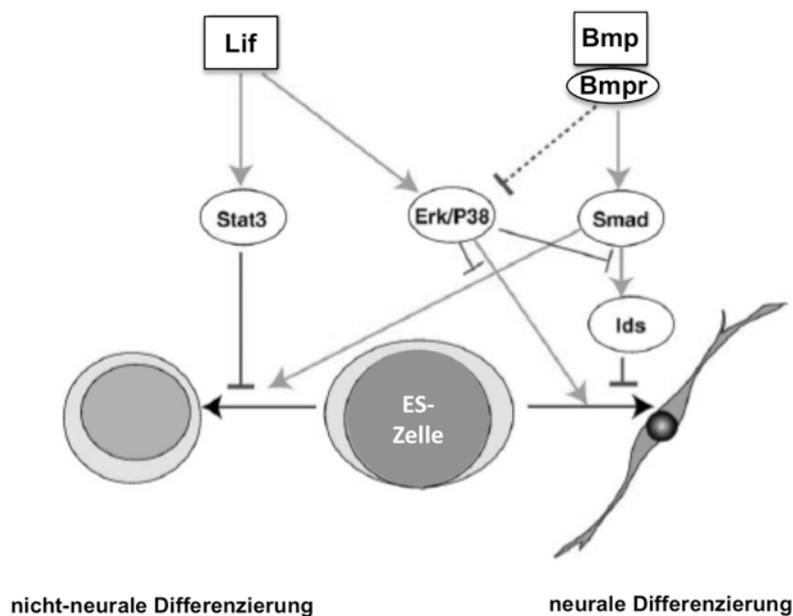
Die Bindung des Liganden an den Typ II Rezeptor (1) im Zusammenspiel mit einem Typ I Rezeptor (2) führt zur Bildung des Rezeptorkomplexes (3) und Phosphorylierung des Typ I Rezeptors (4). Der hierdurch aktivierte Typ I Rezeptor phosphoryliert anschließend ein Rezeptor-reguliertes Smad (R-Smad) (5), sodass dieses Protein mit Smad4 assoziieren kann (6) und in den Nukleus gelangt (7). Im Nukleus assoziieren der Smad-Komplex und ein DNA-Bindungspartner (8). Dieser Komplex bindet an spezifische *Enhancer* von Zielgenen (9) und aktiviert damit ihre Transkription. Abbildung adaptiert von Massagué, 1998.

Für die Pluripotenzerhaltung von ES-Zellen unter Serum-freien Bedingungen ist eine wechselseitige und ausgewogene Inhibition zwischen Lif- und Bmp-Signalen ausschlaggebend (siehe Abb. A 3). Lif inhibiert die Differenzierung in Mesoderm und Endoderm und fördert die neurale Differenzierung. Im Gegensatz dazu blockieren Bmps in Embryonen (Wilson & Edlund, 2001) und ES-Zellen (Tropepe *et al.*, 2001) die neurale Differenzierung und induzieren mesodermale und endodermale Differenzierung (Li *et al.*, 2001; Nakayama *et al.*, 2000; Ying *et al.*, 2003b).

Die Bmp-induzierte Selbsterneuerung von ES-Zellen scheint durch die Expression von *id*- (*Inhibitor of differentiation*) Genen reguliert zu werden. Auch bei Abwesenheit von Bmp und Zugabe von Lif ist die Selbsterneuerung von ES-Zellen unter Serum- und Fibroblasten-freien Bedingungen möglich, wenn *ids* überexprimiert werden (Ying *et al.*, 2003b). Eine *id*-mRNA-Induktion durch Bmp wurde zudem in differenzierenden ES-Zellkulturen nachgewiesen (Hollnagel *et al.*, 1999). Ids sind HLH- (*helix loop helix*) Proteine und heterodimerisieren mit basischen HLH- (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Sie besitzen keine DNA-Bindedomäne und inhibieren die Transkriptions-aktivierende Fähigkeit der bHLH-Faktoren, mit denen sie interagieren (Miyazawa *et al.*, 2002). So

könnten Ids in ES-Zellen auch eine Inhibition des neurogenen bHLH-Faktors Mash1 (*Mammalian achaete-scute Homolog 1*) (Lo *et al.*, 1991) bewirken. Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Bmps die Selbsterneuerung von ES-Zellen außerdem durch Inhibition des Mapk- (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase) Signalwegs unterstützen. Hier weisen ES-Zellen, die mit Serum bei Abwesenheit von Fibroblasten kultiviert wurden, kurz nach der Behandlung mit Bmp4 eine reduzierte Aktivierung der extrazellulären Rezeptor-Kinase (Erk) und der intrazellulären p38 Mapk auf. Weiterhin konnte die Selbsterneuerung der ES-Zellen durch spezifische pharmakologische Inhibition von Erk und p38 deutlich verbessert werden (Qi *et al.*, 2004).

Zur Aufklärung der Pluripotenzregulierung könnte die Genmanipulation von ES-Zellen mit Hilfe von ortsspezifischen Rekombinasen beitragen.



**Abb. A 3: Aufrechterhaltung der Pluripotenz von ES-Zellen.**

Bmps blockieren die neurale Differenzierung von ES-Zellen und tragen durch ein Wechselspiel mit dem Lif-Signaltransduktionsweg zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz bei. Das Bmp-Signal inhibiert die Mapk- (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase) vermittelte neurale Differenzierung und induziert nicht-neurale Differenzierung. Lif blockiert die Bmp-induzierte nicht-neurale Differenzierung und kooperiert mit Bmp in der Regulierung der ES-Zell Selbsterneuerung durch den Erk/P38 Mapk- oder den Lif/Stat3-Signalweg. Abbildung adaptiert von Zhang & Li, 2005.

#### A 4 Genetische Analyse von *bmpr1a* in der Maus

Bmps kontrollieren ein breites Spektrum zellulärer Funktionen. Sie regulieren Wachstum, Differenzierung und Apoptose diverser Zelltypen *in vitro* (zur Übersicht siehe Xiao *et al.* 2007). Auch während der embryonalen Entwicklung haben sie essentielle Funktionen. Klassische KO- (*knock out*) Mäuse diverser Bmp-Liganden und Rezeptoren sind embryonal letal, sodass die Analyse ihrer Gewebe-spezifischen Funktionen in späteren Entwicklungsstadien verwehrt bleibt. (Goumans & Mummery, 2000). So können *bmpr1a*<sup>-/-</sup> Mäuse kein Mesoderm bilden, zeigen eine reduzierte Epiblastproliferation und sterben zwischen Tag E7,5 und 9,5 (Mishina *et al.*, 1995b). Anhand von Untersuchungen mit *bmpr1a*<sup>-/-</sup> Mäusen und Mäusen mit einer Epiblast-spezifischen Deletion des *bmpr1a* konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Bmp-Signalweges über Bmpr1a vor der Gastrulation für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz im Epiblast verantwortlich ist und eine frühzeitige neurale Differenzierung verhindert (Di-Gregorio *et al.*, 2007). Die Bedeutung des Bmpr1a für verschiedene Gewebetypen konnte aufgrund der Letalität von *bmpr1a*<sup>-/-</sup> Mäusen (Mishina *et al.*, 1995b) nur mit einem konditionalen *bmpr1a*-KO (Mishina *et al.*, 2002) entschlüsselt werden. Mit Hilfe dieser Gewebe-spezifischen *bmpr1a*-Deletionen konnte gezeigt werden, dass ohne *bmpr1a* eine normale Nieren-, Herz- und Gefäß- sowie Lungenentwicklung nicht möglich ist (Hartwig *et al.*, 2008; El-Bizri *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008). In Osteoblasten wird durch die *bmpr1a*-Inaktivierung die Osteoklastogenese reduziert (Kamiya *et al.*, 2008). In Darmepithelzellen wurde ein antiproliferativer- und Differenzierungs-induzierender Effekt durch *bmpr1a* nachgewiesen. Durch die konditionale Inaktivierung des *bmpr1a* wird die Homöostase der Darmepithelregeneration gestört was zu einer Expansion der intestinalen Vorläuferzellen und Stammzellen führt (He *et al.*, 2004). Dagegen bewirkt die kombinierte Aktivierung des Bmp- und Lif-Signalweges in ES-Zellen die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung und bewahrt ihr Differenzierungspotential in alle drei Keimblätter sowie die Fähigkeit von ES-Zellen zur Keimbahn Transmission (Ying *et al.*, 2003b). Die Gewinnung von *bmpr1a*<sup>-/-</sup> ES-Zellen aus der inneren Zellmasse von *bmpr1a*<sup>-/-</sup> Blastozysten ist unter Standardbedingungen nicht möglich (Mishina, 2003; Zhao, 2003). Dies mag dazu beitragen, dass die Rolle des Bmpr1a in ES-Zellen bislang nicht bekannt ist.

## Die Rolle des Bmpr1a bei der neuronalen Differenzierung

Bmps kontrollieren viele Schritte bei der Entwicklung und Differenzierung des Vertebraten-Nervensystems. Anhand von Untersuchungen, in denen der *bmpr1a* konditional überexprimiert oder deletiert wurde, konnte die Bedeutung des Bmpr1a näher analysiert werden. Nach *bmpr1a*-Inaktivierung im Kortex wurde eine erhöhte Anzahl von Oligodendrozyten und Calbindin-positiven Interneuronen nachgewiesen (Samanta *et al.*, 2007). Dagegen ist die Bmp-Signalkaskade im Neuralrohr nach konditionalem *bmpr1a*-KO weiter aktiv. Nur ein *bmpr1a/1b*-Doppel-KO führt hier zu einem Verlust an dorsalen Zellpopulationen (Wine-Lee *et al.*, 2004). Anhand von Experimenten, in denen der *bmpr1a* oder *bmpr1b* in neuronalen Vorläuferzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konstitutiv aktiv exprimiert wurde, konnte gezeigt werden, dass die *bmpr1a*-Aktivierung die Expression von *bmpr1b* in Vorläuferzellen induziert und ihre Proliferation fördert. Die Aktivierung von *bmpr1b* schränkt die Anzahl der Vorläuferzellen durch die Hemmung ihrer Mitose ein. Dies führt in Embryonen bei früher Gestation zu Apoptose und bei fortgeschrittener Gestation zu terminaler Differenzierung (Panchision *et al.*, 2001). Zu überprüfen bleibt, welchen Einfluss der Verlust des *bmpr1a* auf die Proliferation und Differenzierung von *in vitro* generierten neuronalen Vorläuferzellen hat. In diesem Zusammenhang ist außerdem fraglich, ob *bmpr1a*-defiziente neurale Vorläuferzellen ein verstärktes oligodendrogliales Differenzierungspotential haben. Während aller Entwicklungsstadien wird durch die Aktivierung des Bmp-Signalweges die oligodendrogliale Differenzierung von kultivierten Vorläuferzellen inhibiert (Gross *et al.*, 1996; Mehler *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1999). Umgekehrt fördert die Noggin-Behandlung die Oligodendrogenese von glialen Vorläuferzellen (Mabie *et al.*, 1999). Die transgene Überexpression von *bmp4* *in vivo* fördert die astrozytäre Differenzierung und inhibiert die Differenzierung von Oligodendrozyten (Gomes *et al.*, 2003).

## A 5            **Ortsspezifische Rekombinasen zur Generierung konditionaler Allele**

Während der letzten 15 Jahre konnten in der modernen Maus-Genetik mit Hilfe von ortsspezifischen Rekombinasen deutliche Fortschritte erzielt werden. Ortsspezifische

Rekombinasen vermitteln unabhängig von zusätzlichen Cofaktoren die Exzision, Integration und Translokation von definierten DNA-Abschnitten in lebenden Zellen mit Hilfe von Enzym-spezifischen Erkennungssequenzen. Die zwei prominentesten sind die Rekombinasen Cre (*causes recombination*) aus dem Bakteriophagen P1 (Austin *et al.*, 1981) und Flp (benannt nach der Fähigkeit, eine Inversion bzw. *flip* der DNA-Sequenz zu verursachen) aus dem 2-Mikron-Plasmid von *S. cerevisiae* (Broach *et al.*, 1982). Beide Enzyme gehören zu der  $\lambda$ -Integrase-Super-Familie und teilen einen ähnlichen Mechanismus der DNA-Rekombination. Dieser Mechanismus beinhaltet einen initialen DNA-Strangbruch, der durch nukleophile Tyrosin-Reste katalysiert wird. Die Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase wird loxP- (*locus of crossover (x) in P1*) Stelle (Austin *et al.*, 1981) und die der Flp-Rekombinase FRT- (*Flp recombinase recognition target*) Stelle (Jayaram, 1985) genannt.

Eine besondere Bedeutung haben ortsspezifische Rekombinasen durch die Verwendung in *Gene Targeting* Experimenten erlangt. Diese Methodik ermöglicht sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Analyse von Genfunktionen unter präziser zeitlicher und räumlicher Kontrolle. Abhängig von der Position der Erkennungsstellen und ihrer Orientierung zueinander vermitteln ortsspezifische Rekombinasen entweder die Aktivierung oder auch die Inaktivierung eines Zielgens. Hierzu werden die Erkennungsstellen durch homologe Rekombination in spezifische Genloci von ES-Zellen eingebracht. Die ortsspezifische Rekombination wird hauptsächlich verwendet, um 1.) Selektionsmarker zu entfernen, welche die Expression von modifizierten Genen in ES-Zellen stören können und um 2.) essentielle Abschnitte eines Zielgens zu deletieren. Die Entfernung von Selektionsmarkern erfolgt vornehmlich durch Transfektion von Plasmiden, die für die Flp-Rekombinase kodieren. Dagegen wird die Cre-vermittelte Rekombination vorzugsweise zur konditionalen Modifizierung von loxP-Stellen flankierten Genloci eingesetzt.

Obwohl die Verwendung von zwei unabhängigen ortsspezifischen Rekombinase-Systemen generell möglich ist, sind duale Rekombinasestrategien in der Praxis durch die vergleichsweise niedrige Effizienz der Flp-Rekombinase limitiert. Es wurde berichtet, dass die Transfektion von Flp-kodierenden Plasmiden in ES-Zellen durchschnittlich zu Rekombinationseffizienzen von 6% führt (Schaff *et al.*, 2001). Auch

nach Optimierung der Transfektionsbedingungen sowie des Vektor-Designs gelang es innerhalb des Arbeitskreises nicht, die Flp-vermittelte Rekombinationsrate auf mehr als 20% zu steigern (Patsch, persönliche Kommunikation). Für die vergleichsweise niedrige Effizienz der Flp/FRT-Rekombination gibt es verschiedene Erklärungen. Wie 2002 von Andreas *et al.* publiziert wurde, beträgt die Flp-Rekombinationsaktivität auf chromosomale Zielsequenzen nur 10% im Vergleich zu Cre. Mit Hilfe einer vergleichenden kinetischen Analyse von Flp und Cre wurde gezeigt, dass Flp eine niedrigere Bindungsaffinität zu FRT-Stellen hat als Cre zu loxP-Stellen, wobei Cre-Dimere ihre Zielsequenz mit etwa dreifach höherer Kooperativität binden. Im Vergleich zu Cre wird mehr als zehnmals mehr aktives Flp-Protein benötigt, um eine definierte Menge an DNA-Substrat zu deletieren (Ringrose *et al.*, 1998). Ein weiterer Grund für eine niedrige Effizienz der Flp-vermittelten Rekombination in Säugerzellen scheint der natürliche Ursprung dieser Rekombinase zu sein. Die Temperaturoptima von Cre und Flp (37-39°C bzw. 25-30°C) korrelieren mit ihren ursprünglichen Wirten. Infolgedessen wurde gezeigt, dass Flp weniger thermostabil ist und dementsprechend bei 37°C signifikant weniger aktiv ist (Buchholz *et al.* 1996). Mit Hilfe einer molekularen Evolution wurde Flpe generiert, eine modifizierte Flp-Variante mit einer verbesserten Leistungsfähigkeit bei 37°C (Buchholz *et al.*, 1998). Obwohl Flpe eine fünffach höhere Aktivität als wildtypisches Flp aufweist, ist das relative Aktivitätsniveau von Flpe in transienten Transfektions-Untersuchungen dennoch nur 25% von dem der Cre-Rekombinase. Diese intrinsischen Einschränkungen des Flp-Proteins behindern die Verwirklichung von dualen Rekombinasestrategien in diversen Zelltypen, insbesondere ES-Zellen. Daher wird in vielen Anwendungen der konditionalen Mutagenese eine Tri-loxP-Strategie verfolgt, in der Cre sowohl zur Entfernung der Selektionskassette als auch zur Manipulierung des konditionalen Allels verwendet wird. Diese Strategie erfordert aufwendige Untersuchungen zur Identifizierung und Selektion der gewünschten Klone, die das konditionale Allel, flankiert von zwei loxP-Stellen, tragen. Die Verfügbarkeit von zwei effizienten Rekombinasesystemen würde neben einer individuellen Entfernung von Selektionskassetten auch die Etablierung von dualen Rekombinasestrategien ermöglichen, mit denen komplexere Fragestellungen gelöst werden können. Hierzu gehört die induzierbare und reversible Überexpression von Transgenen. Daher ist es erstrebenswert, die Flp-vermittelte Rekombination effizienter zu gestalten.

## A 6 Proteintransduktion

Klassische Methoden zur Überexpression von Proteinen *in vitro* beruhen auf dem Einbringen der entsprechenden kodierenden DNA (z.B. durch Transfektion oder virale Transduktion). Bei diesen Anwendungen kann eine dauerhafte genetische Modifikation der Zielzellen durch den Einbau der Fremd-DNA in das Zell-Genom nicht ausgeschlossen werden. Außerdem können technische Limitierungen die Analyse erschweren. Hierzu gehören schlechte Transfektionsraten, hohe erforderliche Zellzahlen oder eine unzureichend kontrollierte Zielgenexpression.

Mit Hilfe einer alternativen Technik der Zellmanipulation, der sogenannten Proteintransduktion, können die genannten Einschränkungen umgangen werden. Hierzu wird das gewünschte Protein mit einer Proteintransduktionsdomäne (PTD), welche die Zellpermeabilität bewirkt, fusioniert. Das Protein wird meist rekombinant hergestellt und mit einer definierten Konzentration direkt in das Medium gegeben. Die Zielzelle bleibt genetisch unverändert, da das Protein direkt eingebracht wird (Dietz & Bähr, 2004; Patsch & Edenhofer, 2007).

Natürliche PTDs wurden in pflanzlichen und bakteriellen Toxinen (Falnes & Sandvig, 2000), Wachstumsfaktoren (Jans & Hassan, 1998), Homeoproteinen (Prochiantz, 2000) und viralen Proteinen identifiziert (Frankel & Pabo, 1988; Green & Loewenstein, 1988; Elliott & O'Hare, 1997). Die prominenteste PTD ist TAT, ein basisches Peptid aus 11 Aminosäuren, abgeleitet von dem TAT- (*transactivator of transcription*) Protein des HI- (*human immunodeficiency*) Virus-1 (Fawell *et al.*, 1994).

Das gängige Modell für die TAT-vermittelte Proteintransduktion beinhaltet mehrere Schritte. Zunächst bindet die PTD über elektrostatische Wechselwirkungen mit den Glykanketten der extrazellulären Matrix an die Zelloberfläche (Rusnati *et al.*, 1997; Hakansson *et al.*, 2001). Das TAT-Fusionsprotein wird durch eine spezialisierte Form der Endozytose aufgenommen. Diese sogenannte Makropinozytose wird von allen Zelltypen verwendet (Wadia *et al.*, 2004; Tünnemann *et al.*, 2006). Der Freisetzungsmechanismus der TAT-Proteine in das Zytoplasma limitiert die Transduktionseffizienz und ist noch nicht aufgeklärt. Kaplan *et al.* (2005) konnten zeigen, dass mehr als 90% der aufgenommenen Fusionsproteine in den Makropinosomen verbleiben. Durch endosomolytische Agenzien wie Chloroquin wird der zytoplasmatische

Proteinanteil erhöht (Caron *et al.*, 2004; Sloots & Wels, 2005). Auch die Cotransduktion mit einem fusogenen TAT-Peptid (dTAT-HA2), das Membranen pH-abhängig destabilisiert, führt zu erhöhten Transduktionseffizienzen (Wadia *et al.*, 2004).

Mittlerweile gelang mit Hilfe der TAT-PTD die Transduktion diverser Proteine (Dietz & Bähr, 2004), darunter auch Transkriptionsfaktoren (Bosnali & Edenhofer, 2008; Landry *et al.*, 2008). Eine zellpermeable Version der Cre-Rekombinase (HTNCre) basiert ebenfalls auf der TAT-Domäne. Mit diesem transduzierbaren Protein konnten loxP-modifizierte Allele von transgenen Fibroblasten (Peitz *et al.*, 2002), murinen (Peitz *et al.*, 2007) und humanen ES-Zellen (Nolden *et al.*, 2006), ES-Zell-abgeleiteten neuralen Vorläufern sowie postmitotischen Neuronen (Haupt *et al.*, 2007) hocheffizient rekombiniert werden. Ob die Effizienz der Flp-vermittelten Rekombination durch ein zellpermeables Flpe-Protein gesteigert werden kann, bleibt festzustellen.

## **A 7 Zielsetzung der Arbeit**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung des *Bmpr1a* für den Pluripotenzerhalt von ES-Zellen sowie das Differenzierungspotential neuraler Vorläuferzellen anhand eines konditionalen *bmpr1a-Knockouts* (Mishina *et al.*, 2002) untersucht werden. Voraussetzung für Teile dieser Analyse war eine möglichst vollständige Inaktivierung des *bmpr1a* in kultivierten Zellen. In diesem Zusammenhang galt es daher auch die Rekombinationseffizienz der bereits etablierten transduzierbaren Variante des Cre-Proteins (HTNCre) zu überprüfen (Peitz *et al.*, 2002).

### **Inaktivierung von *bmpr1a* in ES-Zellen**

Der Einfluss des *Bmpr1a* auf die Pluripotenzerhaltung von ES-Zellen sollte anhand verschiedener Aspekte analysiert werden. So sollte das Proliferationspotential, die Klonogenität, das Differenzierungsverhalten sowie die Expression Pluripotenz-assoziiierter Gene von *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen bestimmt werden. Eine ausreichend hohe Effizienz der *bmpr1a*-Deletion vorausgesetzt, sollten vergleichende Analysen auf monoklonaler und polyklonaler Ebene durchgeführt werden.

### **Inaktivierung von *bmpr1a* in neuralen Vorläuferzellen**

Vor der *bmpr1a*-Inaktivierung in neuralen Vorläuferzellen sollten ES-Zellen mit dem konditionalen *bmpr1a-Knockout* entsprechend differenziert werden. Anschließend sollte analysiert werden, inwiefern sich der Verlust des Bmpr1a auf das oligodendrogliale- bzw. astrozytäre Differenzierungspotential auswirkt. Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass die Bmp-vermittelte Signalweiterleitung die astrozytäre Differenzierung fördert und die Differenzierung von Oligodendrozyten inhibiert (Gomes *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 1996; Mehler *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1999).

### **Reversibel induzierbare Geninduktion mit zellpermeablen Cre- und Flpe-Rekombinasen**

Um Manipulationsmöglichkeiten *in vitro* zu erweitern, sollte außerdem die Effizienz einer zellpermeablen Flpe-Rekombinase analysiert werden. Geplant war das transduzierbare Flpe-Protein sequentiell mit der bereits etablierten HTNCre-Rekombinase (Peitz *et al.*, 2002) zu verwenden. Um dieser Fragestellung nachzugehen, sollte ein Vektor zur reversiblen Geninduktion kloniert und mit Hilfe eines Reportergens getestet werden.

## **B Material und Methoden**

### **B 1 Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterialien wie Pipetten, Gewebekulturschalen, Multiwellplatten, Zentrifugationsröhrchen, Zellschaber und Zellsiebe waren von den Firmen Biorad (München), Corning Coster (New York, USA), Eppendorf (Hamburg), Falcon/Becron Dickinson (Heidelberg), Greiner (Nürtingen), Nunc (Wiesbaden), Millipore (Billerica, USA) und Peqlab (Erlangen).

Glaswaren wurden von der Firma Schott (Mainz) bezogen.

### **B 2 Chemikalien**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen ICN (Eschwege), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemica (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen und entsprachen dem Reinheitsgrad „reinst“ oder „p.a.“. Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore (Eschborn) angesetzt. Alle Lösungen wurden nach dem Ansetzen durch eine 0,2 µm Membran filtriert.

### **B 3 Materialien für molekularbiologische Methoden**

100 mM dATP-, dCTP-, dGTP- und dTTP Set	Peqlab (Erlangen)
1 kb DNA Leiter	NEB (Frankfurt am Main)
100 bp DNA Leiter	NEB (Frankfurt am Main)
Agarose für präparative Zwecke	Biozym (Hess. Oldendorf)
Expand High Fidelity PCR System	Roche (Mannheim)
Fluorescein	Biorad (München)
GFX™ <i>Micro</i> Plasmid Prep Kit	GE Healthcare (München)
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega (Mannheim)
iScript cDNA Synthese Kit	Biorad (München)
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega (Mannheim)

Proteinase K	Roche (Mannheim)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Restriktionsendonukleasen	NEB (Frankfurt am Main)
RNase A	Qiagen (Hilden)
RQ1 RNase-freie DNase	Promega (Mannheim)
Shrimp-Alkalische Phosphatase	Roche (Mannheim)
SYBR <sup>®</sup> Green I	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Taq DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase	NEB (Frankfurt am Main)
T4-DNA-Polymerase	NEB (Frankfurt am Main)
Trizol <sup>®</sup>	Invitrogen (Karlsruhe)

#### **B 4            Materialien für proteinbiochemische Methoden**

6x His Protein Leiter	Qiagen (Hilden)
15 ml-Konzentratoren (10.000 MWCO)	Sartorius (Göttingen)
Benzonase	Novagen (Darmstadt)
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dialysemembran ZelluTrans (V-Serie)	Roth (Karlsruhe)
<i>GelCode Blue</i> Färbe-Reagenz	Perbio (Bonn)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
Nitrozellulosemembran	Roth (Karlsruhe)
Penta-His HRP Conjugate Kit	Qiagen (Hilden)
<i>Prestained Protein Marker, Broad Range</i> (6-175 kDa)	NEB (Frankfurt am Main)
<i>SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate</i>	Perbio (Bonn)
<i>SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate</i>	Perbio (Bonn)

**B 5 Materialien für immunzytochemische Methoden**

DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Vector® Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit	Vector (Burlingame, CA, USA)

**B 6 Materialien für zellbiologische Methoden**

AA ( <i>Ascorbic Acid</i> )	Sigma-Aldrich (Steinheim)
B27	Gibco (Karlsruhe)
Bmp4 ( <i>Bone Morphogenic Protein 4</i> )	R&D (Wiesbaden)
BSA ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )	Gibco (Karlsruhe)
Chloroquin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; 4500mg/l Glukose)	Gibco (Karlsruhe)
D-MEM/F-12	Gibco (Karlsruhe)
DMSO	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dulbecco's PBS ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> ) Ohne Magnesium, Calcium und Natriumbicarbonat	Gibco (Karlsruhe)
Egf ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )	R&D (Wiesbaden)
ExGen 500	Fermentas (St. Leon-Rot)
FCS ( <i>Fetal Calf Serum</i> )	Gibco (Karlsruhe)
Fgf2 ( <i>Fibroblast Growth Factor 2</i> )	R&D (Wiesbaden)
Fn (Fibronectin)	Invitrogen (Karlsruhe)
G-418 Sulfat	PAA (Pasching)
Ganciclovir	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Gefriermedium ohne DMSO, Serum-frei	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Gelatine Typ A	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glucose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
GlutaMAX™ D-MEM mit 4500mg/l Glucose	Gibco (Karlsruhe)
Hühnerserum	Gibco (Karlsruhe)
Insulin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
L-Glutamin	Gibco (Karlsruhe)
L-Glutamin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lif ( <i>Leukemia Inhibitory Factor</i> )	Chemicon (Hofheim)
Ln (Laminin)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
MMC (Mitomycin C)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumpyruvat	Gibco (Karlsruhe)
Natrium-Selenit	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Neurobasal Medium	Gibco (Karlsruhe)
nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco (Karlsruhe)
NS-A Medium	Euroclone (Pero, Italien)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco (Karlsruhe)
PO (Polyornithin)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Progesteron	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Putrescin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
T3 (3,3,5-Triiodothyronin)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TAT-HA (TAT-Hemagglutinin)	Invitrogen (Karlsruhe)
Transferrin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypsin/EDTA	Gibco (Karlsruhe)
Trypan-Blau	Gibco (Karlsruhe)

**B 7            Materialien für Karyotypisierungen**

Colcemid	Gibco (Karlsruhe)
Giemsa-Färbelösung	Sigam-Aldrich (Steinheim)

**B 8            Bakterienstämme**

<b>DH5α™</b>	Invitrogen (Karlsruhe)
Genotyp	F-φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR, recA1 endA1 hsdR17(rk- mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1

<b>BL21(DE3)</b>	Novagen (Darmstadt)
Genotyp	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i>

<b>TUNER™ (DE3)</b>	Novagen (Darmstadt)
Genotyp	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm lacY1</i> (DE3)

## **B 9 Eukaryotische Zelllinien und Mausstämme**

Die Mausstämme wurden für die Präparation von embryonalen Fibroblasten verwendet.

**CD-1** Charles River (Sulzfeld)  
Mausstamm

**CD-1-neo** A. Zimmer (Molekulare Neurobiologie, Bonn)  
Das im Mausstamm „*drastic*“ enthaltene Neomycintransgen wurde in den CD-1 Mausstamm eingekreuzt.

**NIH 3T3** ATCC® Nummer: CRL-1658™  
murine Fibroblasten vom Zelltyp *swiss mouse embryo*

**FC-3T3** Patsch, 2005  
transgene NIH-3T3-Flp-Reporterzelllinie

**Bruce4** K. Rajewsky (Genetik, Köln; CBR, Boston, USA)  
Murine ES-Zelllinie des Stammes C57/BL6 für die Generierung der transgenen Flp-Reporterzelllinie FC-ES

***Bmpr1a<sup>fl/fl</sup>*** Mishina *et al.*, 2002  
Murine ES-Zelllinie mit Cre-induzierbarer *bmpr1a*-Exon2-Deletion und *ROSA26lacZ*-Cre-Reporter (ursprünglich als *Bmpr1a<sup>fx/fx</sup>* bezeichnet)

## **B 10 Molekularbiologische Methoden**

### **B 10.1 Methoden zur Arbeit mit RNA**

*Bei allen Arbeiten mit RNA wurden RNase-freie Gefäße, Filterspitzen und Lösungen verwendet.*

### **B 10.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA**

Die Isolierung der RNA wurde mit Trizol® (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Lösen der RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser, wurden eventuell verbleibende DNA-Kontaminationen mit RQ1 RNase-freier DNase hydrolysiert. Die Hydrolyse wurde folgendermaßen angesetzt:

30 µl RNA  
5 µl RQ1 RNase-freier DNase 10x Puffer  
5 µl RQ1 RNase-freie DNase  
10 µl RNase-freies Wasser

Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurde die DNase-Reaktion durch Zugabe von 5 µl RQ1 DNase Stop Lösung und anschließende 10-minütige Hitzeinaktivierung bei 65°C beendet.

Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) bestimmt. Eine  $OD_{260}$  Einheit entspricht dabei 40 µg/ml RNA. Die RNA wurde bei -80°C gelagert oder sofort für die Reverse Transkription eingesetzt.

### **B 10.1.2 RT-Reaktion**

Die reverse Transkription wurde mit dem *iScript* cDNA Synthese Kit (Biorad, München) nach Angaben des Herstellers in einem *Trio Thermocycler* (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Pro Reaktionsansatz wurde 1 µg RNA eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde bei 4°C gelagert.

### **B 10.1.3 RT-PCR**

Identische cDNA-Mengen der zu vergleichenden Proben wurden durch eine cDNA-Titration mit Aktin- bzw. Gapdh-spezifischen *Primern* gewährleistet.

Um eine gleichmäßige Verteilung der cDNA zu erzielen, wurde zunächst ein Master-Mix mit allen Komponenten bis auf die jeweiligen *Primer* zusammenpipettiert.

### semiquantitative RT-PCR

Final setzten sich die Ansätze folgendermaßen zusammen:

5 µl	5x <i>Green</i> GoTaq® Flexi Puffer
0,5 µl	10 mM dNTP-Mix
x µl	25 mM MgCl <sub>2</sub> (siehe Tabelle B 1)
0,125 µl	GoTaq® DNA Polymerase
x µl	cDNA
2 µl	10 µM <i>FW Primer</i>
2 µl	10 µM <i>RV Primer</i>
ad 25 µl	H <sub>2</sub> O

**Tabelle B 1: Primer für semiquantitative RT-PCR-Analysen**

Primer	Sequenz (5'→3')	Annealing Temp. [°C]	MgCl <sub>2</sub> -Konz. [mM]	Zyklusanzahl	Produktgröße [bp]	Referenz
<i>Bmpr1a</i>	FW: GCTCCATGGCACTGGTATG RV: GCAATAGTTCGCTGAACC	54	1,2	30	606	Gossrau <i>et al.</i> , 2007
<i>Bmpr1b</i>	FW: TAACATGCTCTTACGAAG CTCTGGAA RV: GAGCTCTGAGACTGCTCG ATCAAGTC	59	2	35	560	Qi <i>et al.</i> , 2004
<i>Bmpr1I</i>	FW: CTCTGAGCATTGATGTCCAG RV: CAAGCTAGAACTGGTACTGC	55	1,2	30	418	Gossrau <i>et al.</i> , 2007
<i>Alk1</i>	FW: ACCATGACCTTGGGGAG CTCAGA RV: TAGTACAGTCGCTGTCCA GGAAGT	59	2	35	549	Qi <i>et al.</i> , 2004
<i>Alk2</i>	FW: ATACAATGGTCGATGGAG TAATGAT RV: AGAGCAACTCCAAGGATG CAAGCTAA	59	1,2	35	442	Qi <i>et al.</i> , 2004
<i>Bmp2</i>	FW: GTTTGTGTTTGCTTGACGC RV: AGACGTCCTCAGCGAATTTG	55	1,2	35	720	Hamazaki <i>et al.</i> , 2004
<i>Bmp4</i>	FW: TGTGAGGAGTTTCCATCAG RV: TTATTCTTCTTCTGGACCG	59	1,2	35	566	Hamazaki <i>et al.</i> , 2004
<i>Gapdh</i>	FW: ACGACCCCTTCATTG ACCTCAACT RV: ATATTTCTCGTGGTT CACACCCAT	55	1,2 oder 2	23	319	Gossrau <i>et al.</i> , 2007

Die Reaktionen fanden in einem *Trio Thermocycler* (Biometra, Göttingen) mit Bedingungen nach Angaben des Herstellers für die GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Mannheim) statt. Hybridisierungstemperaturen und Anzahl der Zyklen

sind in Tabelle B 1 vermerkt. Die Polymerisierung erfolgte für 30 Sekunden je 0,5 kb zu amplifizierendes Fragment. Die PCR-Produkte wurden auf 1%igen Agarosegelen analysiert und mit dem Geldokumentationssystem GelDoc2000 (Biorad, München) dokumentiert.

<b>TAE (Tris-Azetat-EDTA)</b>	40 mM	Tris-Azetat
	2 mM	EDTA
<b>Agarosegele</b>	1% (w/v)	Agarose
	10 µg/ml	Ethidiumbromid
		in TAE

**10x Probenpuffer für DNA-Agarosegel-Elektrophorese**

50% (v/v)	Glycerin
0,25% (w/v)	Xylencyanol
0,25% (w/v)	Bromphenolblau
1 mM	EDTA

**qRT-PCR (quantitative RT-PCR)**

Final setzten sich die Ansätze folgendermaßen zusammen:

5 µl	5x <i>Colorless</i> GoTaq® Flexi Puffer
1 µl	10 mM dNTP-Mix
x µl	25 mM MgCl <sub>2</sub> (siehe Tabelle B 2)
3,75 µl	10x <i>SYBR Green I</i>
0,5 µl	1 µM Fluorescein
0,125 µl	GoTaq® DNA Polymerase
x µl	cDNA
(1,25 µl	DMSO, siehe Tabelle B 2)
1 µl	5 µM <i>FW Primer</i>
1 µl	5 µM <i>RV Primer</i>
ad 25 µl	H <sub>2</sub> O

**Tabelle B 2: Primer für qRT-PCR-Analysen**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>	<b>Annealing Temp. [°C]</b>	<b>DMSO</b>	<b>MgCl<sub>2</sub>-Konz. [mM]</b>	<b>Produktgröße [bp]</b>	<b>Referenz</b>
<i>Rex1</i>	FW: CGTGTAACATACACCATCCG RV: GAAATCCTCTTCCAGAATGG	55	ja	2	130	Hamazaki <i>et al.</i> , 2004
<i>Oct4</i>	FW: CCCTGCAGAAGGAGCTAGAAC RV: CTTAAGGCTGAGCTGCAAGG	60	variabel	2 oder 3	160	S. Ber, rekonstruktive Neurobiologie, Bonn
<i>Nanog</i>	FW: AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG RV: CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG	64	ja	2	363	Hamazaki <i>et al.</i> , 2004
<i>Id1</i>	FW: TCCGCCTGTTCTCAGGATCA RV: GTAGCAGCCGTTTCATGTCGT	60	nein	3	216	Ying <i>et al.</i> , 2003b
<i>Aktin</i>	FW: CTGGCTCCTAGCACCATGAA RV: GCCGGACTCATCGTACTCCT	variabel	je nach Zielgen	2 oder 3	140	M. Bosnali, rekonstruktive Neurobiologie, Bonn

Die Reaktionen fanden in einem *iCycler* (Biorad, München) im Triplikate mit Bedingungen nach Angaben des Herstellers für die GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase (Promega, Mannheim) statt. Hybridisierungstemperaturen und Anzahl der Zyklen sind in Tabelle B 2 vermerkt. Die Polymerisierung erfolgte für 30 Sekunden je 0,5 kb zu amplifizierendes Fragment. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde auf 1%igen Agarosegelen und über Schmelzkurven analysiert.

Zur Berechnung der relativen Genexpressionen auf Grundlage der aus der qRT-PCR gewonnenen Daten wurde die  $\Delta\Delta CP$ -Methode verwendet. Der CP (*crossing point*)-Wert entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen, die nötig ist, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am CP befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Die Expression des jeweiligen Zielgens wird auf die Expression eines homogen exprimierten Referenzgens bezogen:  $\Delta CP = CP_{Zielgen} - CP_{Referenzgen}$ . Nach dieser Normierung wird vom  $\Delta CP$ -Wert der Proben der  $\Delta CP$ -Wert der Kontrolle abgezogen:  $\Delta\Delta CP = \Delta CP_{Probe} - \Delta CP_{Kontrolle}$ . Der relative Expressionsunterschied (Ratio) einer Probe zur Kontrolle, normalisiert auf ein Referenzgen, ergibt sich aus der Formel  $Ratio = 2^{-\Delta\Delta CP}$ . Liegt der relative Expressionsunterschied unter 1, so ist das analysierte Gen in der Probe im Vergleich

zur Kontrolle herunterreguliert, liegt er über 1, so ist das Gen im Vergleich zur Kontrolle heraufreguliert. Als Referenzgen wurde Gapdh gewählt. Diese Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt und basieren auf zwei unabhängigen Experimenten.

## B 10.2 Methoden zur Arbeit mit DNA

### B 10.2.1 PCR von Plasmid-DNA für Klonierungszwecke

Primer-Sequenzen sowie PCR-Bedingungen sind in Tabelle B 3 und Plasmide in Tabelle B 4 vermerkt.

Es wurden die Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) oder das Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim) ohne DMSO verwendet. Das Produkt wurde über 30 Zyklen amplifiziert.

**Tabelle B 3: Primer für Klonierungszwecke**

Zielgen	Sequenz (5'→3')	Annealing Temp. [°C]	MgCl <sub>2</sub> -Konz. [mM]	Produktgröße [bp]	
tk	5Pac-FRT-TK: GTCCTTAATAAGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAAGTATA GGAACCTCGCCACCATGGCTTCGTACCCCGGCCATCAACACGCCTCTGCG	54	1,5	1536	
	3Spe-TK: TTCAACTAGTCACCAGACCCACGCAAC				
SV40 polyA	5Hind-FRT-Swa-pA: TATGAAGCTTGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAAGTATAG GAACTTCATTTAAATCAGACATGATAAGATACATTGATG	54	1,5	305	
	3Eco-MCS-pA: TATGGAATTCCTAGGCGCGCCGCGCCCTACCACATTTGTAGAGGTTTT AC				
neo	5Fse-SA-lox: TATGGCCGGCCTCCCTTTTTTCCACAGGAGATCTAGCTAGATATCGAT G 3Fse-lox: AGGCCGGCCAGTTATGTCGACTCTAGATAA	56	1,2	2105	
loxOligo	5Mlu-Avr-Asc-loxP CGCGTCCTAGGGCGCGCCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTT AT 3Mlu-Avr-Asc-loxP CGCGATAACTTCGTATAGCATACTATACGAAGTTATGGCGCGCCCTAG GA	zur Oligo-Klonierung		/	53

**Tabelle B 4: Plasmide**

	<b>Verwendung</b>	<b>Quelle</b>
pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Klonierungsvektor	Promega, Mannheim
pBS TK	enthält das <i>tk</i> -Gen zur negativen Selektion mit Ganciclovir	Wunderlich, 2004
pEasy Flox	enthält ein mit loxP-Stellen flankiertes <i>Neomycin</i> -Resistenzgen	T. Wunderlich, Genetik, Köln
pHcRed1-1	enthält die <i>SV40-polyA</i> Sequenz	Clontech, Mountain View, USA
C-tHL-DR	enthält das lacZ-Reportergen	S. Haupt, rekonstruktive Neurobiologie, Bonn
pRDR	Ausgangsvektor für das FC-Konstrukt	Wunderlich, 2004

### **B 10.2.2      Aufreinigung PCR-amplifizierter DNA-Fragmente**

Zur Isolierung der PCR-Produkte aus der PCR-Reaktion wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers benutzt.

### **B 10.2.3      DNA-Restriktion**

Die Restriktion der DNA mittels Endonucleasen erfolgte unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Puffer und Temperaturen für 1 bis 3 Stunden. Es wurden 2 bis 5 U Enzym pro µg DNA eingesetzt.

### **B 10.2.4      Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel**

Die Fragmentisolierung wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Vorschriften durchgeführt.

### **B 10.2.5      DNA-Ligation**

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4 DNA Ligase (NEB, Frankfurt am Main) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden gewöhnlich 50 ng des größeren und ein dreifacher molarer Überschuss des kleineren Fragments verwendet.

### **B 10.2.6 Oligo-Klonierung**

Die beiden komplementären Oligonukleotide wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, für 5 Minuten bei 94°C inkubiert und über Nacht langsam bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Die hybridisierten Oligonukleotide wurden mit dem Vektor ligiert (siehe oben). Nach Hitzeinaktivierung der Ligase wurde der Ansatz mit der entsprechenden Restriktionsendonuclease inkubiert, um Multikopien der Oligonukleotide zu entfernen. Das Restriktionsenzym wurde hitzeinaktiviert und der Ansatz mittels des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) von Unreinheiten befreit. Nach erneuter Ligation wurde das Plasmid amplifiziert (siehe unten).

### **B 10.2.7 DNA-Dephosphorylierung**

Um die Religation eines endonukleolytisch gespaltenen Plasmids zu verhindern, wurde der Reaktionsansatz mit Shrimp-Alkalischer Phosphatase (Roche, Mannheim) versetzt. Diese entfernt die Phosphate an den freien 5'-Überhängen des gespaltenen Plasmids. Das Enzym wurde entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

### **B 10.2.8 Herstellung von glatten DNA-Enden**

Zur Herstellung von glatten DNA-Enden wurde 1 µg Fragment mit 3 U T4-DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt am Main) nach Angaben des Herstellers inkubiert. Das Enzym katalysiert die DNA-Synthese in 5'-3'-Richtung und hat in 3'-5'-Richtung Exonuklease-Aktivität, sodass klebrige DNA-Enden aufgefüllt bzw. abgebaut werden.

### **B 10.2.9 Amplifikation von Plasmid-DNA**

Die Amplifikation von Plasmid-DNA erfolgte durch Transformation von kompetenten DH5α™-Bakterien. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 100 µl Bakteriensuspension wurden mit 10 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden wurden die Zellen für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Expression der Resistenzgene wurde der Ansatz mit 900 µl SOC-Medium bei 37°C 1 Stunde geschüttelt. Die Bakterien wurden

anschließend bei 12000 x g kurz zentrifugiert, auf Antibiotika-haltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne, auf den Platten gewachsene Kolonien wurden anschließend in Flüssigmedium kultiviert. Aus den jeweiligen Kulturen erfolgte dann die Isolierung der Plasmid-DNA.

**SOC- (*Super optimal broth with catabolite repression*-) Medium**

10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
2% (w/v)	Trypton
0,5% (w/v)	Hefeextrakt
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	MgSO <sub>4</sub>
20 mM	Glucose

**LB- (*Luria-Bertani*-) Medium**

10 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	NaCl

**LB-Agar**

1,5% (w/v)	Agar
(100 µg/ml	Ampicillin oder
50 µg/ml	Carbenicillin)
	in LB-Medium

**B 10.2.10 Verfahren der „Blau-Weiß-Selektion“ zum Nachweis eingebauter DNA**

Dieses Verfahren dient dem Nachweis eingebauter DNA-Fragmente in Klonierungsvektoren. Hierfür wurde der pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (Promega, Mannheim) verwendet. Der Vektor ist mit EcoRV geschnitten und weist an der Restriktionsstelle einzelne 3'-Thymidin-Überhänge auf. Diese bilden die Insertionsstelle für die PCR-Fragmente. Da die Insertionsstelle innerhalb der kodierenden Region eines β-

Galaktosidasegens liegt, können rekombinante Klone durch ihre fehlende blaue Färbung auf einer Indikator- (80 µg/ml X-Gal) und Antibiotika-haltigen LB-Platte identifiziert werden.

Ligation und Transformation erfolgten wie vom Hersteller empfohlen.

Die T7- und SP6-flankierenden Bereiche ermöglichten die Sequenzierung (siehe B 10.2.12) des zu analysierenden PCR-Fragments bis zu 1 kb mit T7- und SP6-spezifischen *Primern* (Promega, Mannheim; siehe Tabelle B5).

### **B 10.2.11 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Für die Präparation kleiner Plasmid-Mengen wurden das GFX™ *Micro* Plasmid Prep Kit (GE Healthcare, München) verwendet.

Größere Plasmidmengen wurden mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) isoliert.

Es wurden die Angaben des Herstellers befolgt.

### **B 10.2.12 DNA-Sequenzierung**

Sequenzierungs-*Primer* sind in Tabelle B 5 aufgelistet. Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch Mitarbeiter des Servicelabors des ZMMK (Köln) auf einem ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA) mit der *Taq FS BigDye-terminator cycle sequencing* Methode. Dabei wurde nach ZMMK-Hinweisen vorgegangen.

**Tabelle B5: Sequenzierungs-*Primer***

<i>Primer</i>	Sequenz (5'→3')
<i>Sp6</i>	TATTTAGGTGACACTATAG
<i>T7</i>	TAATACGACTCACTATAGGG
<i>5TK-Seq</i>	CTTCGACCGCCATCCCATC
<i>Neo-Seq</i>	GCTTTGCTCCTTCGCTTTCTG

### **B 10.2.13 Ungerichtete Klonierung**

Hierbei entsteht ein PCR-Fragment mit identischen Überhängen, das im Zielvektor in beiden Orientierungen vorliegen kann. Durch Restriktionsanalyse können Klone mit nicht korrekt inserierten Fragmenten identifiziert werden.

### **B 10.2.14 Gerichtete Klonierung**

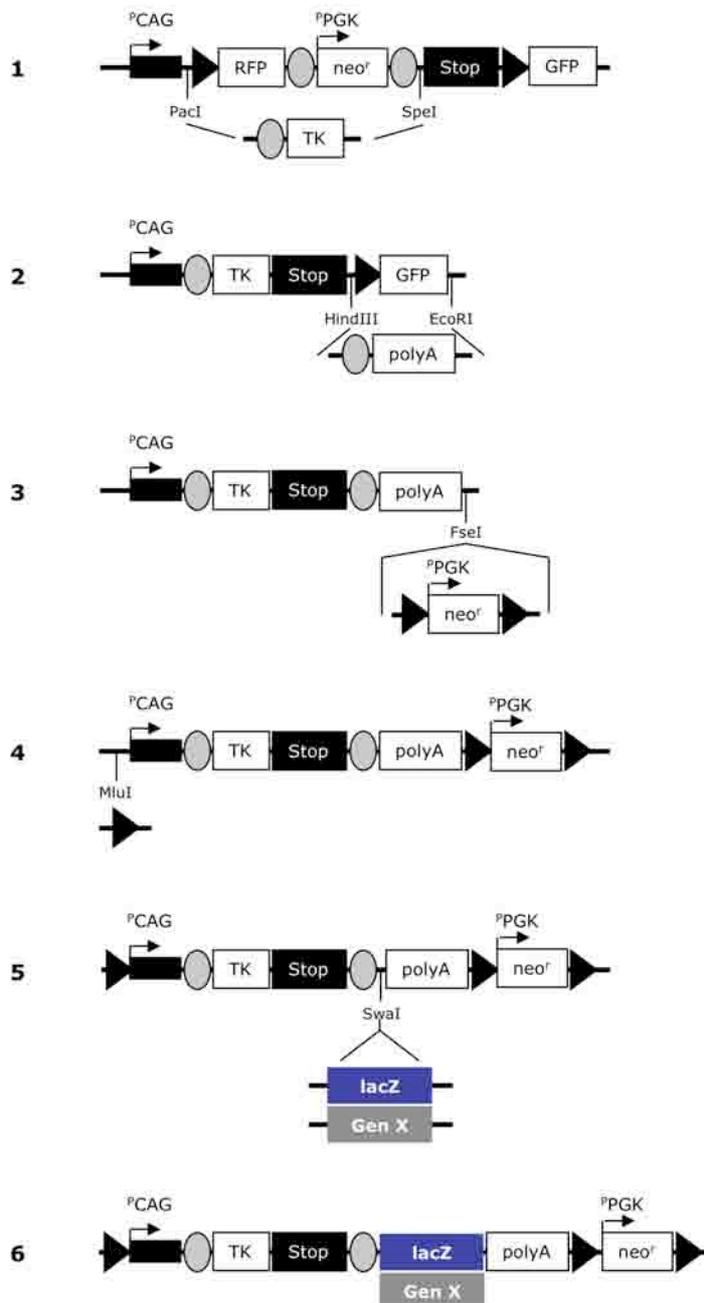
Hierbei hat das PCR-Fragment unterschiedliche Überhänge und kann nur in einer Orientierung inserieren.

### **B 10.2.15 Klonierung eines Vektors zur reversiblen Geninduktion**

Für die Klonierung des pFC- (Flp-ON-Cre-OFF-) Plasmids wurden die Fragmente FRT-TK, FRT-polyA und loxP-neo<sup>r</sup>-loxP mit den entsprechenden Schnittstellen amplifiziert und zur Sequenzierung in die multiple Klonierungsstelle (MCS; *multiple cloning site*) des Vektors pGEM<sup>®</sup>-T Easy eingebracht. Es wurden nur Klone ohne Mutationen weiterverwendet.

Die Klonierungsschritte sind in Abbildung B 1 dargestellt. Aus dem Vektor pRDR (Wunderlich, 2004) wurde ein loxP- und FRT-Stellen flankiertes Fragment mit PacI und SpeI herausgeschnitten (1) und durch das PacI und SpeI geschnittene FRT-TK ersetzt (2). Im nächsten Schritt wurde ein Fragment mit HindIII und EcoRI entfernt und durch das HindIII und EcoRI geschnittene FRT-polyA ausgetauscht (3). Eine SwaI-Schnittstelle zwischen der FRT-Stelle und dem polyA diente später zum Einbringen des Zielgens. Der Vektor (3) wurde mit FseI linearisiert und dephosphoryliert, um das loxP-Stellen-flankierte Neomycin, ebenfalls mit FseI geschnitten, ungerichtet einzufügen (4). Das Plasmid wurde anschließend mit MluI geschnitten und dephosphoryliert und mit dem loxOligo DNA-Oligomer, das mit MluI-Schnittstellen flankiert ist, religiert. Hier war darauf zu achten, dass die loxP-Stelle in der richtigen Orientierung inseriert war. In den fertigen Vektor (5) konnten verschiedene Zielgene mit glatten DNA-Enden durch Linearisierung mit SwaI eingebracht werden.

In dieser Arbeit wurde das *lacZ*-Reportergen in den Vektor eingefügt. Das *lacZ*-Fragment wurde mit *AscI* und *FseI* aus dem Vektor C-tHL-DR (S. Haupt, unpubliziert) geschnitten. Anschließend wurden die DNA-Enden geglättet und in das linearisierte und dephosphorylierte Plasmid religiert (6).



**Abb. B 1: Schema der pFC-Klonierung.**

Wichtige Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. FRT-Stellen sind als graue Kreise und *loxP*-Stellen als schwarze Dreiecke dargestellt. *TK*: Thymidinkinase; *RFP*: red fluorescent protein; *neo<sup>r</sup>*: Neomycin-Resistenz; *GFP*: green fluorescent protein; *Stop*: Westphal-Stopsequenz;  $P^{CAG}$  und  $P^{PGK}$ : Promotoren; *polyA*: Polyadenylierungssignal.

### B 10.2.16 Isolierung von genomischer DNA

Je nach Zelltyp wurden die Kulturen abgeschabt oder trypsiniert und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS gewaschen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in Lysepuffer resuspendiert, auf dem Vortexer gut durchmischt und über Nacht bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von Isopropanol im Verhältnis 1:1 wurde die DNA durch das Vermischen auf einem Vortexer gefällt und für 30 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und für 15 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Die DNA wurde getrocknet und je nach Menge in 40 bis 200 µl TE aufgenommen. Um den Lösevorgang zu erleichtern, wurde die DNA über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

#### Zellysepuffer zur Präparation genomischer DNA

100 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
200 mM	NaCl
5 mM	EDTA
0,2% (w/v)	SDS
200 µg/ml	Proteinase K

<b>TE (Tris/EDTA) + RNase</b>	10 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
	1 mM	EDTA
	50 µg/ml	RNase

### B 10.2.17 PCR von genomischer DNA

*Primer*-Sequenzen sind in Tabelle B 6 aufgeführt.

Es wurde die GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Mannheim) mit 1,2 mM MgCl<sub>2</sub> ohne DMSO verwendet. Das Produkt wurde über 30 Zyklen amplifiziert. Die *Annealing*-Temperatur betrug bei Verwendung des *Primer*-Paars a-b 58°C und bei Verwendung des a-c *Primer*-Paars 55°C.

**Tabelle B 6: PCR-Primer zur Analyse genomischer DNA**

Primer	Sequenz (5'→3')	Referenz
a	GGTTTGGATCTTAACCTTAGG	Mishina <i>et al.</i> , 2002
b	CAGGCTCATTATCATCAAGG	diese Arbeit
c	TGGCTACAATTTGTCTCATGC	Mishina <i>et al.</i> , 2002

### B 10.3 Quantifizierung von (RT-)PCR-Produkten mit der ImageJ-Software

Die ImageJ-Software wurde verwendet, um die Effizienz der Cre-vermittelten *bmpr1a*-Deletion in *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen auf DNA- und RNA-Ebene zu quantifizieren. Mit Hilfe dieser Software wurde die Intensität von Banden im Agarosegel graphisch dargestellt und ihr Anteil bestimmt. Die Bandenintensität des Kontrollansatzes wurde als 100% gesetzt. Hieraus resultierte die relative Bandenintensität der Cre-behandelten Probe. So konnte durch den Abgleich zwischen der relativen Bandenintensität des Referenzgens *gapdh* oder *aktin* und der von *bmpr1a* die Effizienz der Cre-vermittelten Rekombination bestimmt werden.

## B 11 Proteinbiochemische Methoden

### B 11.1 Expression rekombinanter Cre-Proteine in *E. coli* (TUNER DE3)

Von einer Glycerin-Kultur oder von einer Agarplatte wurden ca. 150 ml LB mit 1% Glukose, 50 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol mit dem Expressionsstamm angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 6 Liter auf 37°C vorgewärmtes TB-Medium mit 1% Glukose, 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol wurden auf drei sterile 5-Liter-Erlenmeyerkolben mit Schikane verteilt, 1:50 mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C mit 125 U/min geschüttelt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 1,5 wurde die Proteinexpression mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach ca. 2 Stunden Induktion wurden die Bakterien bei 4°C mit 4000 rpm (GS-3 Rotor, Kendro) für 10 Minuten abzentrifugiert, das Pellet im Trockeneis/Ethanol-Bad eingefroren (10 min) und bei -20°C gelagert.

**TB- (Terrific-Broth-) Medium**

12 g/l	Trypton
24 g/l	Hefeextrakt
2,31 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
12,54 g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,4% (v/v)	Glycerin

**B 11.2 Expression rekombinanter Flpe-Proteine in E. coli (BL21(DE3))**

Eine Übernachtskultur in LB-Medium mit 1% (w/v) Glucose und 25 µg/ml Carbenecillin wurde mit einem frischen Retransformationsansatz angeimpft. Am Folgetag wurde von der Übernachtskultur eine Expressionskultur im Verhältnis 1:25 angeimpft. Das TB-Medium der Expressionskultur wurde mit 1% Glucose und 100 µg/ml Ampicillin versetzt. Die Bakterien wurden bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 kultiviert, dann wurde die Inkubationstemperatur auf 28°C abgesenkt und die Kultur weiter bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,5 herangezogen. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Nach einer Stunde wurden die Zellen bei 4000 rpm (GS-3 Rotor, Kendro) für 10 Minuten pelletiert. Das Bakterienpellet wurde bei -20°C gelagert.

**B 11.3 Native Aufreinigung von rekombinantem Flpe und Cre**

Das tiefgefrorene Bakterienpellet wurde in 10 ml PTB pro Liter Expressionskultur resuspendiert und mit Lysozym (2 mg/ml final) versetzt. Die Lösung wurde bis zur Viskosität gerührt (ca. 30 Minuten). Zur Viskositätssenkung wurde Benzonase im Verhältnis 1:1000 (v/v) hinzugegeben und für 15 bis 30 Minuten gerührt.

Bei Flpe-Aufreinigungen wurde jetzt NaCl-Puffer im Volumenverhältnis 1:1 hinzugegeben.

Der Ansatz wurde auf Eis gekühlt und sonifiziert (1,5 Minuten mit einem Zyklus von 5 Sekunden bei 45% Leistung).

Bei Cre-Aufreinigungen wurde jetzt TSB im Verhältnis 1:1 hinzugegeben und für 5 Minuten auf Eis inkubiert.

Das Lysat wurde in einer Ultrazentrifuge (SS34 Rotor, Kendro) für 30 Minuten mit 16.000 rpm bei 4°C pelletiert. Das klare Lysat wurde mit 2 ml (für Cre) bzw. 1 ml (für Flpe) Ni-NTA Agarose pro Liter Expressionskultur versetzt und für eine Stunde bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Präparation bei 4°C durchgeführt.

Nach der Inkubation wurde die Suspension auf eine Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 5- (für Cre) bzw. 4-fachem (für Flpe) Säulenbettvolumen Waschpuffer gespült. Das Protein wurde schließlich mit 2- bis 3-fachem Säulenbettvolumen Elutionspuffer eluiert. Kam es aufgrund zu hoher Proteinkonzentration zur Trübung des Eluats, wurde bis zur Klärung weiterer Elutionspuffer hinzugegeben. Das Eluat wurde bis zur Dialyse auf Eis gelagert.

**Lysepuffer, 10x PTB (Phosphat-Tris-Puffer)**

500 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
50 mM	Tris-Base
	pH 7,8

**TSB (Tartrat-Puffer)**

2 M	KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>
1x	PTB
20 mM	Imidazol

**NaCl-Puffer**

1x	PTB
2 M	NaCl
20 mM	Imidazol

**Flpe-Waschpuffer**

1x	PTB
1 M	NaCl
10 mM	Imidazol

**Cre-Waschpuffer**

1x	PTB
500 mM	NaCl
10 mM	Imidazol

<b>Elutionspuffer</b>	1x	PTB
	750 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol

#### **B 11.4 Dialyse von aufgereinigtem Cre-Protein**

Die Dialyse wurde bei 4°C und gegen einen 100-fachen Überschuss an Dialysemedium durchgeführt. Das Eluat wurde nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 4000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) und 4°C über Nacht gegen einen Hochsalzpuffer dialysiert. Danach wurde das Dialysat des Hochsalzpuffers zunächst für einige Stunden, dann über Nacht, gegen Glycerinpuffer dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde ermittelt bevor der Glycerinstock bei -20°C gelagert wurde.

<b>Hochsalzpuffer</b>	1 M	NaCl
	20 mM	HEPES (pH 7,4)

<b>Glycerinpuffer</b>	750 mM	NaCl
	50% (v/v)	Glycerin
	20 mM	HEPES (pH 7,4)

#### **B 11.5 Dialyse und Aufkonzentration von aufgereinigtem Flpe-Protein**

Das Eluat wurde für 5 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Dann wurde es für eine Stunde und anschließend über Nacht bei 4°C gegen das 100-fache Volumen FCB dialysiert. Am Folgetag wurde das Dialysat in 15 ml-Konzentratoren überführt und durch Zentrifugation bei 3500 rpm und 4°C (Heraeus Megafuge 1.0R) eingengt. Alle 30 Minuten wurde das Volumen überprüft und auf-/abpipettiert. Das Volumen wurde so um 80% reduziert. Die Stocklösung wurde sterilfiltriert (0,22 µm), die enthaltene Proteinkonzentration bestimmt, in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

**FCB** (*Flp Concentration Buffer*)

2 M	NaCl
50 mM	HEPES (pH 7,4)
1 mM	DTT
1 mM	EDTA
5% (v/v)	Glycerin

**B 11.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Proteinkonzentration wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 595 nm bestimmt. Hierzu wurde das zu untersuchende Protein in Bradford-Reagenz verdünnt. Mit Hilfe einer Eichkurve von einer BSA-Verdünnungsreihe konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

**B 11.7 SDS-PAGE**

Zur Herstellung und elektrophoretischen Auftrennung von SDS-Gelen wurde das Komplett-Gelsystem Mini-PROTEAN 3 (Biorad, München) verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen für 5 Minuten in SDS-Probenpuffer bei 95°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte für 45 Minuten bei 200 V.

**5x SDS-Probenpuffer**

125 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
3 mM	EDTA
20% (v/v)	Glycerin
9% (w/v)	SDS
0,05% (w/v)	Bromphenolblau

**Sammelgel**

70 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
0,06% (w/v)	SDS
5% (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (29,2/0,8)
0,11% (w/v)	Ammoniumpersulfat
0,11% (v/v)	TEMED

<b>Trenngel</b>	400 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	0,1% (w/v)	SDS
	12% (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (29,2/0,8)
	0,05% (w/v)	Ammoniumpersulfat
	0,05% (v/v)	TEMED
<b>SDS-Laufpuffer</b>	0,3% (w/v)	Tris-Base
	1,44% (w/v)	Glycin
	0,1% (w/v)	SDS
<b>Gel-Trocknungspuffer</b>	20% (v/v)	Methanol
	2% (v/v)	Glycerin

### **B 11.8 Coomassie-Färbung**

Das SDS-Gel wurde nach Angaben des Herstellers mit dem *GelCode Blue* Färbereagens (Perbio, Bonn) inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe des DryEase® Mini-Gel Trocknungssystems (Invitrogen, Karlsruhe) getrocknet.

### **B 11.9 Western-Analyse**

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des *Tank*-Transfersystems (Mini Trans-Blot von Biorad, München) oder des *Semi-Dry*-Transfersystems (Fastblot B33 / B34 von Biometra, Göttingen) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Transferzeit betrug für *Tank*-Blots ca. 16 Stunden bei 40 V bzw 1 Stunde bei 100 V und für *Semi-Dry*-Blots 20 Minuten bei 1,5 mA pro Gel-cm<sup>2</sup>.

#### ***Tank*-System Transferpuffer**

0,3% (w/v)	Tris-Base
1,44% (w/v)	Glycin
20% (v/v)	Methanol

**Semi-Dry-System Transferpuffer**

	15% (v/v)	Methanol in SDS-Laufpuffer
<b>TBS</b>	10 mM	Tris-HCl, pH 7.5
	150 mM	NaCl
<b>TBS-Tween/Triton</b>	20 mM	Tris-HCl, pH 7.5
	500 mM	NaCl
	0,05% (v/v)	Tween 20
	0,2% (v/v)	Triton X-100
<b>PBS</b>	2,7 mM	KCl
	137 mM	NaCl
	4,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O
	1,4 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>PBS-Tween</b>	0,1% (v/v)	Tween 20 in PBS
<b>Blockierungslösung I</b>	5% (w/v)	Milchpulver
	0,1% (v/v)	Tween 20 in PBS
<b>Blockierungslösung II</b>	5% (w/v)	BSA
	0,05% (v/v)	Tween 20 in TBS
<b>Regenerationspuffer</b>	62,5 mM	Tris-HCl, pH 6,7
	2% (w/v)	SDS
	100 mM	β-Mercaptoethanol

**Tabelle B 7: Primäre Antikörper für Western-Analysen**

Antigen	Verdünnung	Art	Quelle
Penta His	1:2000 in Blockierungslösung (Qiagen)	Direkt HRP-gekoppelt	Qiagen, Hilden
HTNF-Antiserum 2228 u 2229	1:2000 in Blockierungslösung I	Kaninchen	M. Peitz & F. Edenhofer, rekonstruktive Neurobiologie, Bonn
Phospho-Smad1 (Ser463/465)/ Smad5 (Ser463/465)/ Smad8 (Ser426/428)	1:1000 in Blockierungslösung II	Kaninchen	NEB (Frankfurt am Main)
Phospho-Stat3 (Tyr705)	1:1000 in Blockierungslösung II	Kaninchen	NEB (Frankfurt am Main)
Phospho-Erk	1:2000 in Blockierungslösung II	Maus	Millipore (Schwalbach)
Aktin	1:2000 in Blockierungslösung II	Maus	Chemicon (Hofheim)

**Tabelle B 8: Sekundäre Antikörper für Western-Analysen**

Antigen	Verdünnung	Art	Quelle
HRP	1:2000 in Blockierungslösung I	Kaninchen oder Maus	NEB (Frankfurt am Main)

### Immundetektion mit dem Penta·His HRP Konjugat Kit

Hierfür wurde das *Semi-Dry*-Transfersystem verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Chemilumineszenzdetektion erfolgte wie unten beschrieben.

### Immundetektion mit anti-HTNF-Antisera Nr. 2228 und 2229

Nach dem *Semi-Dry*-Transfer wurde die Membran mit Blockierungslösung I blockiert, mit primärem- (siehe Tabelle B 7) und abschließend sekundärem Antikörper (siehe Tabelle B 8) inkubiert. Alle Schritte erfolgten für eine Stunde. Nach Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper wurde jeweils dreimal für 5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Die Chemilumineszenzdetektion erfolgte wie unten beschrieben.

### Immundetektion von zellulären Proteinen

Die Zellen wurden durch Aufnahme in 1x SDS-Probenpuffer lysiert und solange bei 99°C erhitzt, bis die Viskosität aufgehoben war. Nach dem *Tank*-Transfer wurde die Membran mit dem entsprechenden primären Antikörper (siehe Tabelle B 7) über

Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurde dreimal für 5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Die Behandlung mit dem sekundären Antikörper (siehe Tabelle B 8) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Erneut wurde dreimal für 5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Die Chemilumineszenz wurde wie unten beschrieben detektiert.

### **Chemilumineszenz-Detektion**

Zur Chemilumineszenz-Detektion wurde die Membran mit dem *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Perbio, Bonn) nach Angaben des Herstellers inkubiert und mittels des ChemiDoc 2000 Systems (Biorad, München) exponiert. Falls die Stärke des Signals nicht ausreichte, wurde die Membran kurz in TBS gewaschen und nach Inkubation mit dem *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Perbio, Bonn) erneut exponiert.

### **Regeneration von Membranen**

Nach der Exposition wurde die Membran dreimal mit PBS oder TBS gewaschen, für 30 Minuten bei 50°C mit Regenerationspuffer inkubiert und wieder dreimal gewaschen. Nach der Inkubation in Blockierungslösung (siehe oben) konnte die Membran für eine weitere Entwicklung verwendet werden.

## **B 12 Zellbiologische Methoden**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **B 12.1 Beschichtung von Zellkulturschalen**

Die Inkubation mit 0,1% Gelatine erfolgte für 20 Minuten.

1x PO wurde für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Schalen zweimal mit PBS gewaschen.

## **B 12.2 Kultivierung muriner EF**

*Die Cokultur mit Fibroblasten ist eine Voraussetzung zur Erhaltung der Pluripotenz der verwendeten ES-Zelllinien. Fibroblasten wurden aus Tag 13,5 bis 14,5 post coitum Embryonen präpariert, expandiert und mitotisch inaktiviert.*

### **B 12.2.1 Auftauen von EF**

Röhrchen mit kryokonservierten Zellen wurden zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in 5 ml 10% FCS/D-MEM aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 1200 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) für 3 Minuten abzentrifugiert, in EF-Medium resuspendiert und auf 15 cm-Schalen ausplattiert.

<b>EF-Medium</b>	10% (v/v)	FCS
	2 mM	L-Glutamin
	1 mM	Natriumpyruvat
	1x	nicht-essentielle Aminosäuren
	100 U/ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung in D-MEM mit 4500 mg/l Glucose

### **B 12.2.2 Passagieren von EF**

*Murine EF wurden maximal bis Passage 4 propagiert.*

Konfluente Schalen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 5 Minuten mit 1x Trypsin bei 37°C inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 10% FCS/D-MEM abgestoppt. Die Zellen wurden vereinzelt, für 3 Minuten bei 1200 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert, in EF-Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 oder 1:4 neu ausgesät.

<b>1x Trypsin</b>	0,05% (v/v) Trypsin/EDTA
	1% (v/v) Hühnerserum in PBS

### **B 12.2.3 Mitotische Inaktivierung von EF**

*Die Cokultur embryonaler Stammzellen mit Fibroblasten setzt voraus, dass die Fibroblasten mit ihrer schnelleren Wachstumsrate die ES-Zellkultur nicht überwuchern. Aus diesem Grund werden Feeder-Zellen mitotisch inaktiviert.*

#### **Mitotische Inaktivierung durch $\gamma$ -Bestrahlung**

Konfluent bewachsene 15 cm-Schalen wurden zur  $\gamma$ -Bestrahlung verwendet. Hierzu wurden die Zellen wie beschrieben abtrypsiniert. Zellpellets von 25 15 cm-Zellkulturschalen wurden in 35 ml EF-Medium resuspendiert und in eine T125-Zellkulturflasche überführt.

Die  $\gamma$ -Bestrahlung fand in der Funktionseinheit Strahlentherapie der Radiologischen Universitätsklinik Bonn statt. Sie erfolgte an einem medizinischen Linearbeschleuniger (MEVATRON MD2, Siemens, München) mit 6 MV Photonen im Dosismaximum (17 mm) oder alternativ in einem gewebeäquivalenten Festkörperphantom (RW3, PTW Freiburg) bei einem Fokus-Haut-Abstand von 100 cm. Die Fibroblasten wurden mit 15 Gy Einzeldosis bestrahlt.

Anschließend wurden die Zellen eingefroren.

#### **Mitotische Inaktivierung durch MMC-Behandlung**

Die konfluenten Schalen wurden für 3 Stunden bei 37°C mit 10  $\mu\text{g/ml}$  MMC inkubiert. Anschließend wurden sie trypsiniert und eingefroren.

#### **B 12.2.4 Einfrieren von EF**

Im Anschluss an die mitotische Inaktivierung wurden die Fibroblasten mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt und für 3 Minuten bei 1200 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert. Das Pellet wurde in Einfriermedium resuspendiert. Es wurden  $2,5 \times 10^6$  Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden in Styroporboxen über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

#### **EF- und ES-Einfriermedium**

10%	DMSO
30%	FCS
	in D-MEM mit 4500mg/l Glucose

#### **B 12.2.5 Auftauen von mitotisch inaktivierten EF**

Mitotisch inaktivierte EF wurden auf gelatinisierten Schalen ausgesät. Für eine 10cm-Schale wurden  $2,5 \times 10^6$  Zellen benötigt.

#### **B 12.3 Kultivierung muriner ES-Zellen**

##### **B 12.3.1 Auftauen von ES-Zellen**

Routinemäßig wurden ES-Zellen auf mitotisch inaktivierten EF ausplattiert. Diese wurden 24 h vorher ausgesät. Die restlichen Schritte erfolgten wie in B 12.2.1 beschrieben. Die Zellen wurden in ES-Medium ausgesät.

<b>ES-Medium</b>	15% (v/v)	FCS
	2 mM	L-Glutamin
	1 mM	Natriumpyruvat
	1x	nicht-essentielle Aminosäuren
	100 U/ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung
	10 <sup>6</sup> U/l	Lif
	0,1 mM	β-Mercaptoethanol
		in D-MEM mit 4500mg/l Glucose

### **B 12.3.2 Passagieren von ES-Zellen**

Das Kulturmedium der murinen ES-Zellen wurde täglich erneuert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen wie in B 12.2.2 beschrieben trypsiniert, mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt, bei 1200 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) für 3 Minuten zentrifugiert und in ES-Medium auf Schalen mit mitotisch inaktivierten EF ausgesät. Routinemäßig wurden  $1,3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät.

### **B 12.3.3 Einfrieren von ES-Zellen**

Das Einfrieren erfolgte wie in B 12.2.4 beschrieben mit  $1,2 \times 10^6$  Zellen pro Kryoröhrchen.

### **B 12.3.4 Überführen in N2B27-ES-Medium**

*Wie von Ying et al. in 2003 publiziert, ermöglicht dieses Medium die Pluripotenzerhaltung von murinen ES-Zellen ohne Cokultivierung mit EF.*

ES-Zellen wurden wie in B 12.3.2 beschrieben passagiert und in N2B27-ES-Medium auf gelatinisierten Schalen neu ausgesät.

<b>N2B27-ES-Medium</b>	12,5 µg/ml	Insulin
	50 µg/ml	Transferrin
	3 ng/ml	Progesteron
	8 µg/ml	Putrescin
	15 nM	Natrium-Selenit
	25 µg/ml	BSA
	1 mM	L-Glutamin
	0,5x	B27
	100 U/ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung
	10 <sup>6</sup> U/l	Lif
	0,1 mM	β-Mercaptoethanol
	10 ng/µl	Bmp4
		in D-MEM/F-12 / Neurobasal Medium (1:1)

#### **B 12.3.5 Passagieren in N2B27-ES-Medium**

Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS für 20 bis 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei Bedarf wurden noch anhaftende Zellen mit einem Schaber abgekratzt. Anschließend wurden sie in PBS vereinzelt, mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt, bei 1200 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) für 3 Minuten zentrifugiert und in N2B27-ES-Medium auf gelatinisierten Schalen neu ausplattiert. Routinemäßig wurden  $1,3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät.

#### **B 12.4 Neurale *in vitro* Differenzierung muriner ES-Zellen**

Es wurden die von Brüstle *et al.* (1997) und Glaser *et al.* (2007) publizierten Protokolle verwendet.

**B 12.4.1 Zeitlicher Verlauf**

Brüstle <i>et al.</i> (siehe B 12.4.2)		Tag	Glaser <i>et al.</i> (siehe B 12.4.3)	
<b>1</b>	Passage auf Gelatine	1	<b>1/2</b>	Passage auf Gelatine
		2		
		3	<b>2</b>	Monolayer-Differenzierung
<b>2</b>	EBs herstellen	4		
<b>3</b>	EBs waschen	5		
		6		
<b>3</b>	EBs waschen	7		
<b>4</b>	EBs plattieren	8		
<b>5</b>	ITSFn	9		
		10		
		11	<b>3</b>	Sphären herstellen
		12		
<b>6</b>	N3FL	13	<b>4</b>	Sphären waschen
		14		
		15	<b>5</b>	Sphären plattieren
		16		
<b>7</b>	N3EFL	17		
		18		
		19	<b>6</b>	Auswüchse-Passage
		↓		
<b>8</b>	N3EFL-Passage	↓	<b>7</b>	NS-Passage
		↓		
		↓		
<b>9</b>	N3EFL-Langzeitlagerung	↓	<b>8</b>	NS-Langzeitlagerung
<b>10</b>	N3EFL-Entzug	↓	<b>9</b>	NS-Entzug

**B 12.4.2 Differenzierung nach Brüstle *et al.***

**1 Passage auf Gelatine**

*Dieser Schritt entfernt die bei der Differenzierung störenden EF.*

Die ES-Zellkulturen wurden wie in B 12.2.2 beschrieben trypsiniert. Pro gelatinisierter 6cm-Schale wurden  $2,4 \times 10^6$  ES-Zellen in ES-Medium ausgesät.

## 2 Herstellen von EBs (*embryoid bodys*)

*EBs sind durch Aggregation von ES Zellen entstandene Sphäroide, in denen die Zellen spontan und ungerichtet in Derivate aller drei Keimblätter differenzieren. Zur Herstellung von EBs dürfen die ES-Zellkolonien nicht vereinzelt werden.*

Pro ES-Zellkulturschale wurden jeweils 3 ml ES-Diff-Medium in acht unbeschichtete 6 cm-Bakterienschalen (Nunc, Wiesbaden) vorgelegt. Die ES-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 1,5 ml 1x Trypsin überschichtet. Nach erfolgtem Ablösen der Kolonien wurden 6,5 ml ES-Diff-Medium in eine 10 ml-Pipette aufgezogen, die Zellen in einem Fluss abgespült, das Medium vorsichtig wieder aufgenommen und je 1 ml auf die acht Schalen verteilt.

### ES- Diff- (Differenzierungs-) Medium

10% (v/v)	FCS
2 mM	L-Glutamin
1 mM	Natriumpyruvat
1x	nicht-essentielle Aminosäuren
100 U/ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung
0,1 mM	β-Mercaptoethanol
	in D-MEM mit 4500mg/l Glucose

## 3 Waschen von EBs

EBs von 8 Schalen wurden in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und zur Sedimentation gebracht. Das Medium wurde bis auf 5 ml abgesaugt. Nachdem 27 ml ES-Diff-Medium hinzugefügt worden waren, wurde der gesamte Inhalt des Falcon-Röhrchens aufgezogen und auf die EB-Schalen mit jeweils 4 ml verteilt.

## 4 Plattieren von EBs

Nachdem die EBs in ein 50ml-Falcon-Röhrchen überführt worden waren und sich abgesetzt hatten, wurde der Mediumüberstand bis auf 20 ml abgesaugt. Das

verbleibende Medium mit den EBs wurde gleichmäßig auf zwei unbeschichtete 10 cm-Zellkulturschalen verteilt.

## 5 Transfer in ITSFn

*Dieses serumfreie Medium ermöglicht die Selektion neuraler Vorläuferzellen.*

Die plattierten EBs wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in ITS-Medium mit 2,5 µg/ml Fn überführt. Aufgrund des starken Zelltodes erfolgte ein Mediumwechsel alle zwei Tage.

### **ITS- (Insulin, Transferrin, Sodiumselenit-) Medium**

10 µg/ml	Insulin
100 µg/ml	Transferrin
30 nM	Natrium-Selenit
100 U/ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung in D-MEM/F-12

## 6 Transfer in N3FL

*In diesem Stadium wird die neurale Zellpopulation zur Proliferation angeregt.*

Die ITSFn-Kulturen wurden zweimal mit PBS gewaschen, die Zellen mit 1x Trypsin enzymatisch von der Schale abgelöst und das Trypsin mit 10% FCS/D-MEM neutralisiert. Die Zellen wurden bei 1000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde vorsichtig unter Verwendung von drei geflämten Pasteurpipetten, deren Öffnungen graduell verkleinert wurden, zu einer Einzelzellsuspension trituriert. Unter dem Mikroskop wurde der Prozess des Vereinzeln kontrolliert. Die Zellsuspension wurde dann durch ein 40 µm-Zellsieb von den verbliebenen Zellklumpen befreit. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden anschließend bei 1000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) für 5 Minuten zentrifugiert und in N2-Medium resuspendiert. Es wurden 3-4 x 10<sup>6</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> auf PO-beschichteten Schalen

plattiert. Zu dem Medium wurden 10 ng/ml Fgf2 und 1ng/ml Ln hinzugegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Jeden Tag wurden 10 ng/ml Fgf2 hinzugefügt und alle zwei Tage das Medium gewechselt.

<b>N2-Medium</b>	25 µg/ml	Insulin
	100 µg/ml	Transferrin
	6 ng/ml	Progesteron
	16 µg/ml	Putrescin
	30 nM	Natrium-Selenit
	0,5 mM	L-Glutamin
	8,5 mM	Glucose
	100 U/ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung in D-MEM/F-12

## 7 Transfer in N3EFL

*In diesem Stadium werden aus den multipotenten Vorläuferzellen gliale Vorläufer angereichert.*

N3FL-Kulturen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit PBS überschichtet und unter Verwendung eines Zellschabers mechanisch von der Platte gelöst. Anschließend wurden sie mit einer geflämten Pasteurpipette vereinzelt. Die Zellsuspension wurde durch ein 40 µm-Zellsieb gegeben. Die Schale und das Sieb wurden mit PBS gespült und die Zellen bei 1000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in N2-Medium unter Zugabe von 10 ng/ml Fgf2, 20 ng/ml Egf und 1 ng/ml Ln resuspendiert und die Zellsuspension auf einer PO-beschichteten Schale replattiert. Fgf2 und Egf wurden alle 24 Stunden erneut hinzugefügt und das Medium alle zwei Tage gewechselt.

## 8 Passagieren von N3EFL-Zellen

Das Passagieren von konfluenten Schalen erfolgte wie der Transfer (siehe oben). Ein Zellsieb wurde nicht mehr benötigt. Die Zellen wurden nach Bedarf im Verhältnis 1:2 bis 1:4 auf PO-beschichteten Schalen neu ausgesät.

## 9 Langzeitlagerung von N3EFL-Zellen

Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit PBS überschichtet und mit Hilfe eines Zellschabers von der Schale gelöst. Die Zellsuspension wurde mit einer geflämten Pasteurpipette vereinzelt, gezählt, für 5 Minuten bei 1000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert und in N3EFL-Einfriermedium resuspendiert. Pro Kryoröhrchen wurden  $4 \times 10^6$  Zellen über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  inkubiert und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

**N3EFL-Einfriermedium** 1x Gefriermedium ohne DMSO, Serum-frei

Das Auftauen erfolgte schnell bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad. Die Zellen wurden in 5 ml D-MEM/F-12 bei 1000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) für 5 Minuten zentrifugiert und auf PO-beschichteten Schalen in N2-Medium mit 10 ng/ml Fgf2, 20 ng/ml Egf und 1 ng/ml Ln ausgesät.

## 10 Differenzierung von N3EFL-Zellen

*N3EFL-Zellen differenzieren mit hoher Effizienz zu Astrozyten und Oligodendrozyten.*

Die Differenzierung wurde gestartet, wenn die Schalen ca. 90% konfluent waren. Hierzu wurden die Wachstumsfaktoren entzogen, das Medium täglich mit 30 ng/ $\mu\text{l}$  T3 und 200  $\mu\text{M}$  AA supplementiert und jeden zweiten Tag gewechselt. Am ersten Tag der Differenzierung wurde das Medium nicht gewechselt. Der Entzug erfolgte für 4 Tage.

### **B 12.4.3 Differenzierung nach Glaser *et al.***

#### **1 Passage auf Gelatine**

Dieser Schritt entspricht B12.4.2 (1).

#### **2 Monolayer-Differenzierung**

*Die gerichtete neurale Differenzierung der ES-Zellen wird eingeleitet.*

Die Schalen wurden wie in B 12.2.2 beschrieben trypsiniert, gezählt und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in N2B27-Diff-Medium auf gelatinisierten Schalen mit Dichten von 1,5-, 3- und 4,5 x 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Das Medium wurde täglich gewechselt.

#### **N2B27-Diff- (Differenzierungs-)Medium**

12,5 µg/ml	Insulin
50 µg/ml	Transferrin
3 ng/ml	Progesteron
8 µg/ml	Putrescin
15 nM	Natrium-Selenit
25 µg/ml	BSA
1 mM	L-Glutamin
0,5x	B27
100 U/ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung
	in D-MEM/F-12 / Neurobasal Medium (1:1)

#### **3 Herstellen von Sphären**

Zur Sphären-Herstellung wurden die Schalen zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert und für 5 Minuten bei 1000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert. Auf unbeschichteten Schalen wurden 4 x 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> in NS-Medium mit 10 ng/ml Fgf2 und Egf ausgesät. Die Wachstumsfaktoren wurden jeden Tag zugegeben.

<b>NS-Medium</b>	25 µg/ml	Insulin
	100 µg/ml	Transferrin
	6 ng/ml	Progesteron
	16 µg/ml	Putrescin
	30 nM	Natrium-Selenit
	2 mM	L-Glutamin
	100 U/ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung in NS-A Medium

#### **4 Waschen von Sphären**

Das Medium mit den Sphären wurde abgenommen, in ein 15ml-Falcon-Röhrchen überführt und kurz bis zu 1000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Die Sphären wurden in unbeschichteten Schalen mit NS-Medium inklusive 10 ng/ml Fgf2 und Egf ausgesät.

#### **5 Plattieren von Sphären**

Wie beim Waschen wurde das Medium mit den Sphären abgenommen und kurz zentrifugiert. Die Sphären wurden auf gelatinisierten Schalen in NS-Medium mit 10 ng/ml Fgf2 und Egf ausplattiert.

#### **6 Passagieren der NS-Auswüchse**

Nachdem die Schalen zweimal mit PBS gewaschen worden waren, wurden sie mit PBS überschichtet. Die Zellen wurden mit einem Schaber abgelöst, bei 1000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) für 5 Minuten zentrifugiert und auf gelatinisierten Schalen in NS-Medium mit 10 ng/ml Fgf2 und Egf ausplattiert.

## 7 Passagieren von NS-Zellen

Das Passagieren der NS-Zellen erfolgte wie unter 6 (Passagieren der NS-Auswüchse) beschrieben.

## 8 Langzeitlagerung von NS-Zellen

Wie beim Passagieren (siehe oben) wurden die Zellen gewaschen, abgeschabt und zentrifugiert. Das Pellet einer konfluenten 10cm-Schale wurde in NS-Einfriermedium resuspendiert, auf 3 Kryoröhrchen verteilt und über Nacht bei -80°C inkubiert. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

<b>NS-Einfriermedium</b>	10%	DMSO
		in NS-A Medium

## 9 Differenzierung von NS-Zellen

*NS-Zellen haben das Potential, zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren.*

Die Differenzierung von NS-Zellen wurde bei 90% Konfluenz gestartet. Wie bei der Differenzierung von N3EFL-Zellen wurden die Wachstumsfaktoren Egf und Fgf2 entzogen, das Medium täglich mit 30 ng/µl T3 und 200 µM AA supplementiert und jeden zweiten Tag gewechselt. Am ersten Tag der Differenzierung fand kein Mediumwechsel statt. Die Zellen wurden dann in N2-Medium überführt. Die Zellen wurden für 4 Tage entzogen.

### B 12.5 Transiente Transfektion von murinen Fibroblasten

24 Stunden vor der Transfektion wurden  $3 \times 10^4$  Zellen/24-Wellvertiefung in EF-Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 450 µl EF-Medium überschichtet. Für jeden Ansatz wurde zu 50 µl 150 mM NaCl-Lösung 300 ng der zu transfizierenden DNA hinzupipettiert. Der Ansatz wurde auf einem Vortexer

durchmischt, kurz zentrifugiert, mit 4,8 µl Exgen 500 versetzt, erneut auf einem Vortexer durchmischt, kurz zentrifugiert und nach einer 10minütigen Inkubation für 16 Stunden zu den Zellen gegeben.

### **B 12.6 Stabile Transfektion von ES-Zellen**

Zur stabilen Transfektion wurden 20 µg linearisierte DNA in 50 µl PBS steril resuspendiert.  $1,2 \times 10^7$  Zellen wurden in 850 µl PBS resuspendiert und mit der DNA/PBS-Lösung in einer 4 mm Elektroporationsküvette (Peqlab, Erlangen) vermischt. Das Gemisch wurde 5 Minuten inkubiert und erneut durchmischt ohne dabei Blasen zu bilden. Anschließend wurde die Küvette in die Elektroporationskammer (Gene-Pulser II, Biorad, München) eingesetzt und wenige Sekunden einem elektromagnetischen Feld von 230 V und 500 µF ausgesetzt. Die Suspension wurde im Anschluss erneut für 5 Minuten inkubiert und dann auf drei 10 cm-Schalen mit MMC-behandelten CD1-neo-EF ausgesät. Zur Kontrolle wurde eine Schale mit gleicher Anzahl an nicht elektroporierten ES-Zellen ausgesät. Die Selektion mit 300 µg/ml G418 wurde 48 Stunden nach der Elektroporation gestartet. Nach abgeschlossener Selektion konnten resistente ES-Zellklone isoliert werden (siehe unten).

### **B 12.7 Isolierung von ES-Zell Klonen**

Zuerst wurde in einer 96-Wellplatte eiskaltes 1x Trypsin (25 µl/well) vorgelegt. Die Schale mit den zu isolierenden ES-Zell Klonen wurde mit PBS gewaschen und dann mit PBS überschichtet. An einer horizontalen Sterilbank wurden unter dem Binokular individuelle Kolonien mit einer 10 µl-Pipette vom Schalenboden gelöst, aufgezogen und in die vorbereitete 96-Wellplatte transferiert. Die ES-Zell Klone wurden durch mehrfaches, behutsames Pipettieren vereinzelt und in einer Multiwellvertiefung mit CD1-neo-EF in Selektionsmedium neu ausgesät.

## **B 12.8 Proteintransduktion**

### **B 12.8.1 Cre-Transduktion von ES-Zellen**

Die ES-Zellen wurden 6 Stunden vor der Transduktion in ES-Medium ausgesät. Für die Transduktion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2  $\mu$ M rekombinantem Cre, gelöst in Transduktionsmedium inkubiert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in ES-Medium überführt.

#### **Cre-Transduktionsmedium für ES-Zellen**

50%	PBS
50%	GlutaMAX™ D-MEM mit 4500mg/l Glucose

### **B 12.8.2 Cre-Transduktion von N3EFL-Zellen**

N3EFL-Zellen wurden bei 80 bis 90% Konfluenz mit 2  $\mu$ M Cre in N2-Medium inklusive 10ng/ml Fgf2 und 20 ng/ml Egf für 22 Stunden transduziert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und weiter in N2-Medium mit Fgf2 und Egf kultiviert.

### **B 12.8.3 Cre-Transduktion von NS-Zellen**

NS-Zellen wurden bei Konfluenz mit 8  $\mu$ M Cre in NS-Transduktionsmedium inklusive 10 ng/ml Fgf2 und Egf für 9 Stunden transduziert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und weiter in NS-Medium mit Fgf2 und Egf kultiviert.

#### **Cre-Transduktionsmedium für NS Zellen**

200 $\mu$ M	Chloroquin in NS-A Medium
-------------	------------------------------

#### **B 12.8.4 Flpe-Transduktion von murinen Fibroblasten**

NIH 3T3 Zellen wurden mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 24-Wellplatte ausgesät. Hiermit wurde gewährleistet, dass die Zellen am nächsten Tag zu ca. 90% konfluent waren. Für die Transduktion von NIH 3T3 Zellen war das HTNFlpe-Eluat gegen PBS/DMEM im Verhältnis 1:1 dialysiert worden. Die gewünschte Proteinkonzentration wurde durch Verdünnung mit PBS/DMEM im Verhältnis 1:1 erzielt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für einen variablen Zeitraum mit HTNFlpe inkubiert. Zum Beenden der Transduktion wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und in EF-Medium überführt.

#### **B 12.8.5 Flpe-Transduktion von ES-Zellen**

Die ES-Zellen wurden 6 Stunden vor der Transduktion in ES-Medium ausgesät. Für die Transduktion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit  $4 \mu\text{M}$  rekombinantem Flpe, gelöst in Transduktionsmedium inkubiert. Nach gegebener Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in ES-Medium überführt.

#### **Flpe-Transduktionsmedium für ES Zellen**

5 $\mu\text{M}$	TAT-HA
8% (v/v)	Serumersatz
	in Cre-Transduktionsmedium für ES-Zellen

#### **B 12.9 Ganciclovir-Selektion von ES-Zellen**

*Die Negativselektion mit Ganciclovir wurde verwendet, um ES-Zellen anzureichern, in denen die Flpe-vermittelte Rekombination stattgefunden hat. In diesen Zellen war eine FRT-Stellen flankierte tk-Stopsequenz nicht mehr vorhanden.*

*Nur in Zellen, die die virale Tk exprimieren, wird der erste Phosphorylierungsschritt des Antimetaboliten Ganciclovir vollzogen. Das fertige Nukleotidanalogs Ganciclovir-Triphosphat wird während der DNA-Synthese eingebaut, führt zu Strangabbrüchen und*

*damit zum Zelltod, da es nicht die 3'-Hydroxygruppe der Desoxyribose enthält, die für die Anknüpfung weiterer Nukleotide notwendig ist (Mutschler, 1997).*

Um zu gewährleisten, dass keine Tk-Restaktivität in den rekombinierten ES-Zellen vorhanden war, wurden die ES-Zellen 3 Tage nach der Transduktion passagiert. Die Ganciclovir-Selektion wurde nach 2 weiteren Tagen gestartet. Nachdem die ES-Zellen für mindestens 6 Tage mit 1 µM Ganciclovir behandelt worden waren, wurden die resistenten Kolonien erneut passagiert.

### **B 13 Karyotypisierung von ES-Zellen**

Für die Karyotypisierung wurden ES-Zellen zunächst für 1 Stunde mit 4 µM HTNF1pe transduziert und über 10 Passagen propagiert, um mögliche Karyotypveränderungen zu akkumulieren. Die Zellen wurden dann in einer 6-Wellplatte mit 0,1-, 0,25- (2 Wells), 0,5- (2 Wells) und 1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Well auf Gelatine ohne EF ausgesät. Nach 48 Stunden wurden die Zellen für 1 Stunde mit 1 µM Colcemid inkubiert nachdem sie 2 bis 3 Stunden zuvor mit neuem Medium überschichtet worden waren. Dann wurden die Zellen trypsiniert und für 10 Minuten bei 1000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 0,5 ml abgesaugt, und die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden zunächst in 1 ml hypotonischer KCl-Lösung aufgenommen und für 5 Minuten inkubiert. Danach wurde nochmals 1 ml KCl-Lösung für 5 Minuten hinzugegeben und anschließend bis auf 6 ml Endvolumen aufgefüllt. Der Überstand wurde wieder bis auf 0,5 ml abgesaugt und die Zellen vorsichtig resuspendiert. Nach Zugabe von 2 bis 3 ml Fixativ und sanftem Schwenken wurde bis auf 15 ml mit Fixativ aufgefüllt, 30 Minuten bei -20°C inkubiert und für 10 Minuten bei 1000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert. Nach erneutem Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in 5 ml Fixativ aufgenommen. Dann wurden sie auf bei -80°C vorgekühlte Objektträger aufgetropft, über Wasserdampf (80°C) für ca. 20 Sekunden gespreitet und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proben wurden über Nacht bei 65°C gealtert, am nächsten Tag für 10 Minuten in Giemsa-Lösung (1:20 verdünnt) gefärbt, mit Leitungswasser abgespült und über Nacht getrocknet. Die Objektträger wurden schließlich kurz in ein Xylol-Bad getaucht, mit einem Tropfen Corbit-Balsam beschichtet und eingedeckelt.

<b>KCl-Lösung</b>	75 mM	KCl
<b>Fixativ</b>	75% (v/v)	Methanol
	25% (v/v)	Essigsäure

## **B 14 Immunzytochemie**

### **B 14.1 Fixierung der Zellen**

Die Zellen wurden vor und nach dem Fixieren zweimal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit Fixierungslösung inkubiert.

<b>Fixierungslösung</b>	4% (w/v)	PFA
	0,04% (v/v)	Glutaraldehyd in PBS

### **B 14.2 $\beta$ -Galactosidase-Färbung**

Nach Fixierung wurden die Zellen über Nacht mit X-Gal-Färbelösung bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen.

#### **X-Gal- (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactosid) Färbelösung**

5 mM	$K_3(Fe^{III}(CN)_6)$
5 mM	$K_3(Fe^{II}(CN)_6)$
2 mM	$MgCl_2$
1 mg/ml	X-Gal
	in PBS

### **B 14.3 Nachweis endogener alkalische Phosphatase-Aktivität**

Zunächst wurden die Zellkulturen fixiert. Alkalische Phosphatase-Aktivität wurde

mittels des *Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit* (Vector, Burlingame, CA, USA) bestimmt, welches den Angaben des Herstellers entsprechend eingesetzt wurde.

#### **B 14.4 Nachweis von Oberflächen- und intrazellulären Proteinen**

Nach Fixierung wurden die Zellen für 30 Minuten mit Blockierungslösung behandelt und über Nacht mit dem ersten Antikörper (siehe Tabelle B 9), verdünnt in Blockierungslösung bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 2 Stunden mit dem entsprechenden zweiten Antikörper (siehe Tabelle B 10) in Blockierungslösung inkubiert. Es wurde einmal mit PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden dann für 5 Minuten mit DAPI (1:1000 in HEPES-Puffer) gegengefärbt. Nach drei weiteren PBS-Wasch-Schritten wurden die Präparate mit Mowiol eingedeckelt.

Für Färbungen von Oberflächenproteinen wurde Blockierungslösung I und für Färbungen von intrazellulären Proteinen Blockierungslösung II benutzt. Bei Doppelfärbungen von Oberflächen- und intrazellulären Proteinen wurde stets zuerst das Oberflächenprotein angefärbt. Danach wurde für 5 Minuten fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte erneute Blockierung und Nachweis des intrazellulären Proteins.

Die mikroskopische Auswertung und Dokumentation erfolgte an einem Zeiss Axioskop 2.

<b>Blockierungslösung I</b>	5% (v/v)	FCS in PBS
<b>Blockierungslösung II</b>	5% (v/v) 0,1% (v/v)	FCS Triton-X100 in PBS
<b>Boratpuffer</b>	0,1 M	Borax

<b>HEPES-Puffer</b>	10 mM	HEPES
<b>Eindeckelmedium</b>	10% (w/v)	Mowiol
	20% (v/v)	Glycerin
	0,1 M	Tris-HCl (pH 8,5)

**Tabelle B 9: Primäre Antikörper für immunzytochemische Analysen**

Antigen	Verdünnung	Art	Quelle
β-Catenin	1:200 in Blockierungslösung II	Maus, IgG	Hybridoma Bank (Iowa, USA)
Oct4	1:400 in Blockierungslösung II	Maus, IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
Tuj1	1:1000 in Blockierungslösung II	Kaninchen, IgG	Covance (München)
O4	1:100 in Blockierungslösung I	Maus, IgM	Chemicon (Hofheim)
Gfap	1:300 in Blockierungslösung II	Kaninchen, IgG	Dako (Hamburg)

**Tabelle B 10: Sekundäre Antikörper für immunzytochemische Analysen**

Antigen	Verdünnung	Art	Quelle
Alexa 488	1:1000 in Blockierungslösung 1 oder 2	Kaninchen, IgG	Invitrogen (Karlsruhe)
Alexa 555	1:500 in Blockierungslösung 2	Maus, IgG	Invitrogen (Karlsruhe)
Cy3	1:250 in Blockierungslösung 2	Maus IgG und IgM	Jackson Immuno Research (Hamburg)

## **C Ergebnisse**

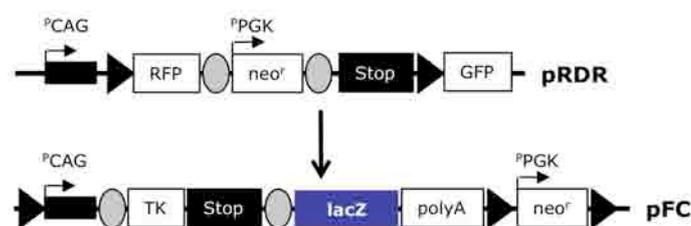
### **C 1 Reversible Geninduktion mit zellpermeablen Cre- und Flpe-Rekombinasen**

Ein streng reguliertes, induzierbares und reversibles Überexpressionssystem ist für die Analyse von komplexen Genfunktionen wie z.B. die Untersuchung von Transkriptionsfaktoraktivitäten während der gerichteten Differenzierung von ES-Zellen und den gentherapeutischen Einsatz wünschenswert (Toniatti *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2007). Von Tetrazyklin-induzierbaren Promotoren wurde wiederholt berichtet, allerdings ist ihre Anwendbarkeit durch die unerwünschte Hintergrundaktivität und niedrige Induzierbarkeit der Promotoren beschränkt (Zhou *et al.*, 2007). Die Verwendung von induzierbaren Überexpressionssystemen durch ortsspezifische Rekombinasen garantiert eine strikte Kontrolle über das Transgen. Sie erlaubt jedoch keine Reversibilität. Diese Einschränkung kann durch die kombinierte Applikation zweier Rekombinasen umgangen werden. Während mit Cre eine zuverlässige Rekombinase zur Genmanipulation etabliert wurde, war die Routineanwendung von dualen Rekombinasesystemen bislang durch schlechte Flp-vermittelte Rekombinationsraten stark limitiert. In dieser Arbeit wurden murine Zelllinien mit reversibel induzierbarem Transgen durch die kombinierte Transduktion mit der zellpermeablen Rekombinase HTNCre (Peitz *et al.*, 2002) und einer kürzlich generierten Flpe-Rekombinase manipuliert. Dabei wurde zunächst überprüft, ob die Flpe-vermittelte Rekombinationseffizienz durch den direkten Zelltransfer des Flpe-Proteins gesteigert werden kann.

#### **C 1.1 pFC – ein Konstrukt zur reversiblen Geninduktion**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Konstrukt entwickelt werden, mit dem ein Gen, vermittelt über die beiden ortsspezifischen Rekombinasen Cre und Flpe, kontrollierbar induziert und wieder inaktiviert werden kann. Als Ausgangsvektor, in Abbildung C 1 dargestellt, diente das Konstrukt pRDR (*ROSA26 double reporter*; Wunderlich, 2004). In transgenen Zelllinien mit dem pRDR-Vektor wird vor der Cre-vermittelten

Rekombination konstitutiv ein *rfp*- (*red fluorescent protein*) Reporter gen exprimiert. Die nachgeschaltete Westphal-Stopsequenz (Lakso *et al.*, 1992) blockiert die Expression des *gfp*- (*green fluorescent protein*) Reporter gens. Erst nach Exzision der loxP-flankierten *rfp*- und Stopsequenzen kann *gfp* exprimiert werden. Zur reversiblen Geninduktion wurde das pRDR-Konstrukt umfangreich verändert (siehe Abb. C 1). Die *rfp*-Sequenz wurde durch das Thymidinkinase- (*tk*-) Gen des Herpes-Simplex-Virus ersetzt und mit der stromabwärts gelegenen Stopsequenz von FRT-Stellen flankiert. Eine Negativselektion mit Ganciclovir sollte sicherstellen, daß nur Zellen überleben, in denen die Flpe-vermittelte Rekombination stattgefunden hat und das Zielgen induziert wurde. Außerdem erfolgte der Austausch von *gfp* gegen das SV40-Polyadenylierungssignal und das Einfügen einer loxP-angrenzenden Neomycinresistenzkassette zur Selektion der Zellen, die den Vektor aufgenommen haben. Das gesamte Expressionskonstrukt wurde mit loxP-Stellen versehen, sodass nach Cre-Rekombination mit Ausnahme einer verbleibenden loxP-Stelle eine dauerhafte genetische Veränderung der Zielzellen ausgeschlossen werden konnte. Stromaufwärts der polyA-Sequenz wurde eine Swal-Schnittstelle für das entsprechende Zielgen eingebracht. Das Plasmid wurde pFC (Flp-ON-Cre-OFF) genannt. In der vorliegenden Arbeit wurde *lacZ* als Reporter gen verwendet, um die Funktionalität des Konstrukts zu überprüfen und die Anwendung der Flpe-Proteintransduktion zu optimieren.

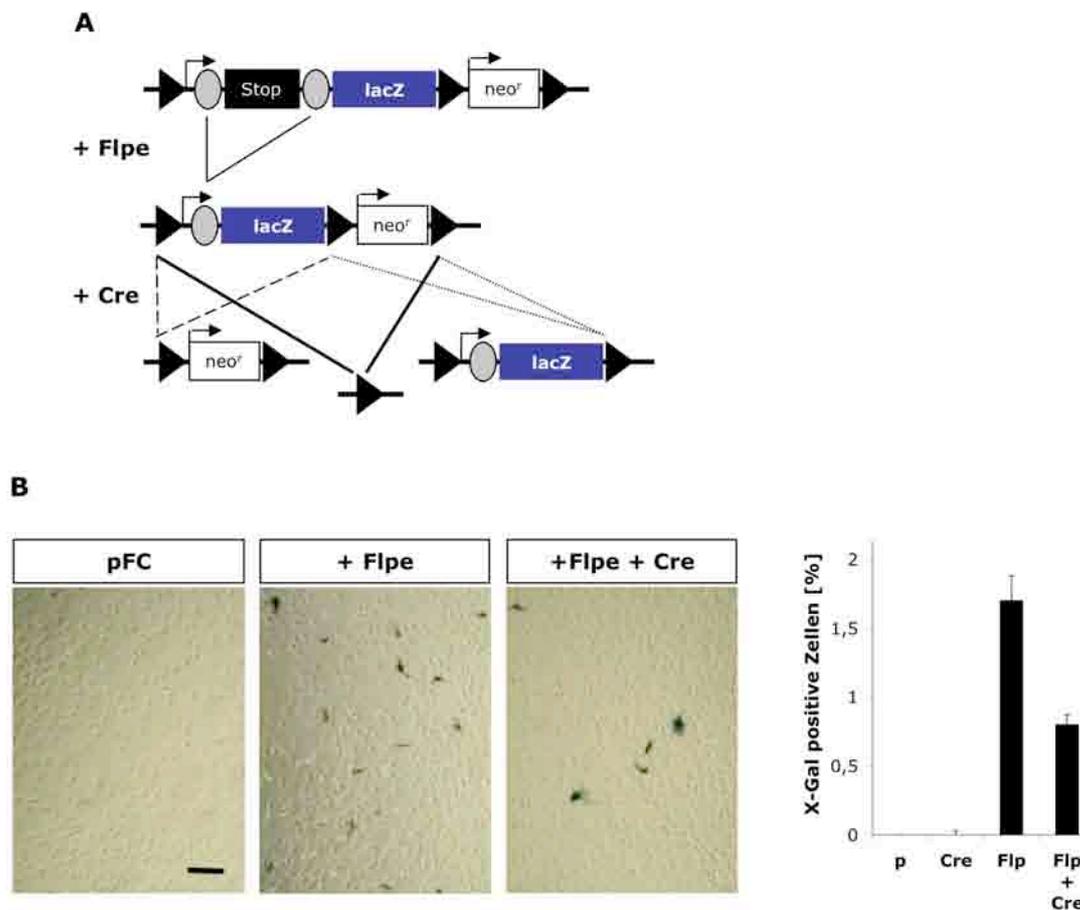


**Abb. C 1: Schematische Darstellung des Ausgangsvektors pRDR und des pFC-Plasmids.**

FRT-Stellen sind als graue Kreise und loxP-Stellen als schwarze Dreiecke dargestellt. TK: Thymidinkinase; RFP: *red fluorescent protein*; *neo*<sup>r</sup>: Neomycinresistenz; GFP: *green fluorescent protein*; Stop: Westphal-Stopsequenz; <sup>p</sup>CAG und <sup>p</sup>PGK: Promotoren; polyA: Polyadenylierungssignal.

Die Aktivität des pFC-Konstrukts wurde durch eine transiente Cotransfektion mit Flpe- und Cre-Plasmiden in 3T3-Zellen getestet. In Abbildung C 2A sind die entsprechenden Rekombinationsereignisse schematisch dargestellt. Nach Transfektion mit Flpe kommt es zur Expression des *lacZ*-Reporter gens, welches für

das  $\beta$ -Galaktosidase- ( $\beta$ -Gal-) Enzym kodiert. Der Nachweis der Rekombination kann indirekt durch eine X-Gal-Färbereaktion gezeigt werden. Bei der gleichzeitigen Applikation der Cre- und Flpe-Vektoren können verschiedene Reaktionen stattfinden. Wird nur das loxP-flankierte Neomycinresistenzgen entfernt, findet die Transkription des *lacZ*-Gens weiterhin statt. Alternativ bleibt nur die Neomycinkassette bestehen oder die gesamte Expressionskassette wird deletiert.



**Abb. C 2: das pFC-Konstrukt zur reversiblen Geninduktion.**

**(A)** Vereinfachte schematische Darstellung. Nach Flpe-vermittelter Rekombination wird die mit FRT-Stellen (graue Kreise) flankierte Stopsequenz entfernt und das *lacZ*-Gen abgelesen. Im Idealfall wird nach Cre-Rekombination die Expressionskassette bis auf eine loxP-Stelle (schwarze Dreiecke) entfernt. *neo<sup>r</sup>*: Neomycinresistenz.

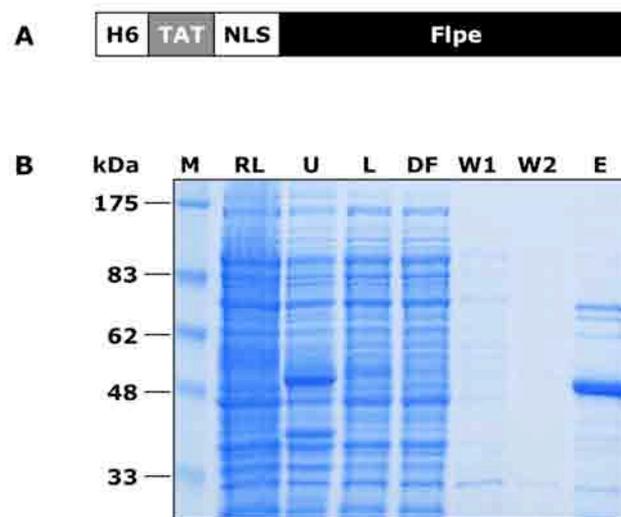
**(B)** Transiente Transfektion von 3T3-Zellen mit Quantifizierung. pFC (p) wurde allein, mit Flpe, Cre oder Flpe und Cre transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und X-Gal gefärbt. Skalierung: 200  $\mu$ m.

Wie in Abbildung C 2B gezeigt, hat das pFC-Konstrukt keine unerwünschte Hintergrundaktivität. Auch nach Cre-Transfektion haben alle Zellen einen negativen  $\beta$ -Gal-Phänotyp. Erst eine Cotransfektion von pFC und dem Flpe-Plasmid bewirkt die Expression von *lacZ*, in diesem Fall bei ca. 2% der Zellen. Durch die gleichzeitige

Inkubation mit Flpe- und Cre-Vektoren wird die Anzahl der  $\beta$ -Gal positiven Zellen um die Hälfte reduziert. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass dieses reversibel induzierbare System funktionsfähig ist. Schlechte Rekombinationseffizienzen waren auf die transiente Transfektion aller drei Plasmide zurückzuführen.

### C 1.2 Reinigung und Stabilität einer transduzierbaren Flpe-Rekombinase

Das Expressionskonstrukt für eine transduzierbare Flpe-Rekombinase wurde in Analogie zur membrangängigen Cre-Rekombinase (Peitz *et al.*, 2002) generiert (siehe Abb. C 3A).



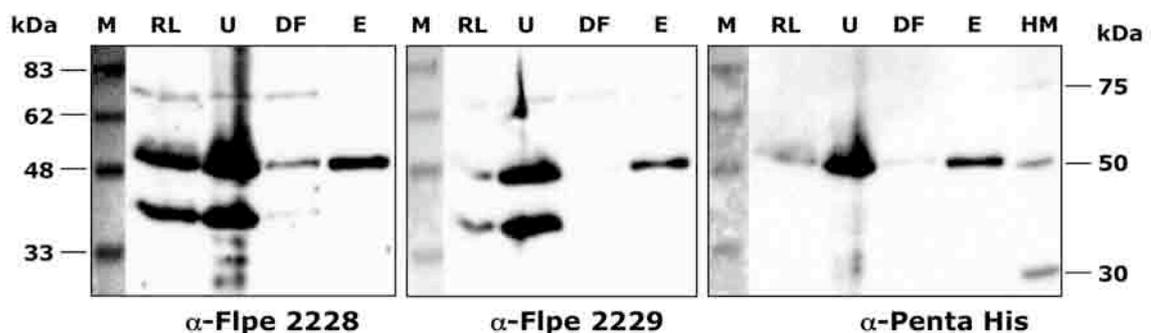
**Abb. C 3: Aufbau und Aufreinigung des transduzierbaren Flpe-Fusionsproteins.**

**(A)** Aufbau von HTNFlpe. H6: His-tag; TAT: Proteintransduktionsdomäne aus HIV; NLS: Kernlokalisierungssignal; Flpe: Flp *enhanced* (thermostabile Variante).

**(B)** SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung von Fraktionen einer HTNFlpe-Aufreinigung. Pro Spur wurden 5  $\mu$ l Probe aufgetragen. M: Marker; RL: Rohlysate; U: unlösliche Fraktion; L: lösliche Fraktion; DF: Säulendurchfluß; W1, W2: Waschfraktionen; E: Eluat. Die Molekulargewichte sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

Das rekombinante Fusionsprotein besteht neben der thermostabilen Variante von Flp (Flpe) (Buchholz *et al.*, 1998) aus einem N-terminalen His-tag (H6). Dieser His-tag wird für die Aufreinigung aus *E. coli* mittels Ni-Affinitätschromatographie benötigt. Für die effiziente zelluläre Aufnahme und den Kerntransfer wurden die basische Peptidsequenz TAT aus dem HIV-Tat-Transaktivator (Frankel *et al.*, 1988 und Green *et al.*, 1988) und eine Kernlokalisationssequenz (*nuclear localisation signal*, NLS) eingefügt.

Abbildung C 3B zeigt die Coomassie-Färbung einer typischen HTNFlpe-Proteinaufreinigung. In der Elutionsfraktion ist auf der erwarteten Laufhöhe von ca. 53 kDa eine dominante Bande mit geringen Verunreinigungen ober- und unterhalb der spezifischen HTNFlpe-Bande zu erkennen. Nach Dialyse gegen physiologische Puffer lag die maximale Proteinkonzentration bei 6  $\mu\text{M}$  und war für ca. 48 Stunden stabil. Die Lagerungsfähigkeit von HTNFlpe wurde in der Arbeitsgruppe entscheidend verbessert (Patsch, 2005). Hierzu wurde ein aus der Literatur (Conway *et al.*, 2003) bekannter Hochsalzpuffer, *Flp concentration buffer*, (FCB) verwendet, mit dem das Protein weiter aufkonzentriert werden konnte (100 bis 150  $\mu\text{M}$ ) und bei  $-80^\circ\text{C}$  über mehrere Monate stabil war.



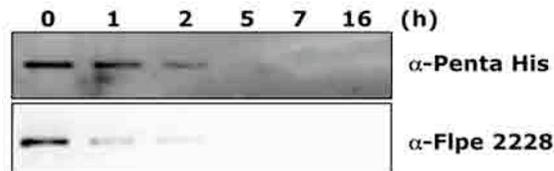
**Abb. C 4: Analyse Flpe-spezifischer Antikörper.**

Western Blots einer HTNFlpe-Aufreinigung. Die Membranen wurden mit den beiden Flpe-Antisera 2228, 2229 oder einem His-Antikörper inkubiert. Pro Spur wurden 5  $\mu\text{l}$  Probe aufgetragen. M: Marker; RL: Rohlysat; U: unlösliche Fraktion; DF: Säulendurchfluß; E: Eluat; HM: His-Marker. Die Molekulargewichte sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

Für die spezifische Detektion des rekombinanten Flpe-Proteins wurden zwei verschiedene anti-Flpe-Antisera (2228 und 2229) durch Immunisierung von Kaninchen mit HTNFlpe hergestellt. Zu diesem Zeitpunkt war kein kommerzieller Antikörper zu erwerben. Die Spezifität und Sensitivität der Antisera wurde über Western Blots getestet. Zur Kontrolle wurde ein His-Antikörper (Qiagen) verwendet, mit dem die HTNFlpe-spezifische Bande zuverlässig detektiert wird. Beide Antisera, 2228 und 2229, erkannten die Flpe-Bande im Eluat mit der gleichen Spezifität und Sensitivität wie der His-Antikörper (siehe Abb. C 4).

Um die Stabilität von HTNFlpe unter Zellkulturbedingungen zu überprüfen, wurden 3T3-Zellen mit dem rekombinanten Protein bei  $37^\circ\text{C}$  und einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in DMEM/PBS für bis zu 16 Stunden inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten

wurden Proben entnommen und mittels eines Western Blots ausgewertet. Die Detektion mit dem Antiserum 2228 und dem His-Antikörper ergab, dass das Protein für mindestens zwei Stunden nachweisbar war, wobei der Abbau des Proteins schon nach einer Stunde zu erkennen war (siehe Abb. C 5).



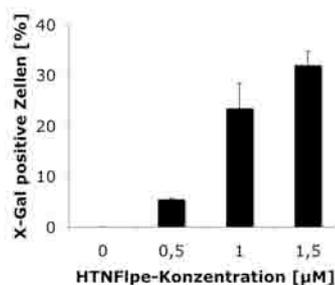
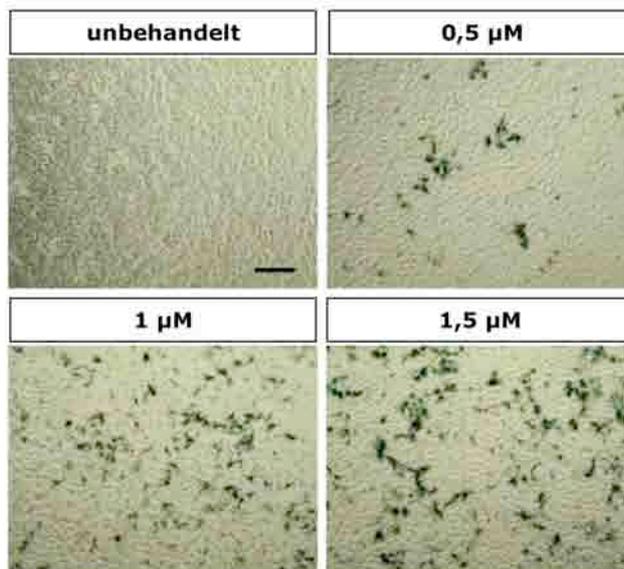
**Abb. C 5: Stabilität von HTNFlpe.**

Western Blots von 3T3-Zellkulturüberständen, die bis zu 16 Stunden bei 37°C mit 1 µM HTNFlpe in DMEM/PBS inkubiert worden waren. Die Membranen wurden mit dem Flpe-Antiserum 2228 oder einem His-Antikörper inkubiert. Pro Spur wurden 10 µl Probe aufgetragen.

### C 1.3 Konzentrationsabhängigkeit der Rekombinationseffizienz von HTNFlpe

Zur Optimierung der Anwendungsbedingungen für die transduzierbare Flpe-Rekombinase wurde eine transgene NIH-3T3-Reporterzelllinie (FC-3T3) verwendet, in der eine Kopie des pFC-Vektors stabil integriert ist (Patsch, 2005).

Die zellpermeable Flpe-Rekombinase wurde nach Dialyse gegen PBS und DMEM im Verhältnis 1:1 auf Konzentrationen von 0,5 bis 1,5 µM eingestellt und bei 37°C mit der FC-3T3-Reporterzelllinie inkubiert. Aufgrund der vorangegangenen Stabilitätstests mit HTNFlpe wurde eine Transduktionszeit von 5 Stunden gewählt. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und X-Gal-gefärbt (siehe Abb. C 6). Vor Induktion war keine basale Aktivität des Reportergens vorhanden, da *lacZ* nur nach Behandlung mit dem Flpe-Fusionsproteins exprimiert wurde. Um die Transduktionseffizienz zu quantifizieren, wurde der Anteil der blauen Zellen für die jeweilige Bedingung bestimmt. Dabei zeichnete sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Rekombinationseffizienz ab. Nach Inkubation mit 0,5 µM HTNFlpe waren 6% der Zellen blau gefärbt. Die doppelte Konzentration von HTNFlpe führte zu einem 4-fachen Anstieg der β-Gal positiven Zellen mit einem Maximum von 32% bei einer Konzentration von 1,5 µM.



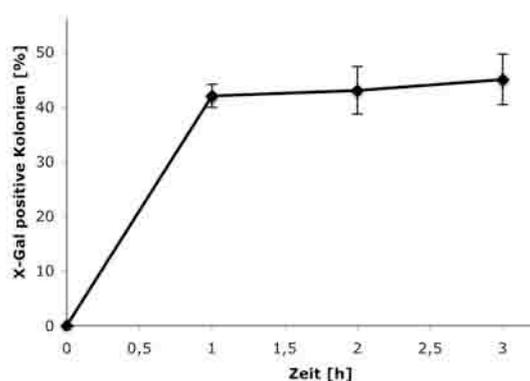
**Abb. C 6: Konzentrationsabhängigkeit der HTNFlpe-Transduktionseffizienz mit Quantifizierung.**

In der FC-3T3-Reporterzelllinie führt die Flpe-vermittelte Rekombination zur Aktivierung der  $\beta$ -Galactosidase. Die Zellen wurden für 5 Stunden mit steigenden HTNFlpe-Konzentrationen behandelt. 48 Stunden später erfolgten Fixierung und X-Gal-Färbung. Skalierung: 200  $\mu$ m.

Durch Modifikation des Transduktionsmediums (Zusatz von Serumersatz) und die Erniedrigung der Temperatur auf 30°C konnte die Toxizität, verursacht durch HTNFlpe-Proteinpräzipitate, gesenkt und die Konzentration somit erhöht werden. Eine Flpe-Konzentration von nun 4  $\mu$ M und die Zugabe des fusogenen TAT-HA-Peptids, das die intrazelluläre Freisetzung des TAT-Fusionsproteins aus den Makropinosomen fördert (Wadia *et al.*, 2004), ermöglichte eine Steigerung der Transduktionseffizienz auf bis zu 77% (Patsch, 2005).

### C 1.4 Transduktion von HTNFlpe in murine ES-Zellen

Im nächsten Schritt wurde die Transduktionsfähigkeit des Flpe-Fusionsproteins in murine ES-Zellen überprüft. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit eine transgene ES-Zelllinie (FC-ES) generiert, die stabil für eine Kopie des pFC-Konstrukts kodiert.



**Abb. C 7: Transduktion von HTNFlpe in murine ES-Zellen mit Quantifizierung.**

In FC-ES-Zellen führt die Flpe-vermittelte Rekombination zur Aktivierung der  $\beta$ -Galactosidase. Die Zellen wurden für 1 bis 3 Stunden mit  $4 \mu\text{M}$  HTNFlpe behandelt. 48 Stunden später erfolgten Fixierung und X-Gal-Färbung. Skalierung:  $200 \mu\text{m}$ .

FC-ES-Zellen wurden 6 Stunden nach ihrem Aussäen auf Fibroblasten für 1 bis 3 Stunden unter optimierten Transduktionsbedingungen (siehe oben) mit  $4 \mu\text{M}$

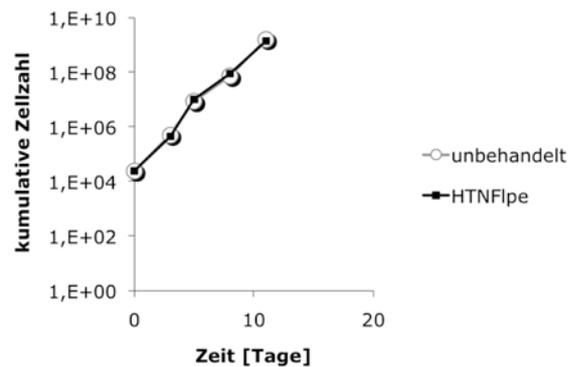
HTNFlpe inkubiert, zwei Tage später fixiert und X-Gal gefärbt (siehe Abb. C 7). Die Auszählung der positiven Kolonien ergab, dass die maximale Rekombinationseffizienz mit 42% teilweise- oder ganz blau gefärbten Kolonien schon nach einer Stunde erreicht war. Auch in FC-ES-Zellen war keine unerwünschte Basalaktivität des Zielgens vor Induktion zu beobachten.

In einem weiteren Ansatz wurde eine mögliche Steigerung der Rekombinationsrate durch die doppelte Applikation mit HTNFlpe getestet. Hierzu wurden FC-ES-Zellen zwei Tage nach erfolgter Transduktion im Verhältnis 1:2 vereinzelt. Ein Ansatz wurde 5 Stunden später erneut mit 4  $\mu$ M HTNFlpe inkubiert, ein Ansatz wurde mit Transduktionsmedium ohne HTNFlpe behandelt. Die Zellen wurden nach weiteren 2 Tagen fixiert und mit X-Gal gefärbt. Im Vergleich zu einmalig Flpe-behandelten ES-Zellen blieb die Anzahl an blau gefärbten Zellen bei zweifacher Transduktion mit HTNFlpe konstant. (Ergebnisse nicht gezeigt).

### **C 1.5 Transduktion des Flpe-Fusionsproteins unter Erhalt der Proliferation und chromosomaler Stabilität**

In letzter Zeit wurde berichtet, dass die Aktivität der Cre-Rekombinase in Zellen toxische Wirkungen wie Wachstumsinhibition und chromosomale Aberationen haben kann (Baba *et al.*, 2005; de Alboran *et al.*, 2001; Loonstra *et al.*, 2001; Pfeifer *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2000 und Silver & Livingston, 2001). Es sollte nun überprüft werden, inwiefern sich diese Befunde auf die HTNFlpe-Transduktion übertragen lassen.

Zunächst wurde die Proliferationsfähigkeit von FC-ES-Zellen nach Transduktion mit HTNFlpe bestimmt. Die Zellen wurden für eine Stunde mit 4  $\mu$ M HTNFlpe in Transduktionsmedium bei 30°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die entstandenen Kolonien vereinzelt und mit definierter Zelldichte neu ausgesät. Für die folgenden 4 Passagen unter subkonfluenten Bedingungen wurden die kumulativen Zellzahlen bestimmt (siehe Abb. C 8). Dabei ließen sich im Vergleich zu unbehandelten Zellen keine Unterschiede im Proliferationsverhalten feststellen.

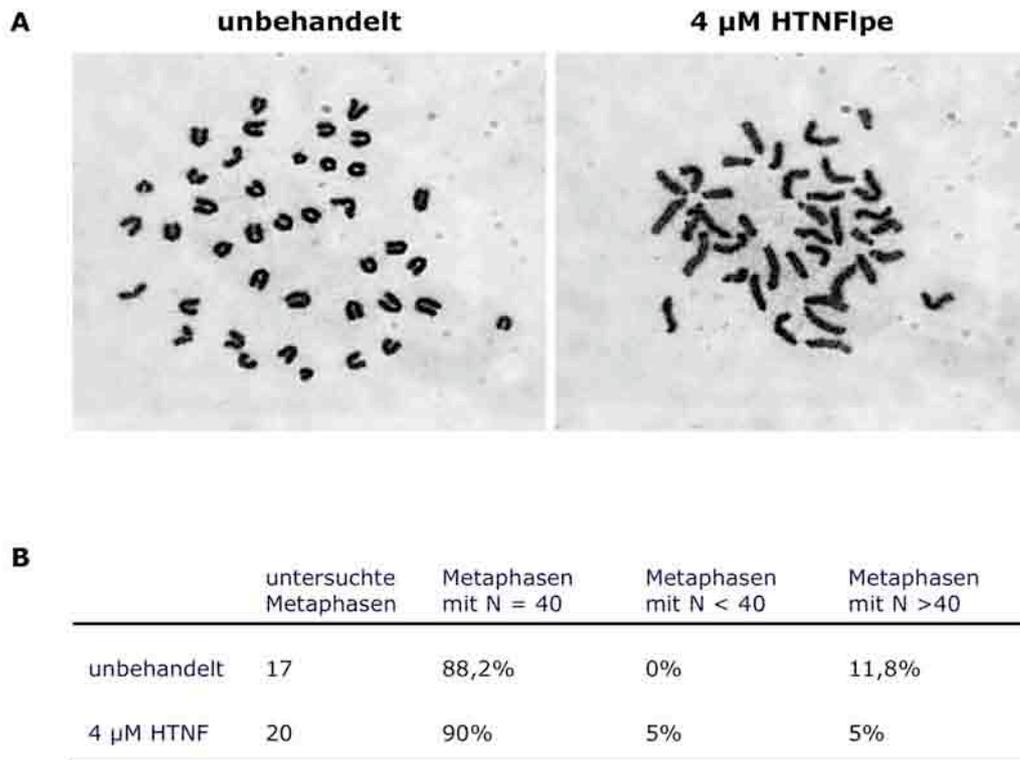


**Abb. C 8: Unverändertes Proliferationsverhalten von FC-ES-Zellen nach Flpe-Transduktion.**

FC-ES-Zellen wurden für 1 Stunde mit 4  $\mu$ M HTNFlpe behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit definierter Dichte neu ausgesät. Die kumulativen Zellzahlen wurden für die nächsten 4 Passagen bestimmt.

Im nächsten Schritt wurden mögliche Karyotypveränderungen von FC-ES-Zellen nach Flpe-Transduktion analysiert. Hierzu wurden Bedingungen gewählt, die zu maximaler Transduktionseffizienz führen (siehe C 1.4). Die genaue Versuchsanordnung ist in B 13 beschrieben. Die präparierten Metaphasechromosomen wurden mit Giemsa gefärbt und ausgezählt (siehe Abb. C 9). 90% der FC-ES-Zellen, die mit HTNFlpe behandelt worden waren, hatten einen normalen Karyotyp von  $n=40$  Chromosomen. Nur in 10% der Metaphasen konnten Aneuploidien festgestellt werden, bei der Hälfte war ein Chromosom verloren gegangen. In Kontroll-behandelten FC-ES-Zellen war das Ergebnis ähnlich. 88% der ES-Zellen hatten einen normalen Chromosomensatz, 12% waren trisom. Nach HTNFlpe-Transduktion konnte somit kein negativer Einfluss auf die chromosomale Stabilität nachgewiesen werden.

In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Andreas Zimmer (Universitätsklinikum Bonn) konnten wir inzwischen zeigen, dass die Flpe-Transduktion von ES-Zellen keinen negativen Einfluss auf ihre Keimbahnkompetenz hat. Die Transduktion von rekombinantem Flpe-Protein ist folglich eine effiziente, untoxische Methode zur Manipulation von ES-Zellen.



**Abb. C 9: Stabiler Karyotyp der transgenen ES-Zelllinie FC nach Flpe-Transduktion.** FC-ES-Zellen wurden für 1 Stunde mit 4  $\mu$ M HTNFlpe behandelt. **(A)** Giemsa-Färbung der Metaphasechromosomen. **(B)** Auszählung der Metaphasen.

### C 1.6 Kontrollierte und reversible Geninduktion mit zellpermeablen Flpe- und Cre-Rekombinasen

Schließlich wurde die Funktionalität der reversiblen Geninduktion durch Transduktion von Flpe- und Cre-Fusionsproteinen in die transgene ES-Reporterzelllinie FC überprüft (siehe Abb. C 10).

Wie schematisch dargestellt sollen nach Applikation der zellpermeablen Flpe-Rekombinase sowohl das HSV-*tk*-Gen als auch die nachgeschaltete Stop-Sequenz, die von FRT-Stellen flankiert sind, ausgeschnitten werden. Das stromabwärts gelegene *lacZ*-Reporter-gen kann abgelesen werden (siehe Abb. C 10B, rechts).

FC-ES-Zellen wurden für 1 Stunde mit HTNFlpe in Transduktionsmedium inkubiert. Nach X-Gal-Färbung waren wie bereits gezeigt ca. 45% der Kolonien teilweise oder vollständig blau gefärbt (siehe Abb. C 10B, links und Abb. C 10E).

Die nachgeschaltete Negativselektion mit Ganciclovir soll bewirken, dass alle *tk*-exprimierenden Zellen absterben und nur diejenigen überleben, in denen die Flpe-vermittelte Rekombination stattgefunden hat. Dadurch können Flpe-rekombinierte Zellen, in denen das *lacZ*-Gen (oder jedes beliebige andere Zielgen) aktiv ist, angereichert werden (siehe Abb. C 10C, rechts).

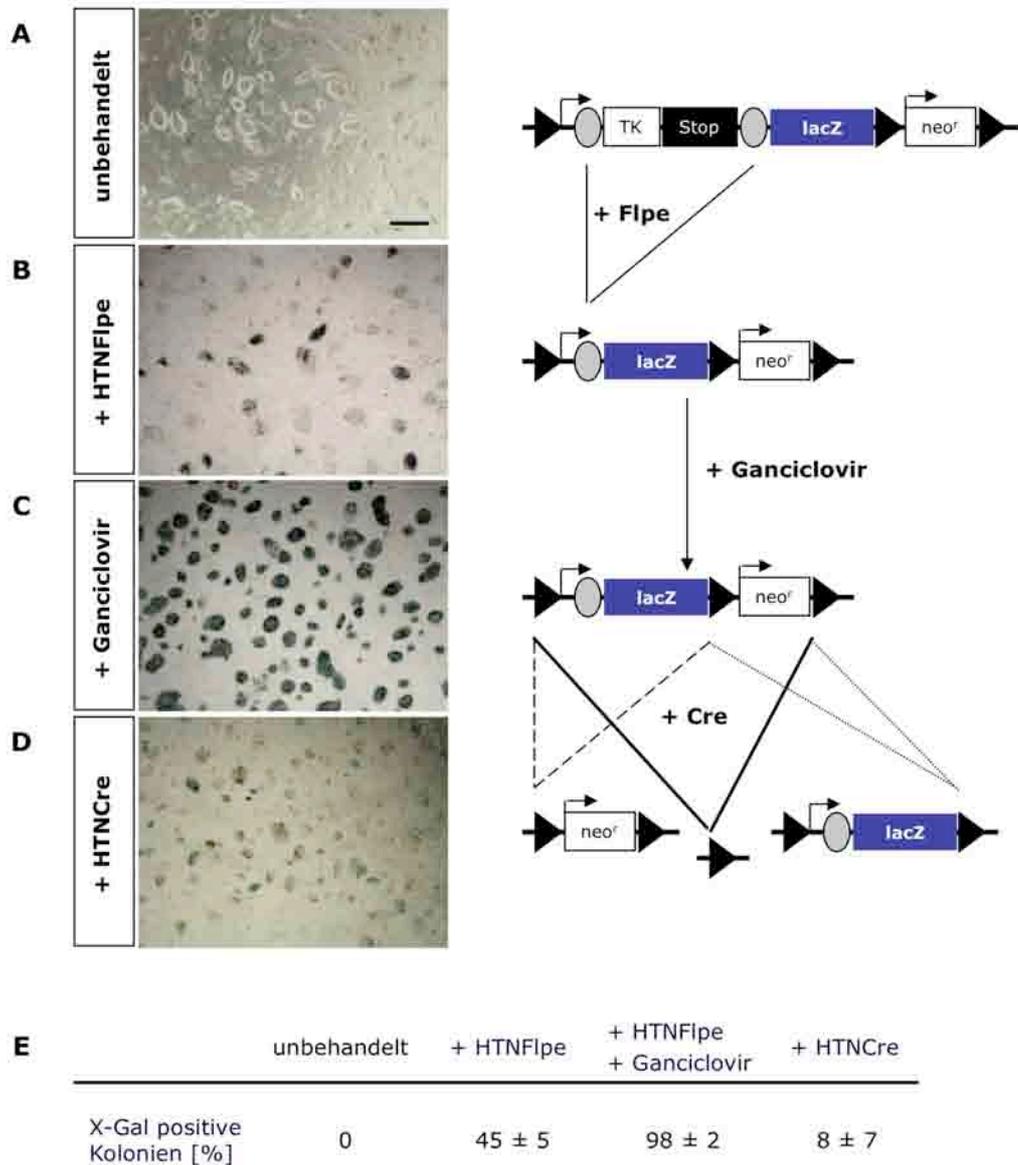
Wie in Abb. C 10C (links) gezeigt, waren nach abgeschlossener Ganciclovir-Behandlung nahezu 100% der ES-Zellkolonien  $\beta$ -Gal positiv, wobei Unterschiede in der Intensität der Färbung zu erkennen waren.

Die abschließende Transduktion mit HTNCre soll dazu führen, dass das gesamte Konstrukt, das mit loxP-Stellen flankiert ist, deletiert wird. Die Tri-loxP-Strategie (ebenso das Neomycinresistenzgen ist mit loxP-Stellen flankiert) kann in wenigen Fällen eine partielle Rekombination innerhalb des Vektors verursachen. In diesem Fall kann es dazu kommen, dass nur die Neomycinresistenz ausgeschnitten wird und das *lacZ*-Gen weiter exprimiert wird. Alternativ kann das *lacZ*-Gen deletiert werden und die Neomycinresistenz bestehen bleiben (siehe Abb. C 10D, rechts).

Um eine *lacZ*-Restaktivität in rekombinierten Zellen zu umgehen, wurden die FC-ES-Zellen erst 1 Woche nach HTNCre-Transduktion fixiert und X-Gal-gefärbt. Es waren nur noch wenige (bis zu 15%) blaue Kolonien sichtbar. (siehe Abb. C 10D, links).

Durch die kombinierte Applikation der beiden zellpermeablen Rekombinasen Cre und Flpe war es somit möglich, das *lacZ*-Reportergen in FC-ES-Zellen ohne unerwünschte Hintergrundaktivität gezielt an- und wieder auszuschalten. Diese reversible Geninduktion sollte auch mit weiteren Zielgenen wie z.B. *id1* möglich sein. In Verbindung mit einer Ganciclovirselektion war die Effizienz der HTNFlpe-vermittelten Rekombination zudem mit der von HTNCre vergleichbar, sodass HNTFlpe für diverse Fragestellungen als Alternative zu HTNCre fungieren kann.

Mit HTNFlpe war somit eine weitere transduzierbare Rekombinase zur Manipulation von ES-Zellen identifiziert und charakterisiert worden. Nun wurde die bereits etablierte Methodik der HTNCre-Transduktion (Peitz *et al.*, 2002) angewendet, um die Bmp4-vermittelte Signalweiterleitung in ES-Zellen und neuronalen Zellen näher zu entschlüsseln.



**Abb. C 10: Reversible Geninduktion durch Transduktion mit Flpe- und Cre-Rekombinasen.**

Auf der rechten Seite sind die jeweiligen Ereignisse schematisch dargestellt, die auf der linken Seite mit einer X-Gal-Färbung der transgenen ES-Zelllinie FC dokumentiert wurden.

**(A)** In unbehandelten ES-Zellen wird die Expression des *lacZ*-Reportergens durch eine vorgeschaltete Stopsequenz blockiert. Skalierung: 500  $\mu$ m.

**(B)** Die Stopsequenz wird zusammen mit der stromaufwärts-gelegenen HSV-Thymidinkinase (TK), beide sind mit FRT-Stellen (graue Ellipsen) flankiert, nach Flpe-vermittelter Rekombination deletiert. Die Zellen wurden für 1 Stunde mit HTNFlpe transduziert, 2 Tage später fixiert und gefärbt.

**(C)** Die rekombinierten Zellen wurden durch eine Negativselektion mit Ganciclovir angereichert. Durch Ganciclovir werden alle Zellen abgetötet, die die HSV-*tk* exprimieren.

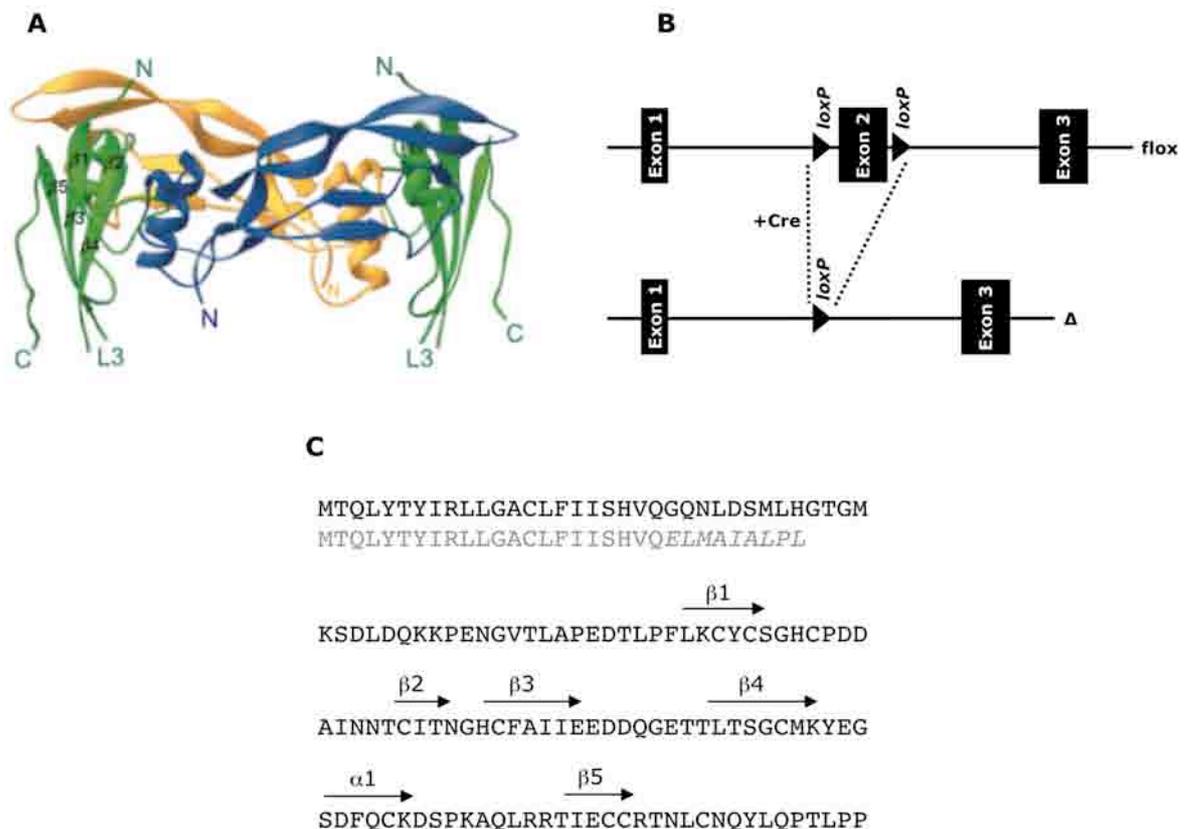
**(D)** Die finale Cre-Rekombination ermöglicht, das Reporterkonstrukt bis auf eine im Genom verbleibende loxP-Stelle (schwarze Dreiecke) auszuschneiden. Aufgrund der Tri-loxP-Strategie können auch die Neomycinresistenz (*neo*<sup>r</sup>) oder das *lacZ*-Reportergen erhalten bleiben. Die Zellen wurden eine Woche nach Cre-Transduktion fixiert und gefärbt.

**(E)** Quantifizierung der X-Gal positiven Kolonien.

## C 2 Konditionale Inaktivierung von *bmpr1a* in murinen embryonalen Stammzellen

Bmp4 spielt für die Pluripotenz-Erhaltung von murinen ES-Zellen eine wichtige Rolle (Qi *et al.*, 2004; Ying *et al.*, 2003b). Über welchen Rezeptor das Bmp-Signal in den Zellkern transduziert wird ist bislang weitestgehend unklar. Die konditionale Inaktivierung von *bmpr1a* in ES-Zellen sollte hierüber Aufschluss geben.

### C 2.1 Deletion von *bmpr1a* in ES-Zellen



**Abb. C 11: Struktur und konditionale Inaktivierung von *bmpr1a*.**

**(A)** Struktur der extrazellulären Domäne von Bmpr1a im Komplex mit Bmp2. Die Bmp-Monomere sind blau und gelb, die Rezeptoren grün gefärbt. Sekundäre Strukturelemente, Kettentermini sowie die Rezeptorschleifen 1 und 3 sind markiert. Abbildung adaptiert von Kirsch *et al.*, 2000.

**(B)** Konditionale Inaktivierung von *bmpr1a* auf genomischer Ebene. Das Exon 2 ist mit loxP-Stellen flankiert (floxed) und wird nach Cre-Rekombination excidiert (Δ).

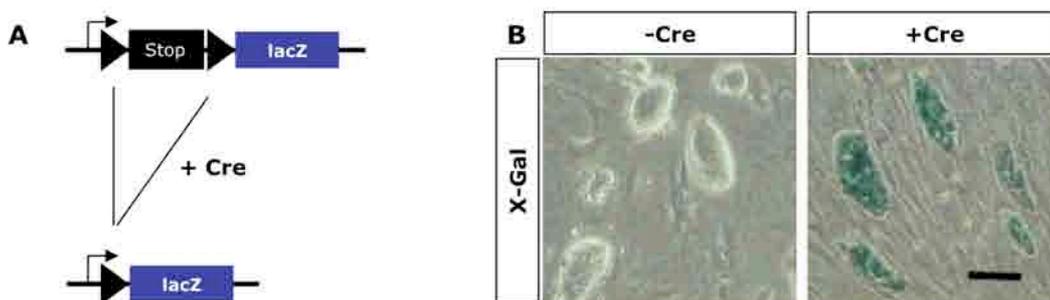
**(C)** Aminosäure-Sequenz von Bmpr1a vor (schwarz) und nach Cre-Rekombination (grau). Veränderte Aminosäuren sind kursiv markiert. Sekundärstrukturelemente sind hervorgehoben.

In der Maus wird der *bmpr1a* durch elf Exons kodiert und ist auf Chromosom 14 lokalisiert (Mishina *et al.*, 1995b). Der extrazelluläre Anteil des Bmpr1a besteht aus einer

kompakten Domäne mit zwei  $\beta$ -Faltblättern und einer  $\alpha$ -Helix (siehe Abb. C 11A). Die Stränge  $\beta$ 3,  $\beta$ 4 und  $\beta$ 5 bilden ein zentrales antiparalleles Faltblatt. Dieses wird am äußeren Rand durch ein Faltblatt bestehend aus  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 flankiert (Kirsch *et al.*, 2000).

Um den *bmpr1a* konditional zu inaktivieren, wurde das Exon 2 wie in Abbildung C 11B dargestellt mit loxP-Stellen flankiert (Mishina *et al.*, 2002). Die Deletion von Exon 2 durch eine Cre-vermittelte Rekombination führt zu einer *Nonsense* Mutation nach Aminosäure 31. Dies resultiert in einem trunkierten *bmpr1a* ohne extrazelluläre Struktur, sodass keine weitere Liganden-Bindung möglich ist (siehe Abb. C 11C). *In vitro* sollte die konditionale Inaktivierung von *bmpr1a* durch Proteintransduktion mit HTNCre (Peitz *et al.*, 2002) besonders effizient gestaltet werden.

In dieser Arbeit wurde die doppelt transgene Linie *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* verwendet, die homozygot für das loxP-Stellen flankierte *bmpr1a*-Allel und heterozygot für den *ROSA26lacZ*-Lokus ist (Mishina *et al.*, 2002; Mishina, unpublizierte Daten). Das *lacZ*-Reporter gen ist unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promoters und liegt stromabwärts einer Stopsequenz, die mit loxP-Stellen flankiert ist (siehe Abb. C 12A). Diese Stopsequenz wird durch Cre-Rekombination entfernt und das *lacZ*-Gen wird abgelesen (Soriano, 1999). Unter der Voraussetzung, dass eine partielle Rekombination ausgeschlossen wird, weisen  $\beta$ -Gal-positive ES-Zellkolonien somit auf eine Deletion von *bmpr1a* hin.

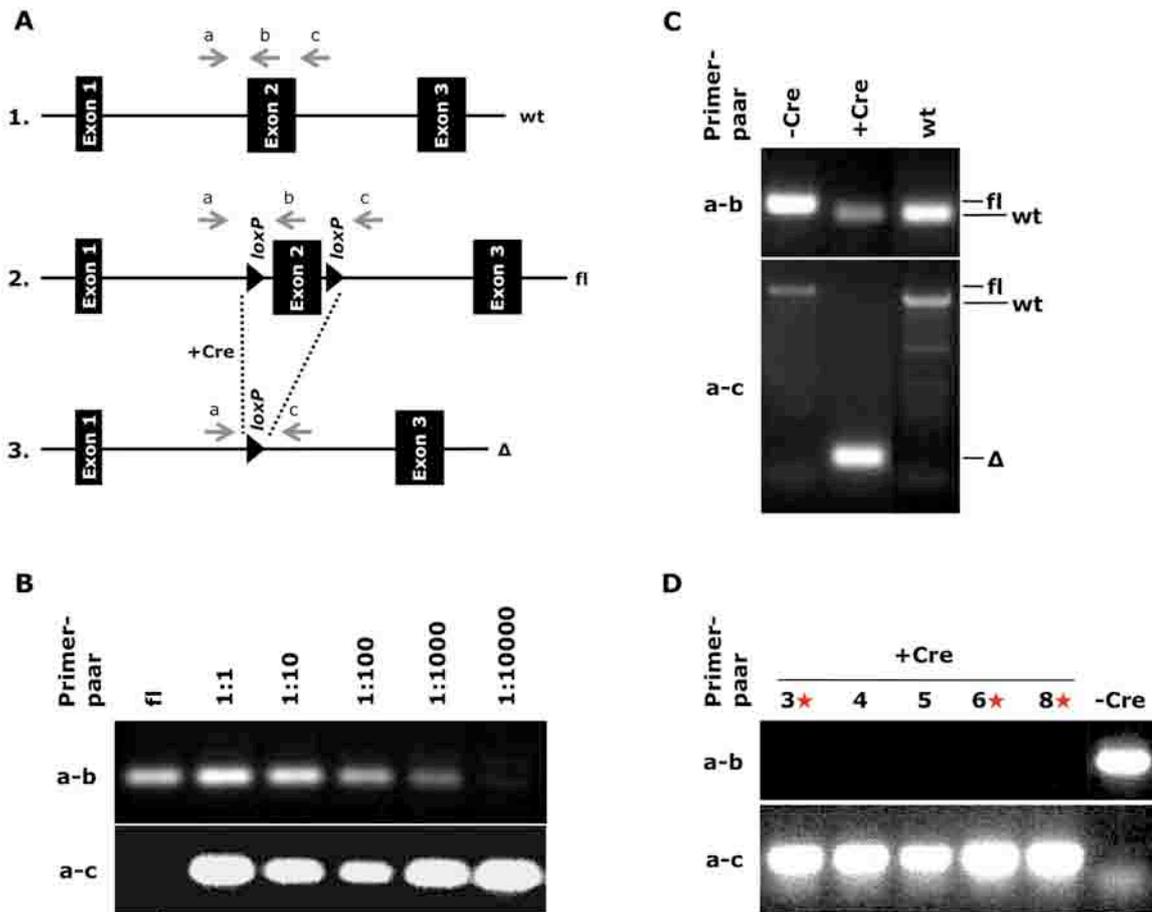


**Abb. C 12: *lacZ*-Aktivierung in *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen nach Cre-Transduktion.**

**(A)** Schematische Darstellung des *ROSA26lacZ*-Lokus. In nicht rekombinierten Zellen wird die Expression des *lacZ*-Reportergens (*lacZ*) durch die stromaufwärts gelegene Stopsequenz (Stop), die mit loxP-Stellen (schwarze Dreiecke) flankiert ist, verhindert. Nach Cre-vermittelter Rekombination wird die Stopsequenz ausgeschnitten und das *lacZ*-Gen wird unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promoters (Pfeil) abgelesen.

**(B)** X-Gal Färbung von unbehandelten und HTNCre-transduzierten *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Cre-Behandlung fixiert und gefärbt. Skalierung: 100  $\mu$ M.

Die Rekombinationseffizienz wurde durch eine X-Gal-Färbung bestimmt. Nach der Transduktion mit HTNCre wurden die ES-Zellen für weitere 48 Stunden kultiviert, anschließend fixiert und gefärbt (siehe Abb. C 12B). In nahezu allen ES-Zellkolonien wurde *lacZ* nach der Cre-Behandlung exprimiert.



**Abb. C 13: PCR-Analyse der *bmpr1a*-Deletion in ES-Zellen nach Cre-Transduktion.**

**(A)** Schematische Darstellung der PCR-Strategie zur Analyse des Rekombinationsereignisses: 1. Wildtypisches Allel (wt); 2. loxP-modifiziertes Allel (fl); 3. rekombiniertes Allel ( $\Delta$ ). In *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen ist das *bmpr1a*-Exon 2 mit loxP-Stellen flankiert und wird nach Rekombination durch Cre deletiert. Primer sind durch graue Pfeile symbolisiert. Mit dem Primer-Paar a-b wird nur das nicht-rekombinierte Allel erkannt. Mit dem Primer-Paar a-c wird vor Rekombination ein Fragment von 2300 bp (fl) bzw. 2230 bp (wt) und nach Rekombination eines von 180 bp amplifiziert.

**(B)** Sensitivität der loxP-spezifischen Primer. Eine konstante Menge an  $\Delta$ -DNA wurde mit abnehmenden Konzentrationen loxP-modifizierter DNA vermischt. Zur DNA-Präparation waren *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* und *bmpr1a $\Delta/\Delta$*  ES-Zellen Fibroblasten-frei kultiviert worden.

**(C)** Genotypische Analyse mit den Primer-Paaren a-b und a-c. Nach Cre-Transduktion wurden X-Gal positive *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellklone (+Cre) isoliert und auf Fibroblasten zur DNA-Präparation expandiert. Die DNA von unbehandelten *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen (-Cre) und Fibroblasten (wt) diente als Kontrolle. Die Abbildung zeigt ein exemplarisches Ergebnis.

**(D)** Genotypische Analyse der *bmpr1a $\Delta/\Delta$*  ES-Zellklone 3, 4, 5, 6 und 8. Die Klone waren nach der Transduktion mit HTNCre passagiert und für die DNA-Präparation Fibroblasten-frei kultiviert worden. Die Klone 3, 6 und 8 (mit einem roten Stern gekennzeichnet) wurden für weitere Analysen verwendet.

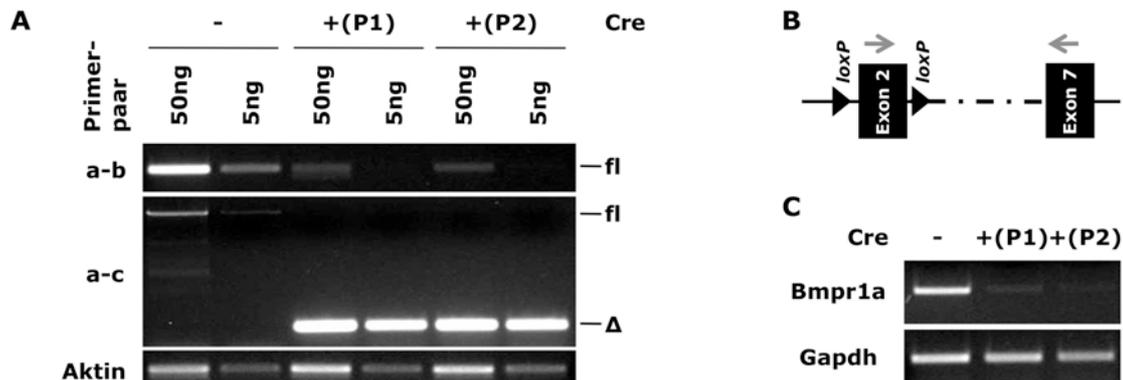
Das Rekombinationsereignis wurde zusätzlich direkt auf DNA-Ebene analysiert. Nach Cre-vermittelter Rekombination wird das Exon 2 ausgeschnitten, sodass eine trunkierte *bmpr1a*-Variante transkribiert wird. In Abbildung C 13A ist die Strategie der PCR schematisch dargestellt. Mit dem a-b *Primer*-Paar wird bei Verwendung von *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* DNA ein 230 bp großes Fragment und bei Verwendung von wildtypischer DNA ein 195 bp großes Fragment detektiert. *Primer a* bindet stromaufwärts der ersten loxP-Stelle, *Primer b* innerhalb des Exons 2 und damit nur an nicht-rekombinierte DNA. Das a-c *Primer*-Paar bindet stromabwärts und stromaufwärts der loxP-Stellen, die das Exon 2 flankieren. Es amplifiziert rekombinierte DNA ( $\Delta$ ) mit einer Größe von 180 bp. Die loxP-spezifische Bande (fl) hat in diesem Fall eine Größe von 2300 bp und die wildtypische Bande (wt) eine Größe von 2230 bp.

Zunächst wurde die Sensitivität der loxP-spezifischen PCR mit dem *Primer*-Paar a-b bestimmt. Dazu wurde eine konstante Menge *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* DNA mit absteigenden Konzentrationen *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* DNA vermischt (siehe Abb. C 13B). Die loxP-spezifische Bande war selbst bei der höchsten Verdünnung von 1:10000 schwach zu erkennen.

Anschließend wurde der *bmpr1a*-Genotyp mit dem  $\beta$ -Gal-Phänotyp der ES-Zellen abgeglichen. Hierzu wurden nach der Cre-Transduktion einzelne ES-Zellklone isoliert und zur DNA-Präparation expandiert. Die DNA von *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen und wildtypischen Fibroblasten diente als Kontrolle. Abbildung C 13C zeigt ein exemplarisches PCR-Ergebnis. Mit dem *Primer*-Paar a-b wurde für unbehandelte ES-Zellen eine Bande von 230 bp und für wildtypische Kontrollzellen eine Bande von 195 bp beobachtet. Auch in  $\beta$ -Gal-positiven ES-Zellklonen wurde lediglich ein wildtypisches Signal detektiert, das aus der Cokultur mit embryonalen Fibroblasten resultierte. Mit dem a-c *Primer*-Paar war für  $\beta$ -Gal-positive ES-Zellen das erwartete DNA-Fragment von 180 bp deutlich zu erkennen. Bei Verwendung von *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* Kontroll-DNA und dem a-c *Primer*-Paar betrug die Fragmentgröße 2300 bp. Die wildtypische Bande war in diesem Fall 2230 bp.

In Abbildung C 13D ist die PCR-Analyse von 5 verschiedenen  $\beta$ -Gal-positiven ES-Zellklonen dargestellt. Da die Klone für ihre Genotypisierung auf Gelatine ohne Cokultivierung mit Fibroblasten ausgesät worden waren, war in keinem Fall ein wildtypisches Signal erkennbar, wenn das *Primer*-Paar a-b verwendet wurde. Die

loxP-spezifische Bande war nur in unbehandelten ES-Zellen sichtbar. Mit dem a-c *Primer*-Paar wurde für jeden Klon die  $\Delta$ -spezifische Bande detektiert. Weitere Analysen wurden mit den Klonen  $\Delta 3$ ,  $\Delta 6$  und  $\Delta 8$  (mit roten Sternen gekennzeichnet) durchgeführt. Für diese Klone erfolgte die Analyse der *bmpr1a*-Deletion auf RNA-Ebene wie in Abb. C 19B dargestellt.



**Abb. C14: *Bmpr1a*-Inaktivierung auf polyklonaler Ebene.**

**(A)** Quantifizierung der Rekombinationseffizienz in der ersten (P1) und zweiten (P2) Passage nach Cre-Transduktion mit dem *Primer*-Paar a-b. Von jeder Probe wurden für die PCR 50 und 5 ng DNA eingesetzt. Das Rekombinationsereignis wurde mit dem *Primer*-Paar a-c qualitativ bestätigt. Identische DNA-Mengen wurden durch eine Aktin-PCR gewährleistet.

**(B)** Schematische Darstellung zur Analyse der Rekombinationseffizienz auf RNA-Ebene. Das *Primer*-Paar (graue Pfeile) bindet in Exon 2 und Exon 7. Da das loxP-flankierte Exon 2 nach erfolgreicher Cre-Transduktion deletiert wird, erkennen die *Primer* nur nicht-rekombinierte RNA.

**(C)** *Bmpr1a*-Expression in der ersten (P1) und zweiten (P2) Passage nach Cre-Transduktion. Gleiche RNA-Mengen wurden durch eine Gapdh-RT-PCR überprüft.

Um die Rekombinationseffizienz durch HTNCre auf DNA- und RNA-Ebene zu ermitteln, wurden *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen nach erfolgter Transduktion in N2B27-Medium überführt. Das Medium ermöglicht eine Fibroblasten-freie Kultivierung von ES-Zellen (Ying *et al.*, 2003b). Eventuelle Signale durch Fibroblasten wurden damit nach zweimaligem Passagieren ausgeschlossen.

Wie in Abbildung C 14A dargestellt, war mit dem *Primer*-Paar a-b in der ersten Passage nach Transduktion eine Rekombinationseffizienz von mehr als 90% erkennbar; das loxP-spezifische Signal war weniger intensiv als das der 1:10-Verdünnung von nicht rekombinierter DNA. Die Quantifizierung mit der ImageJ-Software ergab, dass das *bmpr1a*-Exon 2 in 94% der Zellen deletiert war. Der rekombinierte Prozentsatz blieb auch in der zweiten Passage nach Transduktion konstant. Die HNTCre-vermittelte Exzision von Exon 2 wurde mit dem *Primer*-Paar a-

c qualitativ bestätigt. In jedem Cre-behandelten Ansatz war die  $\Delta$ -spezifische Bande deutlich zu erkennen.

Die *bmpr1a*-Expression auf RNA-Ebene wurde mit *Primern* untersucht, die in Exon 2 und 7 binden und die trunkierte, rekombinierte Variante nicht amplifizieren (siehe Abb. C 14B). Ein funktioneller *bmpr1a* wurde anhand der Quantifizierung mit der ImageJ-Software sowohl in der 1. als auch in der 2. Passage nach Transduktion von nur 10% der ES-Zellen exprimiert. (siehe Abb. C 14C).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* ES-Zellklone aufgrund der hohen Sensitivität der PCR zur Erkennung loxP-modifizierter DNA (*Primer-Paar a-b*) eindeutig identifiziert werden können und die hohe Rekombinationseffizienz von HTNCre in *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen zu einer nahezu vollständig unterbundenen *bmpr1a*-Expression führt.

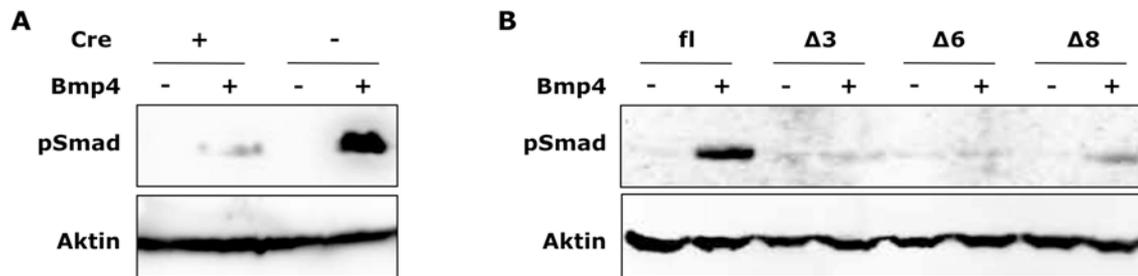
In dieser Arbeit sind Untersuchungen über den Verlust des *bmpr1a* auf polyklonaler und monoklonaler Ebene beschrieben. Damit diese voneinander unterschieden werden können, wird folgende Nomenklatur festgelegt: Bei polyklonalen Analysen werden die *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen als Cre-behandelt (+Cre) bzw. unbehandelt (-Cre) bezeichnet. Bei monoklonalen Analysen werden die Cre-behandelten ES-Zellen *bmpr1a* deletiert (*bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* oder  $\Delta$ ) genannt. Unbehandelte ES-Zellen haben in diesem Fall die Benennung loxP-modifiziert (fl) bzw. *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>*.

## **C 2.2           Blockierung der Smad-Phosphorylierung in ES-Zellen nach *bmpr1a*-Inaktivierung**

Im nächsten Schritt wurden Effekte auf die Bmp-Signaltransduktion in *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen anhand ihrer Fähigkeit zur Smad1/5/8-Aktivierung untersucht. Smad-Transkriptionsfaktoren sind die Haupteffektoren in der Bmp-vermittelten Signalweiterleitung (Shi & Massagué, 2003).

Die ES-Zellen wurden Fibroblasten-frei in N2B27-Medium kultiviert. Dem Medium wurde zur Pluripotenzerhaltung der ES-Zellen Lif und Bmp4 zugesetzt (Ying *et al.*, 2003b). Um die Smad-Phosphorylierung zu analysieren, wurden die ES-Zellen 48 Stunden in Abwesenheit von Bmp4 kultiviert und dann für 15 Minuten mit Bmp4

stimuliert. Die Smad-Aktivierung wurde durch Western Blot mit einem Antikörper, der die Serin-phosphorylierten Formen von Smad1/5/8 erkennt, untersucht.



**Abb. C 15: Hemmung der Smad-Phosphorylierung nach Inaktivierung von *bmpr1a*.**

Die *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* und mutanten ES-Zellen wurden in N2B27-Medium für 48 Stunden ohne Bmp4 kultiviert. Dann wurden sie 15 Minuten mit Bmp4 stimuliert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Für den Western Blot wurde das Lysat von 150000 Zellen verwendet. Die Smad1/5/8-Aktivierung wurde mit einem phospho-spezifischen Antikörper (pSmad) untersucht. Die Auftragung von übereinstimmenden Proteinmengen wurde durch einen Aktin-spezifischen Antikörper gewährleistet.

**(A)** Polyklonale Analyse. Die Zellen wurden für 16 Stunden mit 2  $\mu$ M HTNCre in N2B27-Medium transduziert. Die Proteine wurden eine Passage nach Transduktion präpariert.

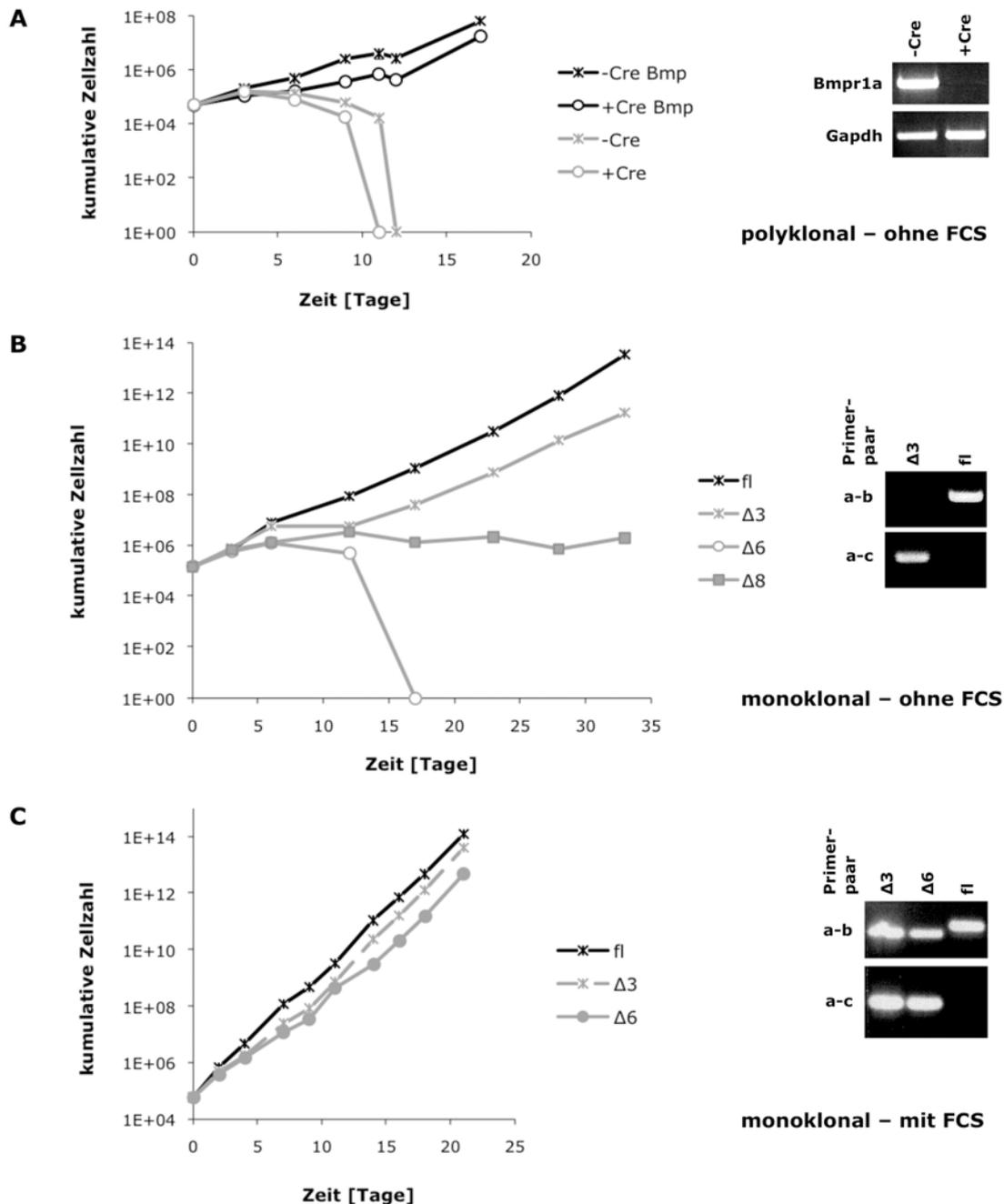
**(B)** Monoklonale Analyse von *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* Klonen ( $\Delta$ 3,  $\Delta$ 6,  $\Delta$ 8) und *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen.

Die Inkubation mit Bmp4 führte in *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen zu einer erhöhten Phosphorylierung von Smad1/5/8 (siehe Abb. C 15A und B). Diese war in Cre-transduzierten *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen nach Bmp4-Behandlung weitaus geringer (siehe Abb. C 15A). Um das Ergebnis der polyklonalen Proben auf monoklonaler Ebene zu bestätigen, wurde die Bmp4-abhängige Smad-Aktivierung von drei verschiedenen *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* ES-Zellklonen ( $\Delta$ 3,  $\Delta$ 6 und  $\Delta$ 8) analysiert. Auch in diesem Fall konnte Bmp4 keine bzw. nur eine minimale Smad-Aktivierung bewirken (siehe Abb. C 15B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der *bmpr1a* der essentielle Typ I Rezeptor für die Smad-abhängige Bmp-Signaltransduktion in ES-Zellen ist.

### C 2.3 Verminderte Proliferation von *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen

Die uneingeschränkte Kultivierung von ES-Zellen ist unter Fibroblasten- und FCS-unabhängigen Bedingungen nur möglich, wenn das Medium Lif und Bmp4 beinhaltet. (Ying *et al.*, 2003b). Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern der Bmpr1a für die Proliferation und Aufrechterhaltung der Pluripotenz von ES-Zellen benötigt wird.

Hierzu wurde das Wachstumsverhalten von *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen über mehrere Passagen analysiert und mit dem von *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen verglichen.



**Abb. C 16: Eingeschränktes Proliferationspotential von ES-Zellen nach *bmpr1a*-Deletion.**

Die kumulativen Zellzahlen wurden unter subkonfluenten Bedingungen ermittelt. *Bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen (als fl oder -Cre bezeichnet) dienen zur Kontrolle.

**(A)** Polyklonale Analyse. 4 Tage nach der Cre-Transduktion (+Cre) wurden die Zellen in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 überführt und nach einem weiteren Tag mit definierter Dichte und Zugabe von Lif (-Cre; +Cre) oder Lif und Bmp4 (-Cre Bmp; +Cre Bmp) neu ausgesät. Die RT-PCR-Analyse zeigt die *bmpr1a*-Expression nach der finalen Zellzahlbestimmung bei Kultivierung mit Lif und Bmp4.

**(B)** Monoklonale Analyse der *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* Klone Δ3, Δ6 und Δ8 in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4. Nach der finalen Zellzahlbestimmung wurde die *bmpr1a*-Deletion des Δ3-Klons anhand einer PCR-Analyse überprüft.

**(C)** Monoklonale Analyse der *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* Klone Δ3 und Δ6 in ES-Zellmedium mit Lif und FCS bei Kokultur von Fibroblasten. Die PCR-Analyse wurde nach der finalen Zellzahlbestimmung durchgeführt.

In einem polyklonalen Ansatz wurden *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen 4 Tage nach erfolgter Cre-Transduktion in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 überführt. Einen Tag später wurden die Zellen mit definierter Dichte neu ausgesät und mit Lif bzw. Lif und Bmp4 kultiviert. Unbehandelte *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen dienten zur Kontrolle. Die kumulative Zellzahl wurde ab der 1. Passage in N2B27-Medium unter subkonfluenten Bedingungen bestimmt (siehe Abb. C 16A). Eine dauerhafte ES-Zellkultivierung war ohne Bmp4 nicht möglich. Sowohl Kontroll- als auch *bmpr1a*-mutante ES-Zellen ließen sich ab der 3. Passage nicht weiter expandieren, wobei die Proliferationsdefizienz der *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen stärker ausgeprägt war. Ihre kumulative Zellzahl war in der 2. Passage 50% und in der 3. Passage 75% geringer als die der Kontrollzellen. *Bmpr1a*-mutante Zellen waren in der 4. Passage ohne Bmp4 und Kontrollzellen in der 5. Passage nicht mehr detektierbar. Bei Zugabe von Bmp4 proliferierten auch *bmpr1a*-mutante ES-Zellen, allerdings bis zur 3. Passage in geringerem Ausmaß als *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen. Daraus resultierte, dass die kumulative Zellzahl der Kontrollzellen im Durchschnitt 80% größer war als die der *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen. Eine RT-PCR-Analyse ergab, dass die Expression des *bmpr1a* auch nach siebenmaligem Passagieren kaum erkennbar war.

Das lediglich eingeschränkte Proliferationspotential der *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen ließ vermuten, dass das Bmp4-Signal auch unabhängig von einem funktionellen *bmpr1a* weitergeleitet werden kann.

Um sicherzustellen, dass die Proliferationsfähigkeit der *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 nicht durch residuale loxP-modifizierte ES-Zellen verursacht wurde, erfolgte die Wachstumsanalyse in einem monoklonalen Ansatz mit den *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* ES-Zellklonen Δ3, Δ6 und Δ8. Die Δ-Klone und *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* Kontroll-ES-Zellen wurden mit definierter Dichte in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 überführt, um die kumulative Zellzahl für bis zu 7 Passagen unter subkonfluenten Bedingungen zu ermitteln (siehe Abb. C 16B). Dabei wurden Unterschiede im Proliferationsverhalten der Δ-Klone ersichtlich. Die Wachstumsfähigkeit von Klon Δ6 war mit der von ES-Zellen in N2B27-Medium ohne Bmp4 vergleichbar. Die Δ6-ES-Zellen ließen sich über 4 Passagen nicht weiter expandieren. In der 5. Passage waren keine vitalen Zellen detektierbar, sodass eine dauerhafte Kultivierung unmöglich war. Der Δ8-Klon konnte zwar für 33 Tage in

Kultur gehalten werden, allerdings ohne jegliche Vergrößerung der Gesamtzellzahl. Mit dem  $\Delta 3$ -Klon wurden ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten erzielt wie mit den polyklonal *bmpr1a*-deletierten ES-Zellen bei Anwesenheit von Bmp4. Auch  $\Delta 3$ -ES-Zellen proliferierten weniger schnell als *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen. Ihre kumulative Zellzahl betrug nach 12 Tagen 6% und nach 33 Tagen 0,3% von der Gesamtzellzahl der Kontroll-ES-Zellen. Grundsätzlich war jedoch eine Expansion des  $\Delta 3$ -Klons in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 durchführbar. Mit Hilfe einer PCR-Analyse wurde die vollständige *bmpr1a*-Deletion des  $\Delta 3$ -Klons nach 33 Tagen Kultivierung bestätigt.

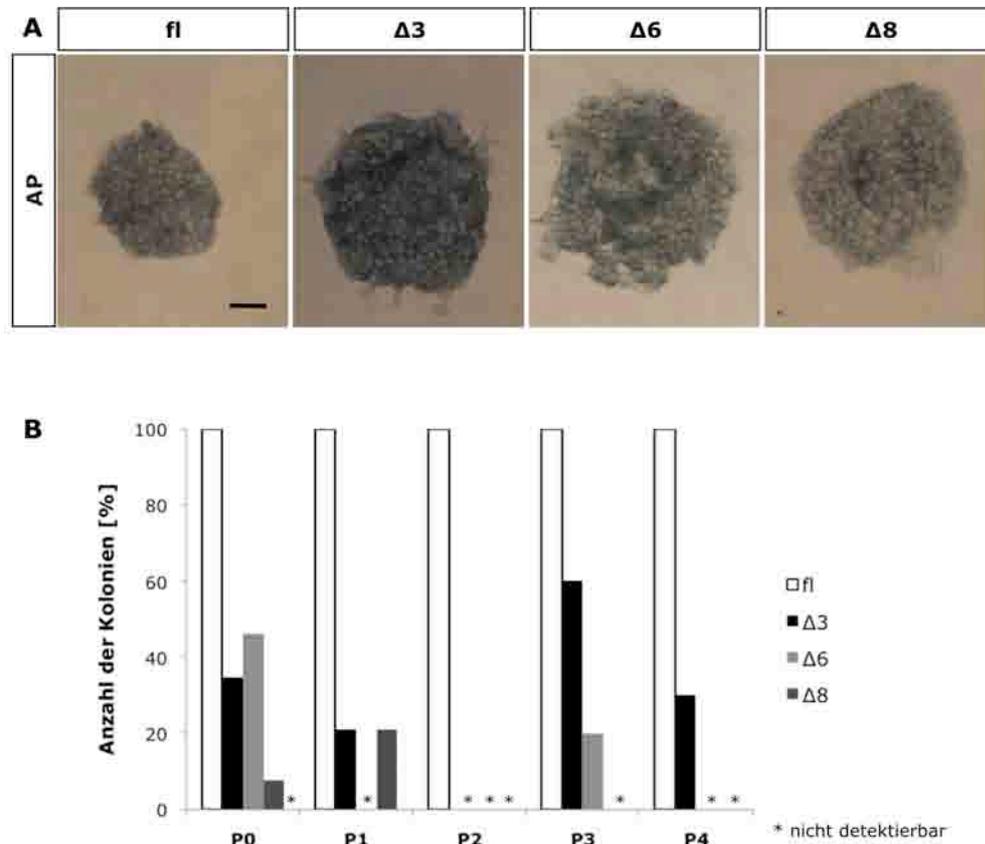
Das Proliferationspotential der beiden *bmpr1a*-defizienten Klone  $\Delta 3$  und  $\Delta 6$  wurde zusätzlich unter Standard-ES-Zellbedingungen, in FCS-haltigem ES-Medium mit Fibroblastencokultur, untersucht. In diesem Fall konnten auch  $\Delta 6$ -ES-Zellen expandiert werden. Das Verhältnis der Gesamtzellzahlen zueinander blieb jedoch unverändert: fl >  $\Delta 3$  >  $\Delta 6$ . Die kumulative Anzahl der  $\Delta 3$ -ES-Zellen war durchschnittlich um 80% und die der  $\Delta 6$ -ES-Zellen um 94% geringer als die der *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen (siehe Abb. C 16 C). Die komplette *bmpr1a*-Deletion des  $\Delta 3$ - und  $\Delta 6$ -Klons konnte auch nach 21 Tagen Kultivierung anhand einer PCR-Analyse nachgewiesen werden.

#### **C 2.4 Geringere Klonogenität von *bmpr1a*-defizienten ES-Zellen**

Um zu überprüfen, ob das verminderte Proliferationspotential der *bmpr1a*-defizienten ES-Zellklone auch mit einer erniedrigten Klonogenität einherging, wurden die ES-Zellklone  $\Delta 3$ ,  $\Delta 6$  und  $\Delta 8$  sowie *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen über 4 Passagen mit klonaler Dichte in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 ausgesät und nach 6 Tagen Kultivierung auf AP-Aktivität gefärbt. Die ES-Zellen wurden gleichzeitig unter subkonfluenten Bedingungen kultiviert und dienten als Pool für die klonale Analyse. Nur so konnte gewährleistet werden, dass genügend Zellen für die Untersuchung auf klonaler Ebene zur Verfügung standen.

Die Deletion des *bmpr1a* konnte über 4 Passagen keine Reduktion der Koloniegröße verursachen. Dies ist in Abb. C 17A für AP-gefärbte ES-Zellklone nach dem direkten Überführen in N2B27-Medium gezeigt. Auch die AP-Aktivität erschien nahezu unverändert. Allerdings waren die Randbereiche von  $\Delta$ -Kolonien weniger definiert

und enthielten ungefärbte oder schwach gefärbte Zellen, die auf eine Differenzierung hindeuten könnten.



**Abb. C 17 : Geringeres Selbsterneuerungspotential von ES-Zellen mit inaktiviertem *bmpr1a*.**

*Bmpr1a*<sup>fl/fl</sup> ES-Zellen (fl) und die *bmpr1a*-defizienten ES-Zellklone Δ3, Δ6 und Δ8 wurden mit klonaler Dichte (10 Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät. Nach 6 Tagen wurden sie auf AP- (alkalische Phosphatase-) Aktivität gefärbt. Die Analyse erfolgte über 4 Passagen (P0 bis P4) in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4.

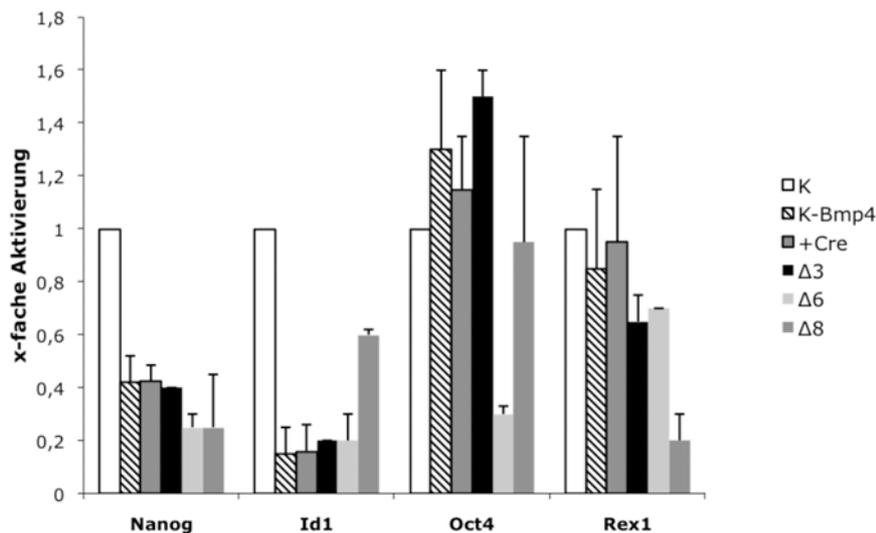
**(A)** AP-Färbung von ES-Zellen, die in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 überführt worden waren (P0). Die Zellen wurden für 6 Tage kultiviert und anschließend fixiert. Skalierung: 50μM.

**(B)** Quantifizierung der Koloniezahlen der Δ-Klone relativ zu fl-ES-Zellen (100%).

Die Klonogenität nahm bei allen drei Δ-Klonen ab (siehe Abb. C 17B). Nur nach dem direkten Überführen in N2B27-Medium (P0) konnten sich alle *bmpr1a* Δ-ES-Zellklone selbst erneuern, wobei die Anzahl der Kolonien im Vergleich zu Kontrollzellen mindestens 50% geringer war. Nach zweimaligem Passagieren wurden von keinem *bmpr1a*-Δ-Klon Tochterkolonien generiert. Insgesamt war das Selbsterneuerungspotenzial von Δ3 am besten. In der 3. Passage betrug die Anzahl der Kolonien im Vergleich zu Kontrollzellen 60% und in der 4. Passage wurden nur aus dem Δ3-Klon und *bmpr1a*<sup>fl/fl</sup> ES-Zellen Tochterkolonien generiert.

## C 2.5 Effekte auf Pluripotenz-assoziierte Gene durch Verlust von *bmpr1a*

Das verminderte Selbsterneuerungspotential von *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen trotz Zugabe von Bmp4 ließ vermuten, dass Pluripotenzmarker im Vergleich zu Kontroll-ES-Zellen differenziell exprimiert werden. Um eine möglichst genaue Quantifizierung der Expression von Pluripotenzmarkern zu erhalten, wurde für diese Untersuchung die Methodik der *real time* PCR verwendet.



**Abb. C 18: Aktivität von Pluripotenz-assoziierten Genen in *bmpr1a*-defizienten ES-Zellen.**

In einem polyklonalen Ansatz wurden *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen nach ihrer Cre-Transduktion (+Cre) in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 überführt. Die RNA wurde präpariert nachdem die transduzierten und Kontroll-behandelten ES-Zellen (K) für eine weitere Passage kultiviert worden waren. Für die monoklonale Analyse der *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* Klone Δ3, Δ6 und Δ8 wurde die RNA eine Passage nach dem Überführen in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 präpariert. Als Negativkontrolle dienen *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen, die für 24 Stunden ohne Bmp4 gehalten wurden (K-BMP4). Die Standardfehler ergaben sich aus zwei unabhängigen Experimenten im Triplikat. Die Abbildung zeigt die Analyse der Pluripotenzmarker *nanog*, *id1* (*Inhibitor of differentiation / DNA binding 1*), *oct4* (*Octamer 4*) und *rex1*.

Für die polyklonale Analyse waren *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen 3 Tage nach der Cre-Transduktion in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 überführt worden. Die Cre-behandelten Zellen und Kontroll-ES-Zellen wurden für eine weitere Passage kultiviert bevor ihre RNA präpariert wurde. Zur Auswertung auf monoklonaler Ebene wurde die RNA der Δ-Klone und *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen eine Passage nach ihrem Überführen in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 präpariert. Als Negativkontrolle wurden *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen für 24 Stunden ohne Bmp4 kultiviert.

In Abbildung C 18 sind die Ergebnisse der *real time* PCR zusammengefasst. Eine verminderte Aktivität der Pluripotenzfaktoren *oct4* (Nichols *et al.*, 1998) und *rex1* (Rogers *et al.*, 1991) war nur für einzelne  $\Delta$ -Klone (6 bzw. 8) zu beobachten und somit nicht auf den defekten *bmpr1a* zurückzuführen. In Bezug auf *nanog* (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003) und *id1* (Hollnagel *et al.*, 1999) wurden Expressionsdifferenzen erkennbar, die eindeutig mit der Inaktivierung von *bmpr1a* korrelierten. Beide Gene wurden nach polyklonaler- und monoklonaler *bmpr1a*-Deletion sowie bei Entzug von Bmp4 schwächer exprimiert als in *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen.

## **C 2.6            Unveränderte Expression weiterer *bmp*-Rezeptoren in ES-Zellen mit inaktiviertem *bmpr1a***

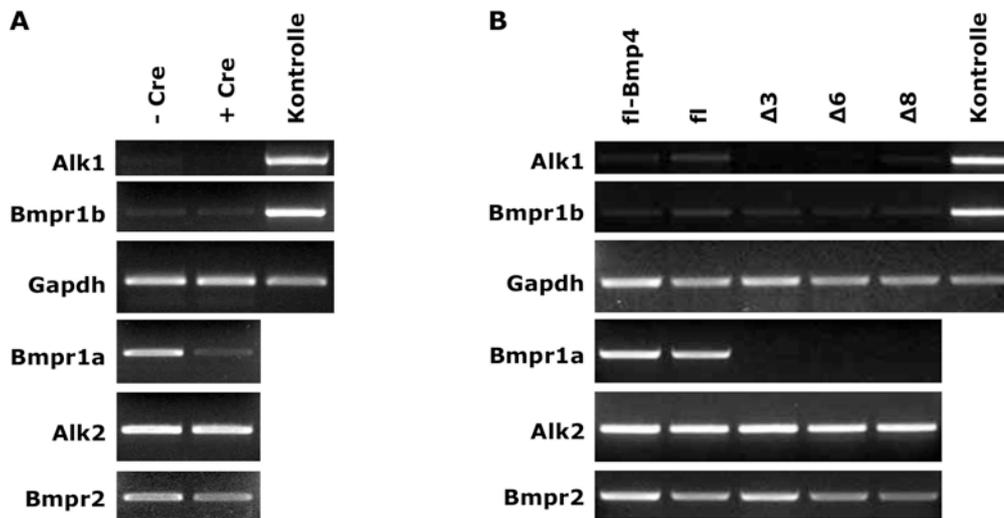
Da das Fehlen von Bmp4 gravierendere Folgen für die Proliferationsfähigkeit der ES-Zellen hatte als ein inaktivierter *bmpr1a* und die Klonogenität der *bmpr1a*-defizienten ES-Zellen nicht vollständig aufgehoben war, wurde die Expression weiterer *bmp*-Rezeptoren untersucht. Die RNA wurde wie in C 2.5 beschrieben präpariert.

Abbildung C 19A zeigt das Ergebnis der polyklonalen Analyse. In Cre-transduzierten *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen war der *bmpr1a* kaum detektierbar. Die Expression der Typ I Rezeptoren *bmpr1b* und *alk1* blieb minimal bzw. fehlend. Allerdings wurden *alk2* und *bmpr2* in *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen mit der gleichen Intensität wie in Kontroll-ES-Zellen exprimiert.

Auf monoklonaler Ebene (siehe Abb. C 19B) fand keine *bmpr1a*-Expression statt. Die Typ I Rezeptoren *alk1* und *bmpr1b* wurden, wie für die polyklonale Analyse gezeigt, nicht bzw. minimal exprimiert. Auch in den *bmpr1a*-defizienten Klonen  $\Delta 3$ ,  $\Delta 6$  und  $\Delta 8$  blieben die *alk2*- und *bmpr2*-spezifischen Signale stabil. Als Negativkontrolle wurden *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen für 24 Stunden ohne Bmp4 kultiviert. Dies hatte keinen Einfluss auf die Intensität der Rezeptor-spezifischen Banden.

Damit stand sowohl für die mono- als auch polyklonale Deletion des *bmpr1a* ein alternatives funktionelles Rezeptorpaar bestehend aus einem Typ I Rezeptor (*alk2*)

und einem Typ II Rezeptor (*bmpr2*) für die Bmp4-vermittelte Signaltransduktion zur Verfügung.



**Abb. C 19: Unveränderte Expression weiterer *bmp*-Rezeptoren in *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen.**

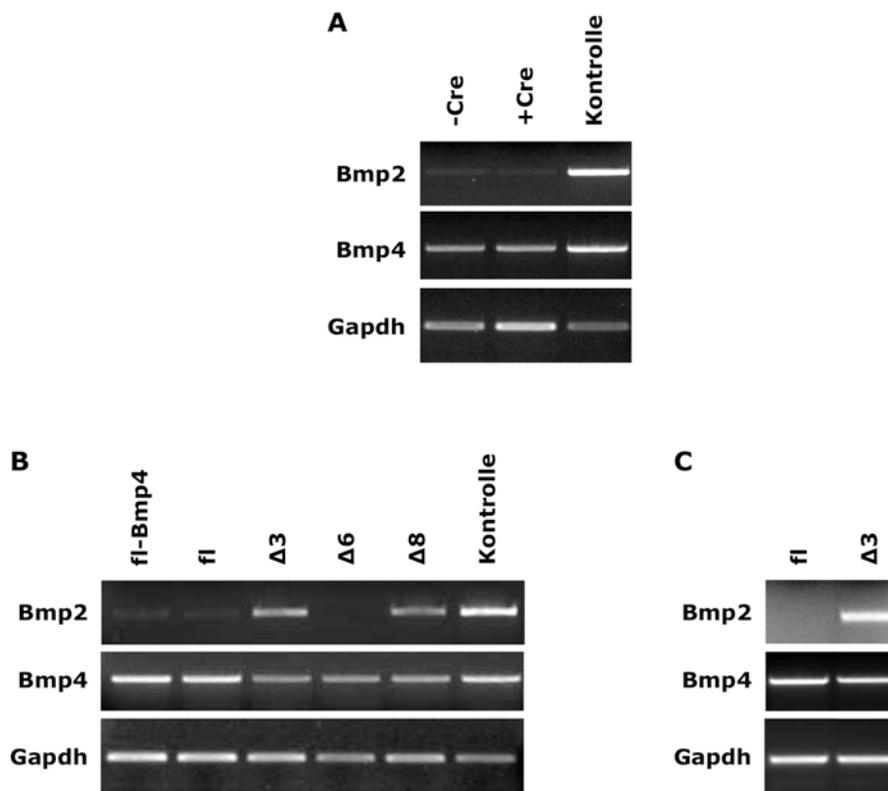
**(A)** In einem polyklonalen Ansatz wurden *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen nach ihrer Cre-Transduktion (+Cre) in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 überführt. Die RNA wurde präpariert nachdem die transduzierten und Kontroll-behandelten ES-Zellen (-Cre) für eine weitere Passage kultiviert worden waren.

**(B)** Monoklonale Analyse der *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* Klone Δ3, Δ6 und Δ8. Die RNA wurde eine Passage nach dem Überführen in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 präpariert. Als Negativkontrolle dienten *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen, die für 24 Stunden ohne Bmp4 gehalten wurden (fl-Bmp4). Alk1/2: Activin receptor like kinase 1/2; Gapdh: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Ladekontrolle).

## C 2.7 Regulierung der *bmp*-Expression nach Inaktivierung von *bmpr1a*

Die verstärkte *bmp4*-Expression von Fibroblasten fördert die Selbsterneuerung von ES-Zellen (Qi *et al.*, 2004). Um Ursachen für das differenzielle Verhalten der *bmpr1a*-defizienten Klone in Bezug auf Klonogenität und Proliferationsfähigkeit zu eruieren, wurde ihre *bmp2*- und *bmp4*-Expression untersucht und mit der *bmp*-Expression auf polyklonaler Ebene verglichen. Beide Liganden binden an die Typ I Rezeptoren Bmpr1a, Bmpr1b und Alk2 (Miyazono & Miyazawa, 2002).

Die RNA-Präparation erfolgte wie in C 2.5 beschrieben. Die Deletion von *bmpr1a* im polyklonalen Ansatz brachte keine Veränderung in der Expression von *bmp2* und *bmp4* (siehe Abb. C 20A).



**Abb. C 20: Effekte auf die *bmp2*- und *bmp4*-Expression nach der Inaktivierung von *bmpr1a*.**

**(A)** In einem polyklonalen Ansatz wurden *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen nach ihrer Cre-Transduktion (+Cre) in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 überführt. Die RNA wurde präpariert nachdem die transduzierten und Kontroll-behandelten ES-Zellen (-Cre) für eine weitere Passage kultiviert worden waren.

**(B)** Monoklonale Analyse der *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* Klone Δ3, Δ6 und Δ8. Die RNA wurde eine Passage nach dem Überführen in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 präpariert. Als Negativkontrolle dienten *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* (fl) ES-Zellen, die für 24 Stunden ohne Bmp4 gehalten wurden (fl-Bmp4).

**(C)** RT-PCR-Analyse von Δ3 nach 3 Passagen in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4.

Gapdh: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Ladekontrolle).

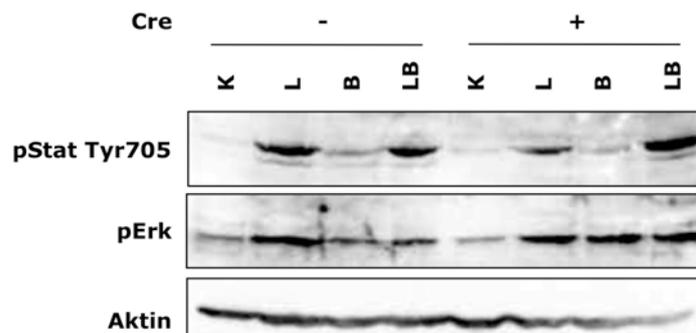
Auf monoklonaler Ebene wurden dagegen Unterschiede sichtbar (siehe Abb. C 20B). Im Vergleich zu *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* Kontroll-ES-Zellen wurde in allen Δ-Klonen ca. 50% weniger *bmp4* exprimiert. Während in Kontroll- und Δ6-ES-Zellen nur ein sehr schwaches bzw. kein *bmp2*-Signal detektiert wurde, war in Δ3- und Δ8-ES-Zellen eine *bmp2*-Hochregulierung zu beobachten. Diese korrelierte mit dem Proliferationspotential der *bmpr1a*-defizienten ES-Zellen (siehe C 2.3). Nach drei Passagen in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 blieb die verstärkte Expression von *bmp2* bei Δ3 bestehen. Auch die Expression von *bmp4* war nun auf dem gleichen Niveau wie in Kontroll-ES-Zellen (siehe Abb. C 20C).

## C 2.8 Aktivierung von Stat3 und Erk in *bmpr1a* mutanten ES-Zellen

Der selbsterneuernde Einfluss von Lif wird über den Transkriptionsfaktor Stat3 vermittelt (Matsuda *et al.*, 1999; Niwa *et al.*, 1998). Im Folgenden wurde überprüft, inwiefern der Bmp-Signalweg mit der Lif/Stat3-Kaskade kommuniziert und ob die *bmpr1a*-Deletion in ES-Zellen mit einer veränderten Stat3-Aktivierung verbunden ist.

Hierzu wurden die ES-Zellen für 24 Stunden in N2B27-Medium ohne Lif und Bmp4 kultiviert und dann für 15 Minuten mit Lif, Bmp4 oder Lif und Bmp4 stimuliert. Die Stat3-Aktivierung wurde mit Hilfe eines Western Blots nachgewiesen.

In unbehandelten *bmpr1a<sup>f/f</sup>* ES-Zellen konnte Bmp4 keine Stat3-Aktivierung bewirken. Dagegen führte die Behandlung mit Lif genauso wie die gleichzeitige Inkubation mit Lif und Bmp4 zu einer verstärkten Phosphorylierung von Stat3. Auch die *bmpr1a*-Inaktivierung spielte für die Stat3-Aktivierung keine Rolle. Nach Inkubation mit Bmp4 blieb die Stat3-Phosphorylierung in Cre-behandelten *bmpr1a<sup>f/f</sup>* ES-Zellen unverändert. Die Inkubation mit Lif oder Lif und Bmp4 führte jedoch zu einer erhöhten Stat3-Phosphorylierung (siehe Abb. C 21). Damit konnten keine Bmp4-abhängigen Einflüsse auf den Lif/Stat3-Signalweg nachgewiesen werden.



**Abb. C 21: Stat- und Erk-Phosphorylierung in *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen.**

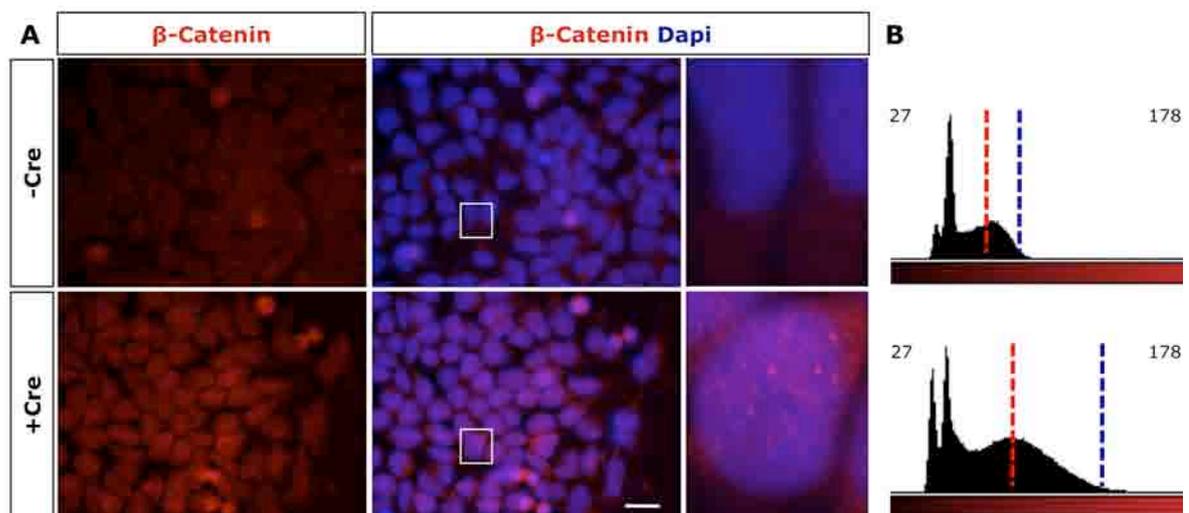
*Bmpr1a<sup>f/f</sup>* ES-Zellen wurden direkt nach ihrer Cre-Transduktion (+Cre) in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 überführt. Zwei Tage später wurden sie erneut passagiert und in N2B27-Medium ohne Lif und Bmp4 neu ausgesät. Nach 24 Stunden wurden sie für 15 Minuten mit Lif (L), Bmp4 (B), oder Lif und Bmp4 (LB) inkubiert. Ein Ansatz (K) blieb unbehandelt. *Bmpr1a<sup>f/f</sup>* ES-Zellen (-Cre) dienen zur Kontrolle. Alle Ansätze wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Für den Western Blot wurde das Lysat von 260000 Zellen verwendet. Die Stat- bzw. Erk-Aktivierung wurde mit phospho-spezifischen Antikörpern (pStat Tyr 705, pErk) nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente ein Aktin-spezifischer Antikörper.

Weiterhin wurde berichtet, dass Bmp4 in Anwesenheit von Serum zu einer Inhibition der Erk Mapk führt und damit die Differenzierung von ES-Zellen inhibiert (Qi *et al.*, 2004). Auch unter Serum-freien Bedingungen scheint Bmp4 die Erk-Aktivierung

marginal vermindern zu können (siehe Abb. C 21). In *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen war die pErk-spezifische Bande bei Behandlung mit Bmp4 oder Lif und Bmp4 etwas schwächer als bei Behandlung mit Lif. Nach Cre-Behandlung waren jedoch keine Unterschiede sichtbar. Im Vergleich zum unstimulierten Ansatz war die pErk-Intensität bei Lif-, Bmp4- oder Lif und Bmp4-Behandlung gleichstark erhöht.

### C 2.9 Verstärkte $\beta$ -Catenin-Expression in *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen

Das nicht vollständig aufgehobene Proliferationspotential von *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen unter Serum-freien Bedingungen könnte durch die Expression alternativer Typ I Bmp-Rezeptoren und die damit verbundenen, bislang unbekanntes kompensatorischen Effekte erklärt werden. Alternativ könnte der *bmpr1a*-Defekt in ES-Zellen einer Proliferationsdefizienz entgegenwirken. Die Selbsterneuerung von Stammzellen des Darms wird durch den Bmp-Signaltransduktionsweg inhibiert. Hier kann die Bmp-vermittelte Hemmung von  $\beta$ -Catenin bei einem defekten Bmpr1a nicht weiter aufrechterhalten werden, was zu einer verstärkten Proliferation führt (He *et al.*, 2004).



**Abb. C 22: Verstärkte Expression von  $\beta$ -Catenin nach *bmpr1a*-Inaktivierung.**

**(A)** *Bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen wurden drei Tage nach der Cre-Transduktion (+Cre) in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 überführt. Nach einer weiteren Passage wurden sie fixiert und auf  $\beta$ -Catenin-Aktivität gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Unbehandelte *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen (-Cre) dienen zur Kontrolle. Skalierung: 100 $\mu$ M.

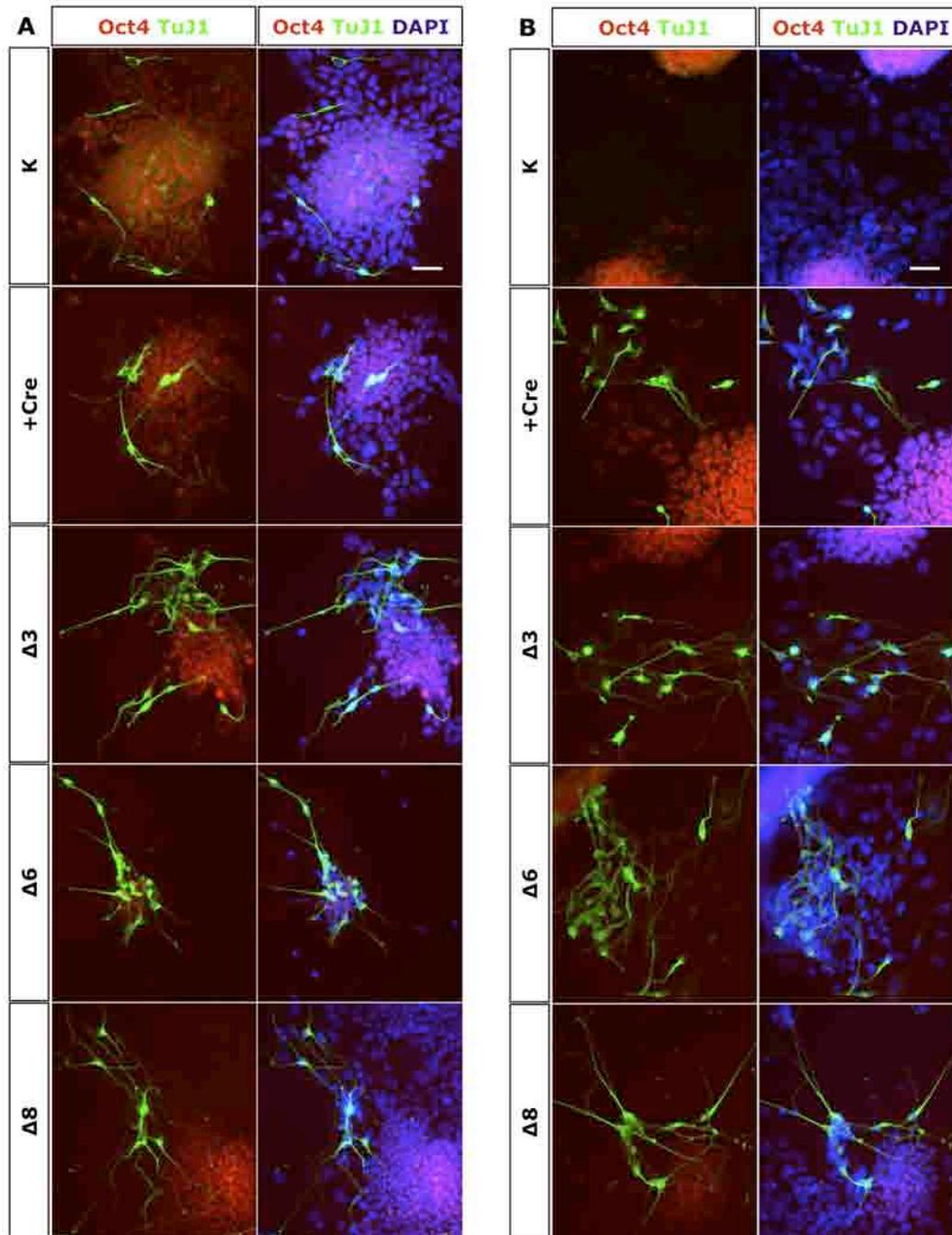
**(B)** Histogramm der Fluoreszenzaufnahmen. Die rot gestrichelten Linien verdeutlichen die jeweiligen Tonwertpeaks. Die blau gestrichelten Linien zeigen den maximalen Tonwert.

Daher wurde die  $\beta$ -Catenin-Expression in *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen überprüft. Hierzu wurden *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen nach der Cre-Transduktion in N2B27-Medium mit Lif und Bmp4 überführt. Die Zellen wurden fixiert und auf  $\beta$ -Catenin-Expression gefärbt, nachdem sie ein weiteres Mal passagiert worden waren. Wie aus Abbildung C 22A ersichtlich wird, war die Intensität der  $\beta$ -Catenin-Färbung in *bmpr1a*-defizienten ES-Zellen stärker als in Kontroll-ES-Zellen. Dies zeigen auch die entsprechenden Histogramme (siehe Abb. C 22B). Sowohl der durchschnittliche als auch der maximale Pixelwert war in Cre-transduzierten ES-Zellen größer. Die Überlagerung von Dapi- und  $\beta$ -Catenin-Färbung deutete zudem darauf hin, dass die  $\beta$ -Catenin-Expression im Nukleus von *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen verstärkt war (siehe Abb. C 22A, rechts). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die  $\beta$ -Catenin-Aktivität in ES-Zellen nach Deletion des *bmpr1a* gesteigert wird.

### **C 2.10      Inhibition der neuralen Differenzierung von ES-Zellen durch Bmpr1a**

Im Rahmen der Klonogenitätsanalyse deutete die AP-Färbung der *bmpr1a*-defizienten ES-Zellklone auf eine verstärkte Differenzierung hin, vor allem in Randbereichen der Kolonien (siehe Abb. C 17A). Auch die verminderte Proliferationsfähigkeit der *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen könnte durch eine erhöhte Differenzierungsrate verursacht worden sein. Da die Inhibition der neuralen Differenzierung von ES-Zellen unter Serum-freien Bedingungen abhängig von einer Bmp-induzierten Smad-Aktivierung ist (Ying *et al.*, 2003b) und die Bmp4-abhängige Smad-Aktivierung in *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen fast vollständig unterblieb (siehe Abb. C 15), wurden *bmpr1a*-defiziente ES-Zellen auf eine neurale Differenzierung untersucht.

Hierzu wurden die ES-Zellen für 6 Tage in N2B27-Medium mit Lif bzw. Lif und Bmp4 kultiviert. Undifferenzierte Zellen wurden mit einem Oct4-Antikörper und Neurone mit einem TuJ1-Antikörper, der an das intrazelluläre Klasse III  $\beta$ -Tubulin bindet (Lee *et al.*, 1990), detektiert (siehe Abb. C 23).



**Abb. C 23: Inhibierung der neuralen Differenzierung von ES-Zellen durch Bmpr1a.**

Die ES-Zellen wurden in N2B27-Medium überführt, mit 3500 Zellen/cm<sup>2</sup> neu ausgesät, für 6 Tage mit **(A)** Lif oder **(B)** Lif und Bmp4 kultiviert und fixiert. Neurone wurden mit einem Antikörper für TuJ1, undifferenzierte Zellen mit einem Oct4-Antikörper nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. *Bmpr1a*<sup>fl/fl</sup> ES-Zellen (K) dienten als Kontrolle. In einem polyklonalen Ansatz (+Cre) wurden *bmpr1a*<sup>fl/fl</sup> ES-Zellen vor ihrem Überführen in N2B27-Medium mit 2μM HTNCre für 16 Stunden transduziert. Auf monoklonaler Ebene wurden drei *bmpr1a*<sup>Δ/Δ</sup> Klone (Δ3, Δ6, Δ8) untersucht. Skalierung: 50μM.

Bei Kultivierung mit Lif und Bmp4 exprimierten *bmpr1a*<sup>fl/fl</sup> Kontrollzellkolonien in größten Teilen Oct4. In Randbereichen wurden Oct4-negative, differenzierte Zellen detektiert. Diese differenzierten Zellen konnten in keinem Fall als TuJ1-positive

Neurone identifiziert werden. Auch nach Entzug von Bmp4 wurde in Kontroll-ES-Zellkolonien und *bmpr1a*-mutanten ES-Zellkolonien Oct4-Expression nachgewiesen. Allerdings wurden bei Bmp4-Abwesenheit zusätzlich TuJ1-positive Neurone sichtbar.

In *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen konnte die neurale Differenzierung trotz Bmp4-Zugabe nicht verhindert werden. Sowohl die *bmpr1a*-defizienten ES-Zellklone  $\Delta 3$ ,  $\Delta 6$  und  $\Delta 8$  als auch Cre-transduzierte *bmpr1a<sup>f/f</sup>* ES-Zellen differenzierten in  $\beta$ -Tubulin-positive Neurone. Oct4-positive Zellen innerhalb der Kolonien blieben weiterhin erkennbar.

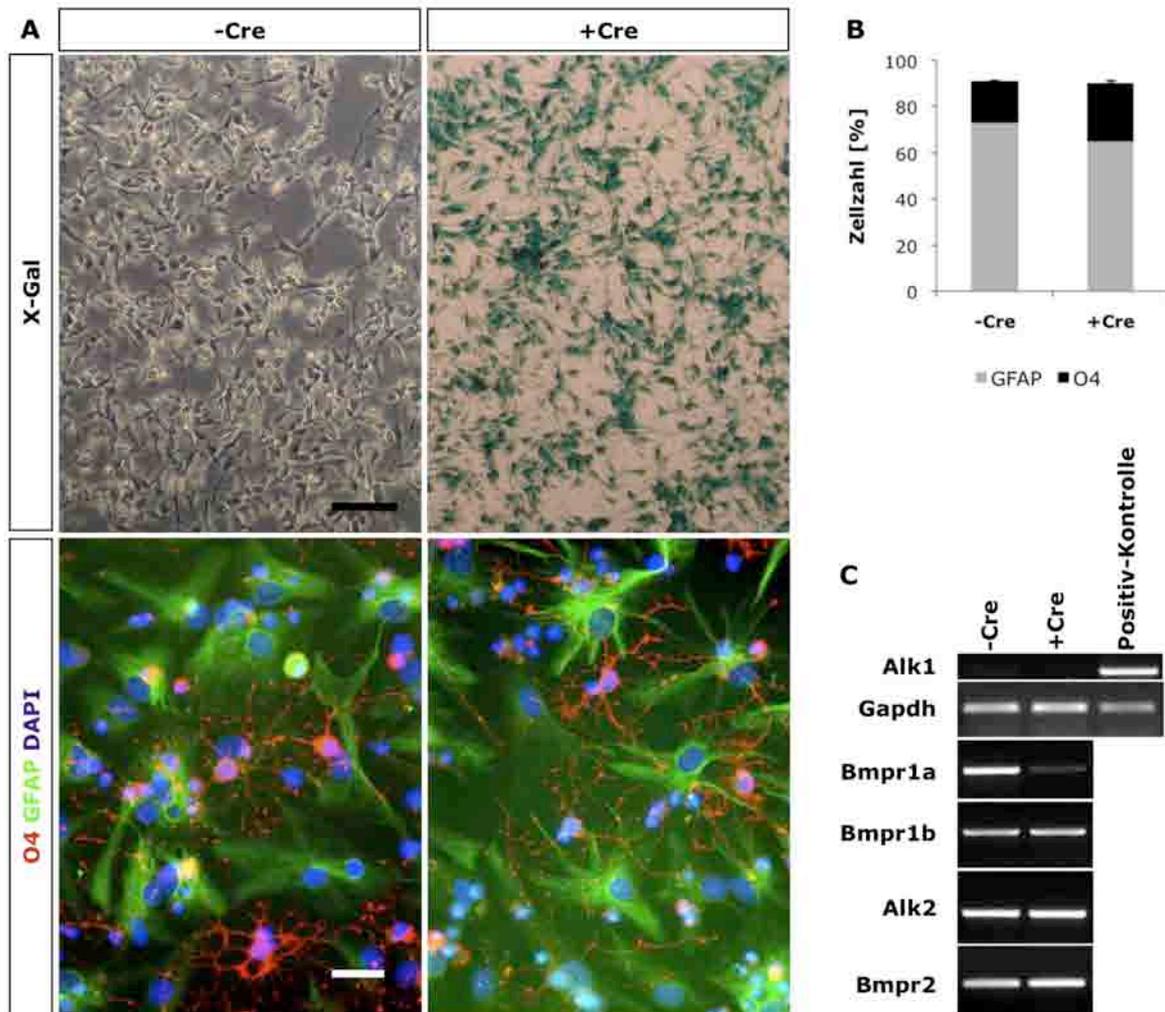
Eine exakte Quantifizierung der  $\beta$ -Tubulin-positiven Neurone war aufgrund ihrer schwankenden Verteilung innerhalb der Zellkulturschalen nicht durchführbar. Die genaue Bestimmung Oct4-exprimierender ES-Zellkolonien wurde durch ihren unterschiedlichen Differenzierungsgrad, verursacht durch die lang andauernde Kultivierung, erschwert. Dennoch deuten diese Daten darauf hin, dass in ES-Zellen die Bmp4-abhängige Inhibition der neuralen Differenzierung von der *Bmpr1a*-Expression abhängig ist.

### **C 2.11 Unveränderte gliale Differenzierung von *bmpr1a*-mutanten ES-Zell-abgeleiteten Vorläuferzellen**

In diversen Studien wurde beobachtet, dass die Aktivierung des Bmp-Signalweges die astrozytäre Differenzierung induziert und die Differenzierung von Oligodendrozyten inhibiert (Gomes *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 1996; Mehler *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1999). Daher sollte in einem weiteren Ansatz untersucht werden, welche Bedeutung dem *bmpr1a* während der *in vitro*-Differenzierung von neuralen Vorläuferzellen zukommt. Dies sollte anhand des oligodendroglialen und astrozytären Differenzierungspotentials nach *bmpr1a*-Inaktivierung bestimmt werden.

Hierzu wurden *bmpr1a<sup>f/f</sup>* ES-Zellen nach den Protokollen von Brüstle *et al.* (1999) und Glaser *et al.* (2007) zu glialen bzw. pan-neuralen Vorläuferzellen (als N3EFL- bzw. NS-Zellen bezeichnet) differenziert und in dem jeweiligen neuralen Vorläuferstadium mit der zellpermeablen Cre-Rekombinase transduziert. Die neuralen Vorläuferzellen wurden zunächst mit Hilfe einer X-Gal-Färbung auf ihre Rekombinationseffizienz

untersucht. Die Anzahl der  $\beta$ -Gal-positiven Zellen deutete sowohl im N3EFL- als auch im NS-Stadium auf ca. 90% *bmpr1a*-defiziente Zellen hin (siehe Abb. C 24A und Abb. C 25A). Dies wurde auf RNA-Ebene bestätigt (siehe Abb. C 24C und Abb. C 25C).



**Abb. C 24: Gliale Differenzierung von *bmpr1a*-mutanten N3EFL-Zellen.**

Nach der Transduktion mit HTNCre (+Cre) wurden *bmpr1a*<sup>fl/fl</sup> N3EFL-Zellen im Verhältnis 1:3 neu ausgesät. Unbehandelte *bmpr1a*<sup>fl/fl</sup> N3EFL-Zellen (-Cre) dienen zu Kontrollzwecken.

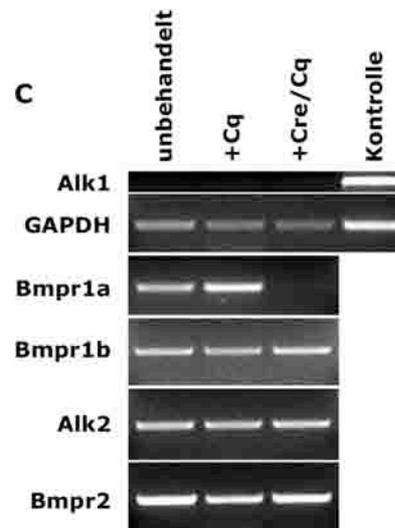
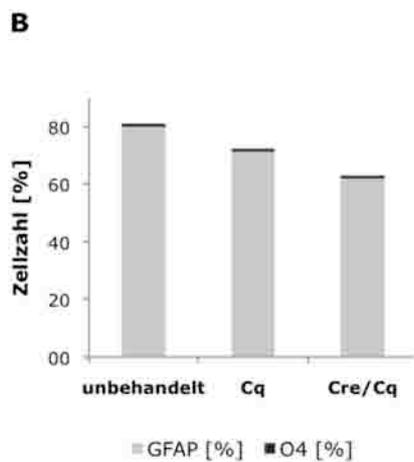
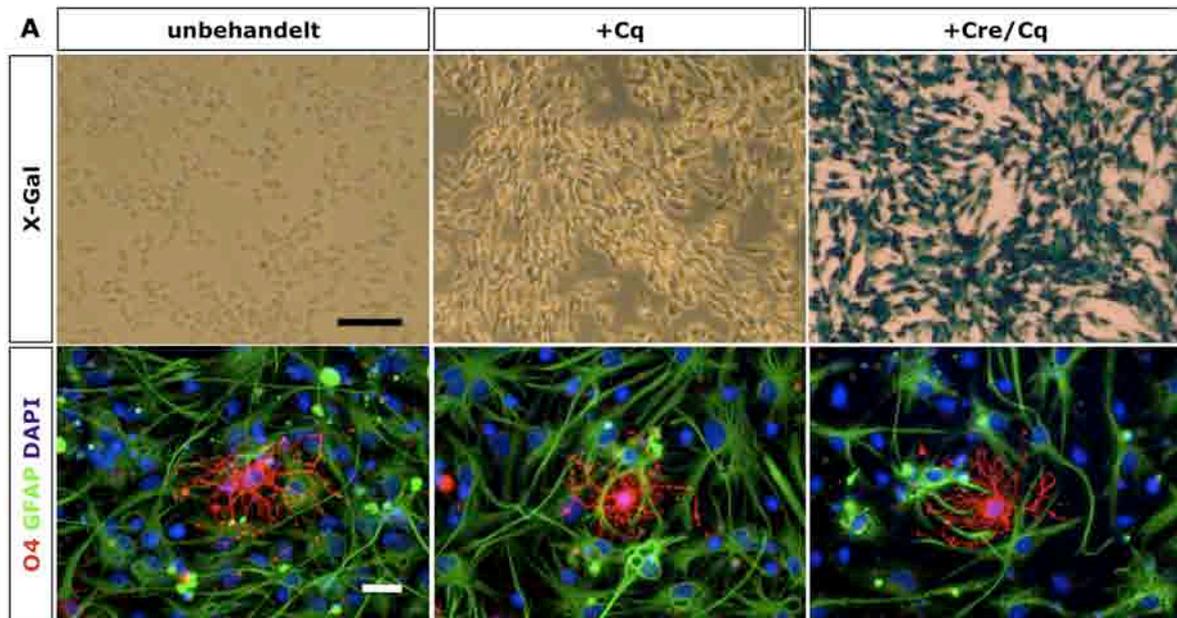
**(A)** Oben: X-Gal Färbung. Die Zellen wurden 3 Tage später fixiert und gefärbt. Skalierung: 200 $\mu$ M. Unten: Nachdem die Zellen für 4 Tage von Wachstumsfaktoren entzogen worden waren, wurden sie fixiert und auf den Oligodendrozytenmarker O4 und den Astrozytenmarker GFAP (glial fibrillary acidic protein) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Skalierung: 100 $\mu$ M.

**(B)** Quantifizierung der O4/GFAP-Färbung.

**(C)** Expression von Bmp-Rezeptoren nach *bmpr1a* Inaktivierung. Die RNA wurde nach 3 Tagen präpariert. EF dienten als Positivkontrolle. Alk1/2: Activin receptor like kinase 1/2; Gapdh: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Ladekontrolle).

Um den Einfluss von *Bmpr1a* auf die oligodendrogliale- bzw. astrozytäre Differenzierung von N3EFL- und NS-Zellen zu untersuchen, wurden die Wachstumsfaktoren, die ihre Proliferation unterstützen, abgesetzt. Oligodendrozyten wurden anschließend mit O4, Astrozyten mit GFAP angefärbt (siehe Abb. C 24A und

Abb. C 25A). Die Quantifizierung ergab, dass die Anzahl der Oligodendrozyten nach Differenzierung von *bmpr1a*-defizienten N3EFL-Zellen lediglich leicht erhöht war (siehe Abb. C 24B).



**Abb. C 25: Gliale Differenzierung von *bmpr1a*-mutanten NS-Zellen.**

Nach Behandlung mit Chloroquin (+Cq) oder HTNCre und Chloroquin (+Cre/Cq) wurden *bmpr1a*<sup>fl/fl</sup> NS-Zellen im Verhältnis 1:3 neu ausgesät. Unbehandelte *bmpr1a*<sup>fl/fl</sup> NS-Zellen dienen zu Kontrollzwecken.

**(A)** Oben: X-Gal Färbung. Die Zellen wurden 3 Tage später fixiert und gefärbt. Skalierung: 200µM. Unten: Nachdem die Zellen für 4 Tage von Wachstumsfaktoren entzogen worden waren, wurden sie fixiert und auf den Oligodendrozytenmarker O4 und den Astrozytenmarker GFAP (glial fibrillary acidic protein) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Skalierung: 100µM.

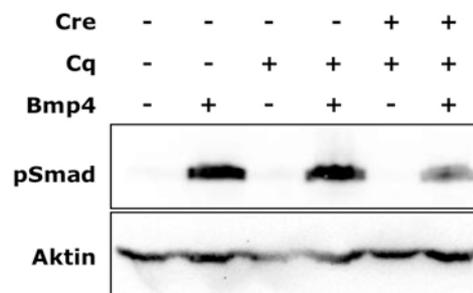
**(B)** Quantifizierung der O4/GFAP-Färbung.

**(C)** Expression von Bmp-Rezeptoren nach *bmpr1a*-Inaktivierung. Die RNA wurde nach 3 Tagen präpariert. EF dienten als Positivkontrolle. Alk1/2: Activin receptor like kinase 1/2; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Ladekontrolle).

In differenzierten NS-Zellen blieb die Oligodendrozyten-Zellzahl nach Deletion von *bmpr1a* sogar unverändert. Nach Differenzierung von NS-Zellen mit inaktiviertem *bmpr1a* wurde eine im Vergleich zu Kontrollzellen verminderte Anzahl von Astrozyten beobachtet. Allerdings wurde die astrozytäre Differenzierung von *bmpr1a* mutanten N3EFL-Zellen nur geringfügig reduziert (siehe Abb. C 24B und Abb. C 25B).

Es stellte sich daher die Frage, auf welche Weise der Verlust des *bmpr1a* in neuronalen Vorläuferzellen kompensiert werden kann. Die RT-PCR-Analyse verschiedener *bmp*-Rezeptoren zeigte, dass in NS- und N3EFL-Zellen neben dem Bmp Typ I Rezeptor *Alk2* auch der *bmpr1b* exprimiert wird. Ein Einfluss von *Bmpr1a* auf die Aktivierung von *bmpr1b* konnte nicht festgestellt werden, da die *bmpr1b*-Expression nach *bmpr1a*-Deletion unverändert blieb. Dies galt auch für die *Alk2* Expression.

In NS-Zellen wurde zusätzlich die Smad-Aktivierung nach *bmpr1a*-Inaktivierung verifiziert. Diese war nach Stimulierung mit *Bmp4* lediglich gemindert. Eine nahezu komplette Defizienz zur Phosphorylierung von Smad, wie es in *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen der Fall war, wurde dagegen nicht beobachtet.



**Abb. C 26: Effekte auf die Smad-Aktivierung nach *bmpr1a* Deletion in NS-Zellen.**

Nach Behandlung mit Chloroquin (+Cq) oder HTNCre und Chloroquin (+Cre/Cq) wurden *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* NS-Zellen im Verhältnis 1:3 neu ausgesät. Unbehandelte *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* NS-Zellen dienten zu Kontrollzwecken. Die Stimulierung mit *Bmp4* erfolgte nach 3 Tagen für 15 Minuten. Anschließend wurden die Zellen in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Für den Western Blot wurde das Lysat von 150000 Zellen verwendet. Die Smad1/5/8-Aktivierung wurde mit einem phosho-spezifischen Antikörper (pSmad) untersucht. Die Auftragung von übereinstimmenden Proteinen wurde durch einen Aktin-spezifischen Antikörper gewährleistet.

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass der *bmpr1a* in neuronalen Vorläuferzellen für ihr oligodendrogiales und astrozytäres Differenzierungspotenzial eine untergeordnete Rolle spielt. Bezüglich der Anzahl an Oligodendrozyten und Astrozyten wurden nach *bmpr1a*-Deletion keine signifikanten Veränderungen beobachtet. Neben *Alk2* exprimierten *bmpr1a*-mutante neurale Vorläuferzellen den Bmp Typ I Rezeptor *bmpr1b* zur Smad-abhängigen Signalweiterleitung.

## D Diskussion

Mutierte ES-Zellen sind für die Entschlüsselung von Pluripotenz-assoziierten Mechanismen wie dem Bmp-Signalweg von großer Bedeutung. Die Differenzierung mutierter ES-Zellen kann ferner verwendet werden, um Entwicklungsmechanismen *in vitro* zu analysieren. Für eine gerichtete und induzierbare Genüberexpression oder auch einen Genverlust der Zielzellen haben sich ortsspezifische Rekombinasen als sehr nützlich erwiesen.

### D 1 Reversible Geninduktion durch sequentielle Applikation von Flpe- und Cre-Rekombinasen

Die Cre-Rekombinase wird wegen ihrer hohen Effizienz gegenüber anderen Rekombinasen wie Flp zur Manipulation *in vitro* und *in vivo* bevorzugt. Eine zellpermeable Version des Cre-Proteins (HTNCre), das mit einer definierten Konzentration in diverse Zelltypen (Patsch & Edenhofer, 2007) eingebracht werden kann ohne ihr Genom zu schädigen, wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits eingehend charakterisiert und optimiert (Peitz *et al.*, 2007). U.a. wurde HTNCre zur Aktivierung von Zielgenen in humanen und murinen ES-Zellen eingesetzt (Nolden *et al.*, 2006; Peitz *et al.*, 2007). Die Manipulations- und Selektionsmöglichkeiten von ES-Zellen ließen sich jedoch durch die kombinierte Applikation zweier verschiedener ortsspezifischer Rekombinasen deutlich erweitern. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zellpermeable Cre- und Flpe-Proteine zur reversiblen Geninduktion eingesetzt werden.

Dazu wurde der pFC (Flp-ON-Cre-OFF)-Vektor kloniert, mit dem in der Zielzelle eine Flpe-abhängige Zielgenaktivierung durch Exzision einer vorgeschalteten FRT-flankierten Stopsequenz ermöglicht wird. Da die Enden des Vektors mit loxP-Stellen versehen sind, wird die Kasette mit dem aktivierten Zielgen nach erfolgter Cre-Rekombination bis auf eine verbleibende loxP-Stelle entfernt. Das Genom der Zielzellen ist damit weitestgehend unverändert. Beliebige Zielgene können im pFC-Vektor durch Restriktionshydrolyse ausgetauscht werden.

Um die Flpe- und Cre-vermittelten Rekombinationsereignisse sowohl in Fibroblasten als auch in ES-Zellen zuverlässig quantifizieren zu können, wurde das *lacZ*-Reportergen in die pFC-Kassette eingefügt. Die Funktionalität dieses Konstrukts wurde durch transiente (Co-) Transfektionen des Vektors mit einem Flpe-Plasmid, Cre-Plasmid bzw. Flpe- und Cre-Plasmid in Fibroblasten nachgewiesen. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass die beiden Rekombinasen Cre und Flpe zur reversiblen Geninduktion in Fibroblasten verwendet werden können.

## **D 2            Manipulation von ES-Zellen mit HTNFlpe**

Die Ergebnisse, die in vorherigen Untersuchungen mit HTNCre erzielt wurden (Nolden *et al.*, 2006; Haupt *et al.*, 2007 Peitz *et al.*, 2007), ließen vermuten, dass ein zellpermeables Flpe-Protein ebenfalls ein großes Rekombinationspotential haben könnte. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren Rekombinationseffizienzen, die mit einer transduzierbaren Flpe-Rekombinase erreicht werden können, noch nicht systematisch optimiert. Mit dem pFC-Plasmid war es möglich, die Funktionalität einer transduzierbaren Flpe-Rekombinase *in vitro* zu überprüfen. Es wurde sowohl eine Fibroblasten-Linie (Patsch, 2005) als auch eine ES-Zelllinie (diese Arbeit) generiert, die stabil für eine Kopie der pFC-Kassette kodieren. Diese wurden als FC-3T3 bzw. FC-ES bezeichnet. Nach Applikation von HTNFlpe gab die Anzahl der  $\beta$ -Gal-positiven Zellen bzw. Kolonien Aufschluss über die Rekombinationseffizienz.

Erste Funktionalitätstests der Flpe-Transduktion in FC-3T3 wiesen trotz der geringen Flpe-Stabilität bei 37°C auf Rekombinationseffizienzen von ca. 30% hin. Durch Optimierung der Transduktionsbedingungen innerhalb des Arbeitskreises wurden schließlich Rekombinationseffizienzen von bis zu ca. 75% erreicht (Patsch, 2005).

Die Transduktionsverbesserungen wurden auf die transgene FC-ES-Zelllinie übertragen, und mit ihnen betrug die höchste Rekombinations-Rate ca. 40%. In Fibroblasten wurden mit HTNFlpe fast doppelt so viele Zellen rekombiniert (Patsch, 2005). Die höhere Transduktionseffizienz von HTNFlpe in Fibroblasten im Vergleich zu ES-Zellen könnte durch ihre divergierende Zelloberfläche verursacht worden sein. Diese ist in ES-Zellen kleiner. Weiterhin könnte die unterschiedliche Ausstattung der Zellen mit Membranproteinen, insbesondere den Transduktions-relevanten

Heparansulfat-Proteoglykanen eine Rolle spielen. Da Heparansulfate in ES-Zellen ungewöhnlich gering sulfatiert sind (Johnson *et al.*, 2007), könnte ihre Wechselwirkung mit der basischen Transduktionsdomäne negativ beeinflusst werden. Hierdurch würde die Internalisierung des Proteins erschwert.

Sowohl in Fibroblasten als auch in ES-Zellen war die maximale Rekombinationsrate durch HTNFlpe geringer als die, welche mit HTNCre erreicht werden kann. Mit HTNCre werden loxP-modifizierte Fibroblasten und ES-Zellen zu mehr als 90% rekombiniert (Peitz *et al.*, 2002; Peitz *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit transienten Transfektionsuntersuchungen, in denen Flpe- und Cre-Rekombinationseffizienzen verglichen wurden. Auch hier war die Effizienz von Flpe schlechter als die von Cre (Schaff *et al.*, 2001). Eine Ursache könnte die 10-fach verminderte Rekombinationsaktivität auf chromosomale Zielsequenzen der Flpe-Rekombinase im Vergleich zu Cre sein (Andreas *et al.* 2002). Für das in dieser Arbeit verwendete pFC-Konstrukt spielt eine schlechtere Effektivität der Flpe-vermittelten Rekombination nur eine untergeordnete Rolle. Nach erfolgreicher Flpe-Rekombination wird ein FRT-flankiertes HSV-*tk*-Gen aus der Kasette entfernt, sodass die Flpe-rekombinierten ES-Zellen nach einer Negativselektion mit Ganciclovir nahezu komplett angereichert werden können. Dies spiegelte sich in der *lacZ*-Expression wieder. Die Strategie der Negativselektion wäre auch für andere Anwendungen, in denen die Flpe-Rekombination hocheffizient durchgeführt werden muss, von großem Nutzen.

Erstaunlicherweise wurde mit HTNFlpe in ES-Zellen schon nach einer Stunde die maximale Transduktionsrate erzielt. Maximale HTNCre-vermittelte Rekombinationseffizienzen waren erst nach 16 Stunden zu beobachten (Peitz *et al.*, 2007). Untersuchungen, die unter zellfreien Bedingungen vorgenommen wurden, unterstützen dieses Resultat. Hier wurde gezeigt, dass die initiale Rekombination durch Flp schneller abläuft als die durch Cre (Ringrose *et al.*, 1998). Die kurze Transduktionszeit dürfte sich positiv auf die Pluripotenzerhaltung der ES-Zellen auswirken, da das Flpe-Transduktionsmedium weder Lif noch FCS enthält. Beide Zusätze werden standardmäßig verwendet, um ES-Zellen dauerhaft kultivieren zu können (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Transduktion mit HTNFlpe keinen negativen Einfluss auf die Proliferation und die genomische Stabilität von FC-ES-Zellen hat. Außerdem wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Andreas Zimmer (Universitätsklinikum Bonn) bestätigt, dass die Keimbahnfähigkeit von ES-Zellen nach HTNFlpe-Transduktion unverändert bleibt. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den publizierten Daten zu HTNCre (Peitz *et al.*, 2007). Von anderen Arbeitsgruppen wurde berichtet, dass die Cre-Rekombinase toxische Effekte induzieren kann. Hier wurde durch Cre das Wachstum von verschiedenen Fibroblastenlinien und HeLa-Zellen inhibiert (de Alboran *et al.*, 2001; Pfeifer *et al.*, 2001). Außerdem wurden in primären Fibroblasten chromosomale Aberrationen durch Cre-Aktivität hervorgerufen (Loonstra *et al.*, 2001; Silver & Livingston, 2001). Allerdings wurde Cre in diesen Studien über virale Transduktion oder ein posttranslational kontrollierbares System eingebracht. Diese Methoden lassen eine genaue Kontrolle über das Ausmaß der Cre-Aktivität nicht zu. Durch den direkten Transfer wird eine exakte Dosierung des rekombinanten Proteins ermöglicht, sodass die Zellvitalität nicht negativ beeinflusst werden sollte.

### **D 3 Zellpermeable Flpe- und Cre-Rekombinasen zur reversiblen Geninduktion in ES-Zellen**

Mit Hilfe der Flpe-Transduktion wurden FC-ES-Zellen mit hoher Effizienz rekombiniert, durch Ganciclovir nahezu komplett selektiert und die Expression von *lacZ* aktiviert. Es sollte nun überprüft werden, inwieweit das *lacZ*-Reporter gen durch Transduktion mit HTNCre wieder exzisiert werden kann. Da die Halbwertszeit des  $\beta$ -Gal-Proteins signifikant länger als die der *lacZ*-mRNA ist (Li Song & Joyner, 2000), waren die Zellen erst eine Woche nach Cre-Transduktion fixiert worden. Die Quantifizierung ergab, dass bis zu 15% der ES-Zellen weiterhin  $\beta$ -Gal-positiv waren. Mit HTNCre waren mehr als 90% rekombinierte ES-Zellen zu erwarten (Peitz *et al.*, 2007). Die verbleibenden  $\beta$ -Gal-positiven Kolonien könnten durch eine Restaktivität des LacZ-Proteins verursacht worden sein. Außerdem wäre es möglich, dass das Reporter gen aufgrund der Tri-loxP-Strategie des Konstrukts (Gu *et al.*, 1993) trotz erfolgreicher Cre-Rekombination in wenigen ES-Zellen weiter exprimiert wurde. Stromaufwärts des Neomycinresistenzgens wurde in das pFC Konstrukt eine weitere loxP-Stelle

eingbracht, sodass auch das Neomycingen loxP-flankiert wurde. Die Cre-vermittelte Rekombination könnte somit zu einer Neomycinexzision führen, ohne dass *lacZ* deletiert wird. Die Flankierung von Neomycin mit loxP-Stellen war notwendig, da eine FC-Reportermaus zur Analyse der reversiblen Geninduktion *in vivo* in Planung ist. Verbleibende Resistenzen im Mausgenom könnten die Genexpression beeinflussen (Kaul *et al.*, 2000). Zukünftig wäre eine dritte ortsspezifische Rekombinase für die gezielte Exzision von Resistenzen von Vorteil, da sich die partielle Deletion von konditionalen Allelen in ES-Zellen als sehr schwierig erwiesen (Kaartinen & Nagy, 2001). Ein aussichtsreicher Kandidat ist die Tyrosin-Rekombinase Dre (Sauer & McDermott, 2004). Erste Untersuchungen zu einer transduzierbaren Dre-Rekombinase deuten auf 50% rekombinierte ES-Zellen hin (Dipl. Biol. C. Patsch, persönliche Mitteilung).

Im Vergleich zu Tetrazyklin-induzierbaren Promotoren können für das in dieser Arbeit etablierte FC-System zur reversiblen Geninduktion folgende Vorteile festgehalten werden: das FC-System ist äußerst undurchlässig, da vor HTNFlpe-Behandlung keine Aktivierung des Transgens auftritt. Dagegen sind Tetrazyklin-induzierbare Systeme durch ihre Hintergrundaktivität limitiert (Zhou *et al.*, 2007). Das FC-System ermöglicht eine schnelle Transgenaktivierung durch Proteintransduktion mit HTNFlpe. Hier wird bereits nach einer Stunde die maximale Rekombinationseffizienz erreicht. Im Gegensatz dazu werden mit Tetrazyklin-abhängigen Systemen ungefähr drei Zellzyklen benötigt, um eine optimale Induktion des Transgens zu erzielen (Zhou *et al.*, 2007). Insgesamt bleibt mit dem FC-System die strikte Regulierung durch ortsspezifischen Rekombinasen erhalten, wobei durch die Verknüpfung von zwei Rekombinasen zusätzlich Reversibilität ermöglicht wird.

#### **D 4 Weitere Anwendungsmöglichkeiten genetischer Schalter**

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass die Transduktion von HTNFlpe in humane ES-Zellen Rekombinationseffizienzen von 20% erreicht (Jungverdorben, 2007). Auch eine Anreicherung der Flpe-rekombinierten humanen ES-Zellen mit dem pFC-Vektor durch eine Ganciclovirselektion sollte möglich sein (Schuldiner *et al.*, 2008). Nolden *et al.* (2006) konnten zudem Cre-Transduktionseffizienzen in hES-Zellen nachweisen, die mit solchen in mES-Zellen vergleichbar waren. FC-hES-Linien, die für verschiedene

Zielgene kodieren, könnten somit für diverse biomedizinische Fragestellungen verwendet werden. Unter anderem könnten sie die Isolierung von definierten somatischen Zelltypen aus differenzierenden ES-Zellkulturen erleichtern. Mögliche Zielgene sind proneurale Gene wie *beta catenin* (Otero *et al.*, 2004) und *tlx3* (*T cell leukemia 3*; Kondo *et al.*, 2008). Die FC-Kassette könnte außerdem für die Reprogrammierung humaner somatischer Zellen benutzt werden. Dies ist kürzlich auch ohne die Verwendung von viralen Vektoren gelungen (Kaji *et al.*, 2009; Woltjen *et al.*, 2009). Zu prüfen wäre, ob sich somatische Klf4-FC-Zellen mit den transduzierbaren Varianten von Sox2 und Oct4 (Bosnali & Edenhofer, 2008) reprogrammieren lassen.

Alle Anwendungen würden idealerweise nur in einer temporären genetischen Modifikation der Zielzellen resultieren. Somit wäre mit der FC-Kassette ein wichtiger Schritt zur therapeutischen Anwendung von *in vitro* differenzierten somatischen Zellen möglich.

Bevor *in vitro* differenzierte Zellen aus ES- und iPS-Zellen für therapeutische Zwecke eingesetzt werden können, sollten Mechanismen, die Pluripotenz und Differenzierung regulieren, besser verstanden werden.

## D 5 Deletion von *bmpr1a* mit Cre-Proteintransduktion in mES-Zellen

Der Bmp-Signaltransduktionsweg spielt für die Pluripotenzerhaltung von murinen ES-Zellen eine Schlüsselrolle (Ying *et al.*, 2003b; Qi *et al.*, 2004). Bmp-Signale werden Rezeptor-vermittelt in den Zellkern weitergeleitet (Shi & Massagué, 2003). Für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz scheint der *Bmpr1a* von Bedeutung zu sein. Es wurde gezeigt, dass in ES-Zellen *bmpr1a* im Verhältnis zu *bmpr1b* wesentlich stärker exprimiert wird (Ying *et al.*, 2003b; Qi *et al.*, 2004). Außerdem war die *bmpr1a*-Expression in einem Microarray, in dem Stammzellmarker identifiziert werden sollten, stark angereichert (Sato *et al.*, 2003). Um den Einfluss von *Bmpr1a* in ES-Zellen genau bestimmen zu können, wurde dieser in der vorliegenden Arbeit konditional inaktiviert.

Hierfür stand die murine ES-Zelllinie *bmpr1a<sup>f/f</sup>* zur Verfügung (Mishina *et al.*, 2002). In *bmpr1a<sup>f/f</sup>* ES-Zellen ist das Exon 2 mit loxP-Stellen flankiert. Die Rekombination mit

Cre resultiert in einem Leserasterwechsel und einer *Nonsense*-Mutation, die eine Ligandenbindung unmöglich macht. Um möglichst hohe Rekombinationseffizienzen zu erreichen, wurde das zellpermeable HTNCre-Protein (Peitz *et al.*, 2002) direkt in die Zelle eingeschleust. Tatsächlich waren nach der Behandlung mit HTNCre mehr als 90% der ES-Zellen rekombiniert. Dies wurde neben der Aktivierung des *lacZ*-Reportergens durch Analysen auf genomischer- und RNA-Ebene nachgewiesen. Der Verlust eines funktionellen *Bmpr1a* wurde außerdem durch eine fehlende oder minimale Aktivierung der Rezeptor-regulierten Smads 1/5/8 gezeigt. Smads sind die wichtigsten Effektoren, die durch Bmps aktiviert werden (Shi & Massague, 2003). Die hohe Rekombinationsrate durch HTNCre ermöglichte neben der schnellen und zuverlässigen Isolierung von einzelnen *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* ES-Zellklonen auch die akute Analyse der polyklonalen Population direkt nach der Deletion. Die Cre-Transduktion ist somit in Analogie zu vorherigen Untersuchungen (Murakami *et al.*, 2004; Nolden *et al.*, 2007) eine sehr effektive Methode zur Genmodifizierung von ES-Zellen, die hier zur Inaktivierung von *bmpr1a* verwendet wurde.

#### **D 6            Verminderte Proliferation und Klonogenität nach *bmpr1a*-Inaktivierung in ES-Zellen**

Standardmäßig werden mES-Zellen in Medium mit Serum und Lif kultiviert, um ihre Pluripotenzerhaltung zu gewährleisten. Die dauerhafte Kultivierung von ES-Zellen ist bei Abwesenheit von Serum trotz Lif-Zugabe nicht möglich. Kürzlich wurde gezeigt, dass der Serumzusatz nicht weiter erforderlich ist, wenn das ES-Zellmedium Bmp4 beinhaltet (Ying *et al.*, 2003b). Zu prüfen blieb, ob die Bmp4-abhängige Proliferation von ES-Zellen über den *Bmpr1a* verläuft. Dies sollte anhand von konditionalen *bmpr1a*-KO-ES-Zellen ermittelt werden.

In ersten Tests wurde bestätigt, dass eine anhaltende Proliferation von ES-Zellen in Abwesenheit von Serum und Bmp4 nicht möglich war. Nachdem die Zellzahl nach anfänglichen Vereinzlungen lediglich unverändert blieb, ließen sich die Zellen schließlich nach dem Vereinzeln nicht mehr plattieren. Dabei wurde beobachtet, dass die Expansionsdefizienz der *bmpr1a* deletierten ES-Zellen noch früher einsetzte als die der Kontroll-ES-Zellen. Die Inaktivierung von *bmpr1a* scheint daher einen

verstärkenden Effekt auf die Proliferationsdefizienz von ES-Zellen bei Abwesenheit von Serum und Bmp4 auszuüben.

Bei Zugabe von Bmp4 zeigten drei verschiedene *bmpr1a*<sup>Δ/Δ</sup> ES-Zellklone unterschiedliche Verhaltensweisen. Die Proliferationsdefizienz von Δ6-Klon ES-Zellen blieb im Vergleich zu Bmp4-freien Bedingungen unverändert, sodass das Proliferationsverhalten des Δ6 Klons durch die Anwesenheit von Bmp4 nicht positiv beeinflusst werden konnte. Die Anzahl der Δ8-ES-Zellen war über bis zu 8 Passagen nahezu konstant und konnte nicht gesteigert werden. Bmp4 schien daher die Proliferation des Δ8-Klons lediglich eingeschränkt fördern zu können. Die vergleichsweise niedrige Klonogenität der Δ6- und Δ8-ES-Zellen verdeutlichte den geringen Einfluss von Bmp4 auf ihre Zellvitalität. Dagegen konnten Δ3-ES-Zellen über mehrere Passagen mit steigender Zellzahl kultiviert werden, wenn das Medium mit Bmp4 versetzt war. Dies war in Übereinstimmung mit Wachstumsanalysen der polyklonal *bmpr1a*-deletierten Population. In beiden Fällen war eine reduzierte Proliferationsfähigkeit im Vergleich zu *bmpr1a*<sup>fl/fl</sup> ES-Zellen beobachtet worden. Dass das Wachstum der polyklonal deletierten ES-Zellen durch eine Verunreinigung mit *bmpr1a*<sup>fl/fl</sup> ES-Zellen verursacht wurde, erschien unwahrscheinlich, da die *bmpr1a*-Expression auch nach sieben Passagen konstant gering war. Die Expansionsfähigkeit und die im Vergleich zu Δ6- und Δ8-ES-Zellen höhere Klonogenität von Δ3 unterstützt diese Vermutung.

Das uneinheitliche Wachstums- und Klonogenitätspotential der Δ-Klone deutet auf eine Heterogenität von individuellen ES-Zellen in Bezug auf die *Bmpr1a*-Abhängigkeit hin. Hierdurch wird auch die Kultivierbarkeit der pluripotent *bmpr1a*-deletierten ES-Zellpopulation erklärt. Ein polyklonaler Ansatz bestünde demnach mit fortlaufender Passagierung aus einer stetig ansteigenden Population von Δ3-ähnlichen ES-Zellen, da Δ6- und Δ8-ähnliche nicht oder nur gering proliferieren. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch von Chambers *et al.* (2007) berichtet. Sie konnten zeigen, dass der Pluripotenzfaktor *nanog* nicht uniform in ES-Zellen exprimiert wird. Obwohl *nanog*<sup>-/-</sup> ES-Zellen mehr zur Differenzierung neigten, konnte ihre Pluripotenz aufrechterhalten werden. Darüber hinaus wurde auch für *nanog*<sup>-/-</sup> ES-Zellen eine langsamere Expansionsrate und reduzierte Klonogenität nachgewiesen. Die Möglichkeit, *bmpr1a*<sup>Δ/Δ</sup> ES-Zellen unter Serum-freien Bedingungen bei Zugabe von

Bmp4 in eingeschränktem Maße zu kultivieren, ließ Kompensations- bzw. Adaptionsmechanismen einzelner ES-Zellen vermuten. Dies wurde auch bezüglich der Klonogenität der  $\Delta$  ES-Zellkone deutlich, die untereinander differierte und unterhalb derjenigen von *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen lag. Insgesamt wurde beobachtet, dass exogenes Bmp4, nicht aber die Expression von *bmpr1a* für die Kultivierung von ES-Zellen bei Serumabwesenheit notwendig ist.

Unter Serum-haltigen Bedingungen hingegen war sogar eine fortschreitende Proliferation des  $\Delta 6$ -Klons zu beobachten. Diese war jedoch geringer als die des  $\Delta 3$ -Klons, welche wiederum unterhalb des Wachstumspotentials von *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen lag. Serumkomponenten scheinen daher für die Proliferationsfähigkeit von ES-Zellen bei Bmpr1a-Verlust weniger restriktiv zu sein. Die Vielzahl an unbekanntem Serumproteinen lässt eine Identifizierung der Proliferations-fördernden Bestandteile jedoch nicht zu.

### **Erfolgreiche Generierung von *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* ES-Zellen**

In vorherigen Untersuchungen wurde vergeblich versucht, *bmpr1a<sup>-/-</sup>* ES-Zellen aus *bmpr1a<sup>-/-</sup>* Blastozysten unter Standardbedingungen zu gewinnen (Mishina, 2003; Zhao, 2003). Bei Serumzusatz war die Etablierung von *bmpr1a<sup>-/-</sup>* ES-Zellen nur durch Zugabe von Mapk-Inhibitoren möglich (Qi *et al.*, 2004). Unter Serum-freien Bedingungen wurden *bmpr1a<sup>-/-</sup>* ES-Zellen nur etabliert, wenn Bmp4 durch Bmp7 ersetzt wurde (DiGregorio *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* ES-Zellen unter Standard-ES-Zellbedingungen (Lif und FCS) aus *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen zu generieren. Mit Untersuchungen über die Funktion von Nanog in der Blastozyste und in ES-Zellen wurden vergleichbare Resultate erzielt. Während die Proliferation von *nanog<sup>-/-</sup>* innere Zellmassen scheiterte (Mitsui *et al.*, 2003), war es möglich, *nanog<sup>-/-</sup>* ES-Zellen aus *nanog<sup>+/+</sup>* Parentallinien herzustellen (Chambers *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse belegen erneut, dass ES-Zellen und Zellen der inneren Zellmasse anscheinend nicht äquivalent sind (Chambers & Smith, 2004). Die innere Zellmasse besteht nur transient während der Entwicklung und dient *in vivo* nicht zur Generierung von Stammzellen. Dagegen entstehen ES-Zellen vermutlich durch Selektion und Adaption an Zellkulturbedingungen (Buehr & Smith, 2003). So kann davon ausgegangen werden, dass der Verlust des Bmpr1a nach Etablierung einer ES-Zelllinie durch Zellkultur-spezifische Mechanismen kompensiert werden kann.

### Veränderte Expression von Pluripotenzmarkern in *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen

Um genauer zu bestimmen, ob Bmp4-vermittelte Effekte auf die Selbsterneuerung von ES-Zellen *Bmpr1a*-abhängig sind, wurde die Expression von Pluripotenz-assoziierten Markern untersucht. Die Analyse ergab ein heterogenes Bild. Unterschiede in der AP-Aktivität der verschiedenen  $\Delta$ -Klone in Bezug auf *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen waren, soweit Selbsterneuerung vorhanden, hauptsächlich in Randbereichen der Kolonien zu erkennen. Diese deuteten auf eine gesteigerte Differenzierung von *bmpr1a*-defizienten ES-Zellen hin. Für eine fortschreitende Expression von *rex1* und *oct4* benötigten die ES-Zellen keinen funktionellen *Bmpr1a*. Die *oct4*- und *rex1*-Level blieben zudem unverändert, wenn kein exogenes Bmp4 vorhanden war. Daher scheint die Expression dieser Gene nicht direkt an die Bmp-Signalkaskade gekoppelt zu sein. Auffallend war allerdings, dass  $\Delta 6$  und  $\Delta 8$ , die Klone mit dem geringsten Proliferationspotential, mindestens 3-fach weniger *oct4* (für  $\Delta 6$ ) bzw. *rex1* (für  $\Delta 8$ ) exprimierten als die übrigen  $\Delta$ -Klone. Dies ist ein weiteres Indiz für die Heterogenität von ES-Zellen.

Die Expression des Pluripotenzfaktors *nanog* wurde sowohl in *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen bei Bmp4-Abwesenheit als auch in *bmpr1a*-deletierten ES-Zellen trotz Bmp4-Zugabe reduziert. Eine direkte Interaktion von Nanog und dem Bmp-Signaltransduktionsweg wurde 2006 von Suzuki *et al.* publiziert. Sie postulierten, dass die Bmp/Smad-induzierte mesodermale Spezifizierung von ES-Zellen in Gegenwart von Lif durch eine Hochregulierung von *nanog* verhindert wird. In diesem Fall interagiert Nanog mit Smad1 und verhindert eine fortschreitende Weiterleitung des Bmp-spezifischen Differenzierungssignals. In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass der Entzug von Bmp4 bei Lif-Applikation zu einer verminderten Expression von *nanog* führt. Da auch mit Bmp4 die *nanog*-Expression ähnlich niedrig blieb, wenn die ES-Zellen keinen funktionellen *bmpr1a* besaßen, scheint die Bmp-abhängige Regulierung der *nanog*-Expression über den *bmpr1a* zu verlaufen. Diese Ergebnisse bestätigen ferner die bereits diskutierte und publizierte Beobachtung (Chambers *et al.*, 2007), dass ES-Zellen mit geringer *nanog*-Expression prinzipiell mit verminderter Klonogenität und Proliferation kultiviert werden können.

Vergleichbare Effekte von Bmp4/*Bmpr1a* wurden auch bezüglich der Regulierung von *id1* beobachtet. Hier führte die Bmp4-Applikation in *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen, nicht

aber in *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* ES-Zellen zu einer verstärkten Expression von *id1*. *Id*-Gene kodieren für negative *Helix-Loop-Helix*-Faktoren und werden in undifferenzierten ES-Zellen BMP/Smad-abhängig induziert (Ying *et al.*, 2003b). Durch die verminderte bis fehlende Smad-Aktivierung in *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* ES-Zellen könnte die Induktion der *id1*-Expression verhindert worden sein. Daher scheint die Bmp4/Smad-abhängige Induktion von *id1* in ES-Zellen über den Bmpr1a zu verlaufen. Unter Serum-freien Bedingungen wurde weiterhin gezeigt, dass ES-Zellen durch Überexpression von *id1* von ihrer Bmp4-Abhängigkeit befreit werden (Ying *et al.*, 2003b). In Rahmen dieser Arbeit wurde deutlich, dass *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* ES-Zellen trotz fehlender *id1*-Induktion in eingeschränktem Maße kultiviert werden können. Eine verstärkte Expression von *id1* ist letztlich bei Bmp4-Abwesenheit für die solide Selbsterneuerung von ES-Zellen ausreichend. Allerdings beeinflusst Bmp4 anscheinend weitere Signalkaskaden, die nicht von einer Smad-Aktivierung und damit verbundenen *id1*-Induktion abhängig sind. Dies würde auch erklären, warum exogenes Bmp4 für die Kultivierung von ES-Zellen bei Serumentzug zwingend erforderlich ist, auf die Expression von *bmpr1a* dagegen verzichtet werden kann.

### **Bmp4-vermittelte Signalweiterleitung in *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen**

Im folgenden wurden Signalwege analysiert, durch die Bmp4 die Selbsterneuerung von *bmpr1a<sup>Δ</sup>*-ES-Zellen beeinflussen könnte. Hierzu wurde zunächst die Expression von weiteren Bmp-Rezeptoren untersucht. Es stellte sich heraus, dass ES-Zellen mit funktionellem Bmpr1a, aber auch diejenigen mit der trunkierten Variante, über eine gleichmäßig starke *bmpr2*- und *alk2*-Expression verfügten. Die Alk2-Signalkaskade kann durch Bmp4 induziert werden (de Sousa Lopes *et al.*, 2004). Außerdem wurde von Redundanzen verschiedener Typ I Bmp-Rezeptoren berichtet (Ahn *et al.*, 2001), darunter auch solche von Alk2 und Bmpr1a (Orvis *et al.*, 2008). Mit *alk2* und dem Typ II Rezeptor *bmpr2* wurde demnach auch in *bmpr1a<sup>Δ</sup>*-ES-Zellen ein Rezeptorpaar exprimiert, das Bmp4-abhängige Signale in das Zellinnere weiterleiten konnte.

Anhand von *bmp2*- und *bmp4*-Expressionsanalysen konnte vermutet werden, dass *bmpr1a*-defiziente ES-Zellen nur zur Selbsterneuerung befähigt waren, wenn *bmp4* im gleichen Ausmaß wie in *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen exprimiert wurde (polyklonale

Analyse) oder *bmp2* im Vergleich zu *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen hochreguliert wurde (monoklonale Analyse). Bmp2 und Bmp4 sind auf Aminosäure-Ebene zu 92% homolog und in den meisten biologischen Systemen funktionell austauschbar (Zhao, 2003). Von Ying *et al.* und Qi *et al.* wurde berichtet, dass ES-Zellen selbst bei Bmp4-Zugabe über eine intrinsische Expression von *bmps* verfügen. Neben exogenem Bmp4 könnte für die fortlaufende Proliferation von ES-Zellen auch eine ausreichende Menge intrinsischer *bmp2*- oder *bmp4*-Expression erforderlich zu sein.

Eine Bmp4-abhängige Smad1/5/8-Aktivierung wurde in ES-Zellen mit inaktiviertem *bmpr1a* nicht oder nur sehr begrenzt induziert. Obwohl Smads als die wichtigsten Proteine zur Signalweiterleitung von Bmps gelten, konnten ES-Zellen aus Smad4 defizienten Blastozysten abgeleitet werden (Sirard *et al.*, 1998). Smad4 ist der gemeinsame Bindungspartner aller Smads. Eine hohe Smad1/5/8-Aktivität scheint demnach für die Selbsterneuerung von ES-Zellen nicht essentiell zu sein. Das bestätigen auch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse.

In ES-Zellen wurde außerdem von einem Smad-unabhängigen Bmp-regulierten Signaltransduktionsweg berichtet. Erks induzieren prodifferentielle Kaskaden und werden, wie in dieser Arbeit bestätigt, auch von Lif aktiviert (Burdon *et al.*, 1999). Gleichzeitige Bmp4-Applikation vermag die aktivierende Erk-Phosphorylierung ohne Einfluss von Smads zu inhibieren (Qi *et al.*, 2004). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in ES-Zellen mit funktionellem *bmpr1a* eine minimale Reduktion der Erk-Aktivierung durch Bmp4 erzielt. Diese geringfügige Inhibition konnte nach Deletion von *bmpr1a* nicht weiter aufrechterhalten werden. Demnach scheint die Bmp4-vermittelte Verminderung der Erk-Aktivierung sowohl in Blastozysten (Qi *et al.*, 2004) als auch in in ES-Zelllinien über den *Bmpr1a* zu verlaufen.

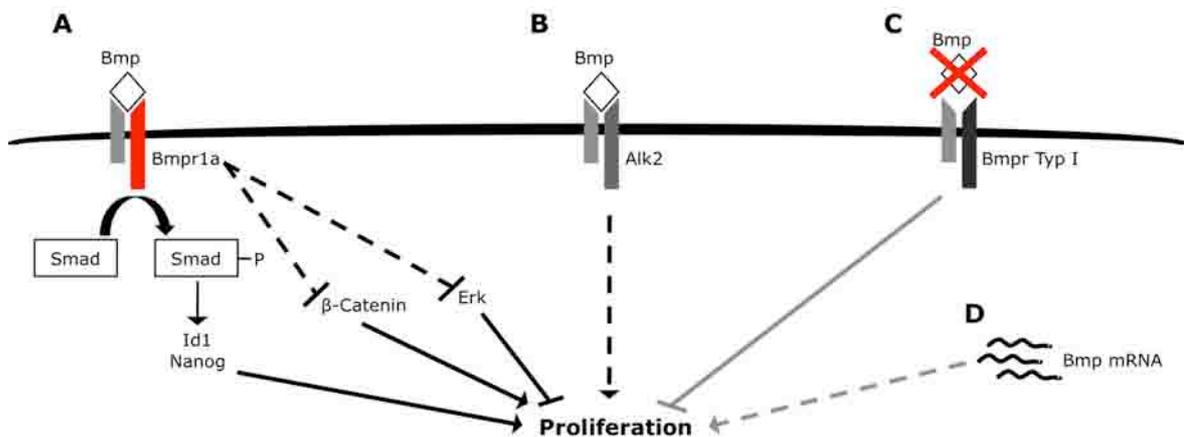
Obwohl die kombinierte *alk2/bmpr2*-Expression Kompensationen oder Redundanzen von Typ I Bmp-Rezeptoren in ES-Zellen vermuten lässt, konnten im Rahmen dieser Arbeit keine abwärts liegenden *Bmpr1a*-unabhängigen Mechanismen entschlüsselt werden, die das eingeschränkte Selbsterneuerungspotential von *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* ES-Zellen erklären.

Es wurde deshalb überlegt, ob das Fehlen des *bmpr1a* selbst einen proliferationsfördernden Effekt auf ES-Zellen haben könnte. Hinweise diesbezüglich

lieferten publizierte Daten, in denen eine Korrelation zwischen Mutationen von BMPR1A und Anomalien des Gastrointestinaltrakts (Polypen, Adenome bis hin zu malignen Tumoren) beschrieben wurde (Zhou *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde durch einen konditionalen *bmpr1a*-KO eine Expansion von proliferativen Zellen im Darm verursacht, die zudem mit einer verstärkten  $\beta$ -Catenin-Aktivierung einherging (He *et al.*, 2004). Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch in *bmpr1a*-defizienten ES-Zellen die  $\beta$ -Catenin-Expression im Vergleich zu *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* ES-Zellen erhöht war. Zudem legen die Ergebnisse dieser Arbeit eine gesteigerte nukleäre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin in ES-Zellen mit deletiertem *bmpr1a* nahe, die für dessen Aktivierung essentiell ist.  $\beta$ -Catenin, gewöhnlich durch Wnt-Signaltransduktion aktiviert, hat eine proliferationsfördernde Wirkung (Miyoshi *et al.*, 1992; Sancho *et al.*, 2003). Daher könnte die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin in ES-Zellen mit inaktiviertem *bmpr1a* einem antiproliferativen Effekt durch fehlende Smad/Id-Aktivierung oder Erk-Inaktivierung (Ying *et al.*, 2003b; Qi *et al.*, 2004) entgegenwirken. Auch in *bmpr1a*-defizienten Zellen des Darms konnte trotz ihrer erhöhten Expansion keine Smad-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Hier wurde die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin durch Inaktivierung des Tumorsuppressors Pten hervorgerufen (He *et al.*, 2004). Ob auch in ES-Zellen mit mutantem *bmpr1a* die verstärkte Expression von  $\beta$ -Catenin durch Inaktivierung von Pten vermittelt wird, bleibt festzustellen. Weiterhin könnte die Bedeutung der  $\beta$ -Catenin-Aktivierung durch eine vergleichende Analyse der Proliferations-fähigen und -defizienten *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* ES-Zellklone besser untersucht werden. Hier wäre von einer Korrelation zwischen  $\beta$ -Catenin-Expression und Proliferationspotential auszugehen, indem besser proliferierende *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* ES-Zellklone über eine stärkere  $\beta$ -Catenin-Expression verfügen.

In Abbildung D 1 sind die Beobachtungen zur *Bmpr1a*-abhängigen Proliferation von ES-Zellen zusammengefasst. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der *Bmpr1a* in ES-Zellen hauptsächlich Proliferations-induzierende Funktionen erfüllt. So wird das Wachstum von ES-Zellen über exogenes *Bmp4* stimuliert und bei *Bmpr1a*-Absenz vermindert oder sogar eingestellt. Nach *bmpr1a*-Deletion könnte dem Vitalitätsverlust von ES-Zellen durch erhöhte  $\beta$ -Catenin Aktivierung entgegengewirkt werden. Damit würde dem *Bmpr1a* in ES-Zellen auch eine Proliferations-reduzierende Rolle zukommen (siehe Abb. D 1A). Außerdem scheint die *Bmp4*-vermittelte Signaltransduktion bei Verlust von *Bmpr1a* durch die fortschreitende

Expression von Alk2 zumindest teilweise kompensiert werden zu können (siehe Abb. D 1B). Auch die intrinsische Expression von *bmps* scheint für die ES-Zell-Proliferation von Bedeutung zu sein (siehe Abb. D 1D). Eine absolute Abhängigkeit von exogenen Bmps ist bei Serumabwesenheit jedoch immer gegeben (siehe Abb. D 1C).



**Abb. D 1: Bmp-induzierte Proliferation von ES-Zellen.**

Die Bindung von Bmps an den Bmpr1a/Bmpr Typ II Komplex führt zu einer Phosphorylierung der Rezeptor-regulierten Smads. Die damit aktivierten Smads bewirken die Induktion der *id1*- und *nanog*-Expression. Hierdurch wird die Proliferation der ES-Zellen induziert. Gleichzeitig trägt die Bmpr1a-vermittelte Inhibition der pro differentiellen Erk-Aktivierung zur Proliferation von ES-Zellen bei. Im Gegensatz dazu wird die  $\beta$ -Catenin-Aktivierung über den Bmpr1a gehemmt. Dies wirkt der Proliferation von ES-Zellen entgegen (A). Außerdem üben Bmps durch den Typ I Bmp-Rezeptor Alk2 mit Hilfe von unbekannten Zielgenen einen Proliferations-induzierenden Effekt auf ES-Zellen aus. Hierdurch kann die Inaktivierung des Bmpr1a kompensiert werden (B). Dagegen ist eine fortschreitende Proliferation bei Entzug von exogenen Bmps nicht möglich (C). Auch die intrinsische Expression von BMPs, welche die Proliferation durch unbekannte Mechanismen unterstützt (D), kann die Erfordernis von exogenen BMPs nicht aufheben.

## D 7 Bmp4-unabhängige neurale Differenzierung von *bmpr1a*-defizienten ES-Zellen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *bmpr1a*-mutante ES-Zellen bei Kultivierung mit Lif und Bmp4 ein eingeschränktes Selbsterneuerungspotential besitzen. Ursächlich hierfür könnte eine erhöhte Apoptoserate von ES-Zellen nach *bmpr1a* Verlust sein. Anhand von mikroskopischen Untersuchungen konnten diesbezüglich jedoch keine Unterschiede wie Schrumpfung und damit verbundenes Ablösen der Zellen zwischen *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* und *bmpr1a<sup>Δ/Δ</sup>* ES-Zellen beobachtet werden (nicht gezeigte Daten). Alternativ könnte die verminderte Proliferation von *bmpr1a*-defizienten ES-Zellen in einer verstärkten Differenzierung begründet sein, wie AP-Färbungen erahnen ließen. In Serum-freiem Medium wird die Pluripotenz von ES-Zellen durch ein Wechselspiel

von Lif- und Bmp4-abhängigen Signaltransduktionswegen aufrechterhalten. Dies beruht auf der Inhibition von Differenzierungen: Lif blockiert die mesodermale/endodermale- und Bmp4 die neurale Differenzierung (Ying *et al.*, 2003b). Es wurde daher in dieser Arbeit überprüft, ob die Bmp4-vermittelte Hemmung der neuronalen Differenzierung in *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen weiterhin gewährleistet ist. Während ES-Zellen mit funktionellem Bmpr1a nur bei Entzug von Bmp4 anteilig zu Neuronen differenzierten, wurde nach Deletion von *bmpr1a* auch mit Bmp4 neuronale Differenzierung beobachtet. Außerdem wurde festgestellt, dass eine Bmp4-vermittelte Smad1/5/8- und *id1*-Induktion bei *bmpr1a*-Defizienz in ES-Zellen nicht länger gegeben ist. Bmp4 induziert *id*-Gene über die Aktivierung von Smad1/5/8 und inhibiert damit die neurale Differenzierung von ES-Zellen (Ying *et al.*, 2003b). *In vivo* Ergebnisse haben zudem gezeigt, dass die Pluripotenz im Epiblast vor der Gastrulation durch Bmp4/Bmpr1a erhalten bleibt. In *bmpr1a*-mutanten Embryonen wurde bereits im Epiblast neurale Differenzierung verbunden mit fehlender Smad1/5/8-Aktivierung nachgewiesen (Di-Gregorio *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen vermuten, dass der Bmpr1a auch *in vitro* für die Inhibition der neuronalen Differenzierung benötigt wird. Diese scheint nach *bmpr1a*-Deletion durch fehlende Smad1/5/8- und *id*-Induktion hervorgerufen zu werden. Die Bmp4-unabhängige neurale Differenzierung mancher ES-Zellen könnte ferner eine Ursache für das verminderte Proliferationspotential nach *bmpr1a*-Deletion sein.

## **D 8            Bmpr1a-unabhängiges gliales Differenzierungspotential von *in vitro* differenzierten neuronalen Vorläuferzellen**

Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist die Bmp-abhängige Inhibition der neuronalen Differenzierung von ES-Zellen an den Bmpr1a gekoppelt. Darüber hinaus konnte aus diversen Analysen geschlossen werden, dass der Bmp-Signaltransduktionsweg auch im weiteren Verlauf der Entwicklung eine wichtige Rolle spielt. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wird die astrozytäre Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen Bmp-vermittelt gefördert und ihre oligodendrogliale Differenzierung durch Bmp inhibiert (Gomes *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 1996; Mabie *et al.*, 1999; Mehler *et al.*, 1995; Samanta *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 1999). Die Inaktivierung des *bmpr1a* in *in vitro* generierten neuronalen Vorläuferzellen könnte daher zu einer verstärkten oligodendroglialen- und einer

verminderten astrozytären Differenzierung führen. Dies sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Um mögliche *in vitro* Artefakte zu vermeiden, wurden zwei verschiedene etablierte Protokolle für die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen aus ES-Zellen verwendet. Diese neuronalen Vorläuferzellen wurden als NS-Zellen bzw. N3EFL-Zellen bezeichnet. In Übereinstimmung mit publizierten Daten (Haupt *et al.*, 2007) wurden mit der HTNCre-Proteintransduktion Rekombinationsraten in N3EFL-Zellen erzielt, die zu einer effizienten Deletion des *bmpr1a* (ca. 90%) führten. Um eine vergleichbar hohe *bmpr1a*-Inaktivierung in NS-Zellen zu erzielen, war während der Transduktion mit HTNCre die gleichzeitige Applikation von Chloroquin erforderlich (A. Smith, persönliche Mitteilung). Bisher war lediglich die alleinige Behandlung mit dem HTNCre-Protein in diversen Zelltypen notwendig, um ausreichend hohe Rekombinationseffizienzen zu erzielen (Peitz *et al.*, 2002; Nolden *et al.*, 2007). Da Chloroquin ähnlich wie das fusogene Peptid TAT-HA zu einer erhöhten endosomolytischen Freisetzung von Proteinen führt (Caron *et al.*, 2004; Sloots & Wels, 2005), kann in NS-Zellen von einer besonders soliden Beschaffenheit intrazellulärer Membranen ausgegangen werden. Die intrazelluläre Rekombinase-Freisetzung stellt einen limitierenden Faktor der Proteintransduktion dar (Kaplan *et al.*, 2005).

Der Verlust des *bmpr1a* in neuronalen Vorläuferzellen bewirkte keine signifikante Veränderung ihres Differenzierungspotentials. Sowohl in N3EFL- als auch in NS-Zellen wurde die Anzahl der Oligodendrozyten nach der Deletion des *bmpr1a* nur geringfügig bzw. gar nicht erhöht. Auch die astrozytäre Differenzierung blieb nahezu komplett unbeeinflusst. Wie sich in weiteren Analysen herausstellte, exprimierten *bmpr1a<sup>fl/fl</sup>* aber auch mutante N3EFL- und NS-Zellen mit den Bmp-Rezeptoren *bmpr1b* und *alk2* weitere Typ I Rezeptoren, die der Bmp-abhängigen Signalweiterleitung dienen können. Eine Bmpr1a-abhängige Induzierbarkeit von Bmpr1b wie sie von Panchision *et al.* (2001) beschrieben wurde, konnte nicht bestätigt werden, da die *bmpr1b*-Expression auch nach *bmpr1a* Inaktivierung konstant blieb. Vermutlich entsprechen N3EFL- und NS-Zellen einem späteren *in vivo* Entwicklungsschritt, in dem sich die *bmpr1b*-Expression bereits stabilisiert hat, bzw. eine Unabhängigkeit von der *bmpr1a*-Expression entwickelt hat. *In vivo* setzt die Expression von *bmpr1b* am embryonalen Tag 9 ein. (Panchision *et al.*, 2001).

Um die Antwort von *bmpr1a* oder die von anderen *bmp*-Rezeptoren auf die Stimulierung mit Bmp4 in neuralen Vorläuferzellen zu überprüfen, wurde in NS-Zellen exemplarisch die Smad-Aktivierung untersucht. Diese war nach *bmpr1a*-Inaktivierung gemindert. Im Vergleich zu *bmpr1a*-mutanten ES-Zellen wurde allerdings in *bmpr1a*-defizienten NS-Zellen eine wesentlich stärkere Smad-Phosphorylierung beobachtet. Hierdurch wird zumindest eine partielle Redundanz von Bmp-Rezeptoren in neuralen Vorläuferzellen bestätigt. Auch *in vivo* Untersuchungen haben eine Redundanz von Bmp-Rezeptoren gezeigt. Im Patterning des dorsalen Rückenmarks bewirkt die alleinige Deletion von *bmpr1a* oder *bmpr1b* keine Unterschiede. Erst die Inaktivierung beider Rezeptoren führt zu einem Verlust von dorsalen Zelltypen (Wine-Lee *et al.*, 2004). Somit scheint die Deletion von *bmpr1a* auch in neuralen Vorläuferzellen durch Bmpr1b kompensiert werden zu können, sodass das neurale Differenzierungspotential unbeeinflusst bleibt.

## E Zusammenfassung

Ortsspezifische Rekombinasen wie Cre und Flpe sind wichtige Werkzeuge zur gezielten Geninaktivierung oder -Überexpression. Die kombinierte Nutzung von Cre und Flpe ermöglicht eine unabhängige und/oder sequentielle Genregulation für die Aufklärung komplexer biologischer Fragestellungen. Diese dualen Rekombinasestrategien sind bislang wegen der vergleichsweise niedrigen Flpe-Effizienz nicht praktikabel. In dieser Arbeit wurden mit einer zellpermeablen Flpe-Rekombinase in murinen ES-Zellen bei unveränderter Zellvitalität Rekombinationseffizienzen von bis zu 45% erreicht. Wie mit dem FC (Flp-ON-Cre-OFF)-Vektor, einer strikt kontrollierbaren, reversibel induzierbaren Expressionskassette, gezeigt werden konnte, ist das Flpe-Transduktionssystem eine optimale Ergänzung für Anwendungen mit der zellpermeablen Cre-Rekombinase.

Der *bmpr1a* wurde *in vitro* mit der zellpermeablen Cre-Rekombinase konditional inaktiviert. Unter Serum-freien Bedingungen ist die Pluripotenzerhaltung von ES-Zellen abhängig von exogenem Bmp4. Die *bmpr1a*-Deletion führte lediglich zu einer eingeschränkten Proliferation und Klonogenität sowie zu einer erniedrigten Expression der Pluripotenz-assoziierten Faktoren *nanog* und *id1*. Die Bmp-vermittelte Inhibition der neuralen Differenzierung bei Serum-Abwesenheit war in *bmpr1a*-defizienten ES-Zellen vermutlich durch die kaum nachweisbare Smad-Aktivierung aufgehoben. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Bmpr1a in ES-Zellen für ihr vollständiges Differenzierungspotential und die uneingeschränkte Fähigkeit zur Selbsterneuerung benötigt wird, gleichzeitig jedoch Kompensationsmechanismen existieren, die dem *bmpr1a*-Verlust entgegenwirken. In weiteren Analysen wurde gezeigt, dass *bmpr1a* mutante ES-Zellen mit *alk2* einen weiteren Typ I Bmp-Rezeptor exprimieren, über eine verstärkte Expression des Proliferations-assoziierten  $\beta$ -Catenin-Proteins verfügen und nur bei erhöhter *bmp2*-Expression fortschreitend proliferieren.

Während der glialen Differenzierung fördern Bmps die Astrogenese und inhibieren die Oligodendrogenese. Nach der *bmpr1a* Inaktivierung in neuralen Vorläufern blieb das astrozytäre und oligodendrogliale Differenzierungspotential unverändert. Möglicherweise war die lediglich verminderte Bmp-abhängige Fähigkeit zur Smad-Aktivierung durch die Expression der Bmp Typ I Rezeptoren *bmpr1b* und *alk2* verursacht worden.

**F Literaturverzeichnis**

- Ahn, K., Mishina, Y., Hanks, M. C., Behringer, R. R. & Crenshaw, E. B. 3rd. (2001). BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. *Development*, **128**, 4449-4461.
- Andreas, S., Schwenk, F., Küter-Luks, B., Faust, N. & Kühn, R. (2002). Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase: activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, **30**, 2299-2306.
- Austin, S., Ziese, M. & Sternberg, N. (1981). A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell*, **25**, 729-736.
- Baba, Y., Nakano, M., Yamada, Y., Saito, I. & Kanegae, Y. (2005). Practical range of effective dose for Cre recombinase-expressing recombinant adenovirus without cell toxicity in mammalian cells. *Microbiol Immunol*, **49**, 559-570.
- Balemans, W. & Van Hul, W. (2002). Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol*, **250**, 231-250.
- Boeuf, H., Hauss, C., Graeve, F. D., Baran, N. & Kedinger, C. (1997). Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J Cell Biol*, **138**, 1207-1217.
- Bosnali, M. & Edenhofer F. (2008). Generation of transducible versions of transcription factors Oct4 and Sox2. *Biol Chem*, **389**, 851-861.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R. & Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, **122**, 947-956.
- Broach, J. R., Guarascio, V. R. & Jayaram, M. (1982). Recombination within the yeast plasmid 2mu circle is site-specific. *Cell*, **29**, 227-234.
- Brüstle, O., Spiro, A. C., Karram, K., Choudhary, K., Okabe, S. & McKay, R. D. (1997). In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14809-14814.
- Brüstle, O., Jones, K. N., Learish, R. D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O. D., Duncan, I. D. & McKay, R. D. (1999). Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*, **285**, 754-756.
- Buchholz, F., Ringrose, L., Angrand, P. O., Rossi, F. & Stewart, A. F. (1996). Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4256-4262.
- Buchholz, F., Angrand, P. O. & Stewart, A. F. (1998). Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol*, **16**, 657-662.
- Buehr, M. & Smith, A. (2003). Genesis of embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **358**, 1397-1402.

- Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J. & Smith, A. (1999). Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*, **210**, 30-43.
- Caron, N. J., Quenneville, S. P. & Tremblay, J. P. (2004). Endosome disruption enhances the functional nuclear delivery of Tat-fusion proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **319**, 12-20.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, **113**, 5643-5655.
- Chambers, I. & Smith, A. (2004). Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*, **23**, 7150-7160.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L. & Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, **450**, 1230-1234.
- Chen, D., Zhao, M. & Mundy, G. R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, **22**, 233-241.
- Chidgey, A. P., Layton, D., Trounson, A. & Boyd, R. L. (2008). Tolerance strategies for stem-cell-based therapies. *Nature*, **453**, 330-337.
- Conway, A. B., Chen, Y. & Rice, P. A. (2003). Structural plasticity of the Flp-Holliday junction complex. *J Mol Biol*, **326**, 425-434.
- Dahéron, L., Opitz, S. L., Zaehres, H., Lensch, M. W., Andrews, P. W., Itskovitz-Eldor, J. & Daley, G. Q. (2004). LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, **22**, 770-778.
- Daley, G. Q. (2003). From embryos to embryoid bodies: generating blood from embryonic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*, **996**, 122-131.
- de Alboran, I. M., O'Hagan, R. C., Gärtner, F., Malynn, B., Davidson, L., Rickert, R., Rajewsky, K., DePinho, R. A. & Alt, F. W. (2001). Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity*, **14**, 45-55.
- Derynck, R. & Feng, X. H. (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta*, **1333**, F105-150.
- Derynck, R. & Zhang Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, **425**, 577-584.
- de Sousa Lopes, S. M., Roelen, B. A., Monteiro, R. M., Emmens, R., Lin, H. Y., Li, E., Lawson, K. A. & Mummery, C. L. (2004). BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*, **18**, 1838-1849.
- Dietz, G. P. & Bähr, M. (2004). Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci*, **27**, 85-131.
- Di-Gregorio, A., Sancho, M., Stuckey, D. W., Crompton, L. A., Godwin, J., Mishina, Y. & Rodriguez, T. A. (2007). BMP signalling inhibits premature neural differentiation in the mouse embryo. *Development*, **134**, 3359-3369.

- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., Wichterle, H., Henderson, C. E. & Eggan, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, **321**, 1218-1221.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T. & Miyazono, K. (2001). Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem*, **276**, 12477-12480.
- El-Bizri, N., Guignabert, C., Wang, L., Cheng, A., Stankunas, K., Chang, C. P., Mishina, Y. & Rabinovitch, M. (2008). SM22alpha-targeted deletion of bone morphogenetic protein receptor 1A in mice impairs cardiac and vascular development, and influences organogenesis. *Development*, **135**, 2981-2991.
- Elliott, G. & O'Hare, P. (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, **88**, 223-233.
- Evans, M. J. & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, **292**, 154-156.
- Falnes, P. O. & Sandvig, K. (2000). Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 407-413.
- Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L. L., Pepinsky, B. & Barsoum, J. (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 664-668.
- Frankel, A. D. & Pabo, C. O. (1988). Fingering too many proteins. *Cell*, **53**, 675.
- Glaser, T., Pollard, S. M., Smith, A. & Brüstle, O. (2007). Tripotential differentiation of adherently expandable neural stem (NS) cells. *PLoS One*, **2**, e298.
- Gomes, W. A., Mehler, M. F. & Kessler, J. A. (2003). Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Dev Biol*, **255**, 164-177.
- Gossrau, G., Thiele, J., Konang, R., Schmandt, T. & Brüstle, O. (2007). Bone morphogenetic protein-mediated modulation of lineage diversification during neural differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells*, **25**, 939-949.
- Goumans, M. J. & Mummery, C. (2000). Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol*, **44**, 253-265.
- Green, M. & Loewenstein, P. M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*, **55**, 1179-1188.
- Gross, R. E., Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zang, Z., Santschi, L. & Kessler, J. A. (1996). Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron*, **17**, 595-606.
- Gu, H., Zou, Y. R. & Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell*, **73**, 1155-1164.
- Hakansson, S., Jacobs, A. & Caffrey, M. (2001). Heparin binding by the HIV-1 tat protein transduction domain. *Protein Sci*, **10**, 2138-2139.

- Hamazaki, T., Oka, M., Yamanaka, S. & Terada N. (2004). Aggregation of embryonic stem cells induces Nanog repression and primitive endoderm differentiation. *J Cell Sci*, **117**, 5681-5686.
- Hartwig, S., Bridgewater, D., Di Giovanni, V., Cain, J., Mishina, Y. & Rosenblum, N. D. (2008). BMP receptor ALK3 controls collecting system development. *J Am Soc Nephrol*, **19**, 117-124.
- Haupt, S., Edenhofer, F., Peitz, M., Leinhaas, A. & Brüstle, O. (2007). Stage-specific conditional mutagenesis in mouse embryonic stem cell-derived neural cells and postmitotic neurons by direct delivery of biologically active Cre recombinase. *Stem Cells*, **25**, 181-188.
- He, X. C., Zhang, J., Tong, W. G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D. H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L. M., Mishina, Y. & Li, L. (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet*, **36**, 1117-1121.
- Hollnagel, A., Oehlmann, V., Heymer, J., Rütter, U. & Nordheim, A. (1999). Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, **274**, 19838-19845.
- Humphrey, R. K., Beattie, G. M., Lopez, A. D., Bucay, N., King, C. C., Firpo, M. T., Rose-John, S. & Hayek, A. (2004). Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells*, **22**, 522-530
- Itoh, F., Asao, H., Sugamura, K., Heldin, C. H., ten Dijke, P. & Itoh, S. (2001). Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *EMBO J*, **20**, 4132-2142.
- Jaenisch, R. & Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, **132**, 567-582.
- Jans, D. A. & Hassan, G. (1998). Nuclear targeting by growth factors, cytokines, and their receptors: a role in signaling? *Bioessays*, **20**, 400-411.
- Jayaram, M. (1985). Two-micrometer circle site-specific recombination: the minimal substrate and the possible role of flanking sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 5875-5879.
- Johnson, C. E., Crawford B. E., Stavridis, M., Ten Dam, G., Wat, A. L., Rushton, G., Ward, C. M., Wilson, V., van Kuppevelt, T. H., Esko, J. D., Smith, A., Gallagher, J. T. & Merry, C. L. (2007). Essential alterations of heparan sulfate during the differentiation of embryonic stem cells to Sox1-enhanced green fluorescent protein-expressing neural progenitor cells. *Stem Cells*, **25**, 1913-1923.
- Jungverdorben, J. (2007). Etablierung eines reversibel-induzierbaren Überexpressionssystems in humanen ES-Zellen und die exemplarische Anwendung auf Cdx2. Diplomarbeit.
- Kaartinen, V. & Nagy A. (2001). Removal of the floxed neo gene from a conditional knockout allele by the adenoviral Cre recombinase in vivo. *Genesis*, **31**, 126-129.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P. & Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, **458**, 771-775.

- Kamiya, N., Ye, L., Kobayashi, T., Mochida, Y., Yamauchi, M., Kronenberg, H. M., Feng, J. Q. & Mishina, Y. (2008). BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway. *Development*, **135**, 3801-3811.
- Kaplan, I. M., Wadia, J. S. & Dowdy, S. F. (2005). Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control Release*, **102**, 247-253.
- Kaul, A., Köster, M., Neuhaus, H. & Braun, T. (2000). Myf-5 revisited: loss of early myotome formation does not lead to a rib phenotype in homozygous Myf-5 mutant mice. *Cell*, **102**, 17-19.
- Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodríguez-Gómez J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S. H., Nguyen, J., Sánchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K. & McKay, R. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, **418**, 50-56.
- Kirsch, T., Sebald, W. & Dreyer, M. K. (2000). Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol*, **7**, 492-496.
- Klug, M. G., Soonpaa, M. H., Koh, G. Y. & Field, L. J. (1996). Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest*, **98**, 216-2124.
- Kondo, T., Sheets, P. L., Zopf, D. A., Aloor, H. L., Cummins, T. R., Chan, R. J. & Hashino, E. (2008). Tlx3 exerts context-dependent transcriptional regulation and promotes neuronal differentiation from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 5780-5785.
- Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B. Jr., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L. & Westphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6232-6236.
- Landry, J. R., Kinston, S., Knezevic, K., de Bruijn, M. F., Wilson, N., Nottingham, W. T., Peitz, M., Edenhofer, F., Pimanda, J. E., Ottersbach, K. & Göttgens, B. (2008). Runx genes are direct targets of Scl/Tal1 in the yolk sac and fetal liver. *Blood*, **111**, 3005-3014.
- Lee, M. K., Tuttle, J. B., Rebhun, L. I., Cleveland, D. W. & Frankfurter, A. (1990). The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton*, **17**, 118-132.
- Li, F., Lu, S., Vida, L., Thomson, J. A. & Honig, G. R. (2001). Bone morphogenetic protein 4 induces efficient hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in vitro. *Blood*, **98**, 335-342.
- Li Song, D. & Joyner, A. L. (2000). Two Pax2/5/8-binding sites in Engrailed2 are required for proper initiation of endogenous mid-hindbrain expression. *Mech Dev*, **90**, 155-165.
- Lo, L. C., Johnson, J. E., Wuenschell, C. W., Saito, T. & Anderson, D. J. (1991). Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev*, **5**, 1524-1537.

- Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K. Y., Sung, K. W., Lee, C. W., Zhao, X. D., Chiu, K. P., Lipovich, L., Kuznetsov, V. A., Robson, P., Stanton, L. W., Wei, C. L., Ruan, Y., Lim, B. & Ng, H. H. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*, **38**, 431-440.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A. & Jonkers J. (2001). Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9209-9214.
- Luyten, F. P., Cunningham, N. S., Ma, S., Muthukumaran, N., Hammonds, R. G., Nevins, W. B., Woods, W. I. & Reddi A. H. (1989). Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem*, **264**, 13377-13380.
- Mabie, P. C., Mehler, M. F. & Kessler, J. A. (1999). Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype. *J Neurosci*, **19**, 7077-7088.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., Plath, K. & Hochedlinger, K. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, **1**, 55-70.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 7634-7638.
- Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, **67**, 753-791.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A., Ko, M. S. & Niwa, H. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, **9**, 625-635.
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T. & Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*, **18**, 4261-4269.
- Mehler, M. F., Marmur, R., Gross, R., Mabie, P. C., Zang, Z., Papavasiliou, A. & Kessler, J. A. (1995). Cytokines regulate the cellular phenotype of developing neural lineage species. *Int J Dev Neurosci*, **13**, 213-240.
- Mishina, Y., Suzuki, A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Ueno, N. & Behringer, R. R. (1995a). Genomic organization and chromosomal location of the mouse type I BMP-2/4 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **206**, 310-317.
- Mishina, Y., Suzuki, A., Ueno, N. & Behringer, R. R. (1995b). Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev*, **9**, 3027-3037.
- Mishina, Y., Hanks, M. C., Miura, S., Tallquist, M. D. & Behringer, R. R. (2002). Generation of Bmpr/Alk3 conditional knockout mice. *Genesis*, **32**, 69-72.
- Mishina, Y. (2003). Function of bone morphogenetic protein signaling during mouse development. *Front Biosci*, **8**, d855-869.

- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. & Yamanaka S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, **113**, 631-642.
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T. & Miyazono, K. (2002). Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells*, **7**, 1191-1204.
- Miyazono, K. & Miyazawa, K. (2002). Id: a target of BMP signaling. *Sci STKE*, **2002**, PE40.
- Miyoshi, Y., Ando, H., Nagase, H., Nishisho, I., Horii, A., Miki, Y., Mori, T., Utsunomiya, J., Baba, S., Petersen, G., *et al.* (1992). Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4452-4456.
- Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K. & Yamanaka, S. (2004). mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **24**, 6710-6718.
- Mutschler, E. (1997). Chemotherapie und Viruserkrankungen. *Arzneimittelwirkungen*, 725-730.
- Nakayama, N., Lee, J. & Chiu, L. (2000). Vascular endothelial growth factor synergistically enhances bone morphogenetic protein-4-dependent lymphohematopoietic cell generation from embryonic stem cells in vitro. *Blood*, **95**, 2275-2283.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H. & Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, **95**, 379-391.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. & Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, **12**, 2048-2060.
- Nolden, L., Edenhofer, F., Haupt, S., Koch, P., Wunderlich, F. T., Siemen, H. & Brüstle, O. (2006). Site-specific recombination in human embryonic stem cells induced by cell-permeant Cre recombinase. *Nat Methods*, **3**, 461-467.
- Nolden, L., Edenhofer F., Peitz, M. & Brüstle, O. (2007). Stem cell engineering using transducible Cre recombinase. *Methods Mol Med*, **140**, 17-32.
- Nolden, L. & Brüstle, O. (2008). [Human embryonic stem cells. Perspectives for the study and therapy of neurological disorders]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, **51**, 1026-1032.
- Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, **448**, 313-317.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, **322**, 949-953.
- Onichtchouk, D., Chen, Y. G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massagué, J. & Niehrs, C. (1999). Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, **401**, 480-485.

- Orvis, G. D., Jamin, S. P., Kwan, K. M., Mishina, Y., Kaartinen, V. M., Huang, S., Roberts, A. B., Umans, L., Huylebroeck, D., Zwijsen, A., Wang, D., Martin, J. F. & Behringer, R. R. (2008). Functional redundancy of TGF-beta family type I receptors and receptor-Smads in mediating anti-Mullerian hormone-induced Mullerian duct regression in the mouse. *Biol Reprod*, **78**, 994-1001.
- Otero, J. J., Fu, W., Kan, L., Cuadra, A. E. & Kessler, J. A. (2004). Beta-catenin signaling is required for neural differentiation of embryonic stem cells. *Development*, **131**, 3545-3557.
- Panchision, D. M., Pickel, J. M., Studer, L., Lee, S. H., Turner, P. A., Hazel, T. G. & McKay, R. D. (2001). Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev*, **15**, 2094-2110.
- Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K. & Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, **134**, 877-886.
- Patsch, C. (2005). Untersuchungen zur Proteintransduktion der Flp-Rekombinase in Säugerzellen. Diplomarbeit.
- Patsch, C. & Edenhofer, F. Conditional mutagenesis by cell-permeable proteins: potential, limitations and prospects. (2007). *Handb Exp Pharmacol*, 203-232.
- Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K. & Edenhofer, F. (2002). Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4489-4494.
- Peitz, M., Jäger, R., Patsch, C., Jäger, A., Egert, A., Schorle, H. & Edenhofer, F. (2007). Enhanced purification of cell-permeant Cre and germline transmission after transduction into mouse embryonic stem cells. *Genesis*, **45**, 508-517.
- Pera, M. F., Andrade, J., Houssami, S., Reubinoff, B., Trounson, A., Stanley, E. G., Ward-van Oostwaard, D. & Mummery, C. (2004). Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J Cell Sci*, **117**, 1269-1280.
- Pfeifer, A., Brandon, E. P., Kootstra, N., Gage, F. H. & Verma, I. M. (2001). Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11450-11455.
- Prochiantz, A. (2000). Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 400-406.
- Qi, X., Li, T. G., Hao, J., Hu, J., Wang, J., Simmons, H., Miura, S., Mishina, Y. & Zhao, G. Q. (2004). BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6027-6032.
- Ringrose, L., Lounnas, V., Ehrlich, L., Buchholz, F., Wade, R. & Stewart, A. F. (1998). Comparative kinetic analysis of FLP and cre recombinases: mathematical models for DNA binding and recombination. *J Mol Biol*, **284**, 363-384.
- Rogers, M. B., Hosler, B. A. & Gudas, L. J. (1991). Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. *Development*, **113**, 815-824.

- Rusnati, M., Coltrini, D., Oreste, P., Zoppetti, G., Albini, A., Noonan, D., d'Adda di Fagagna, F., Giacca, M. & Presta, M. (1997). Interaction of HIV-1 Tat protein with heparin. Role of the backbone structure, sulfation, and size. *J Biol Chem*, **272**, 11313-11320.
- Samanta, J., Burke, G. M., McGuire, T., Pisarek, A. J., Mukhopadhyay, A., Mishina, Y. & Kessler, J. A. (2007). BMPR1a signaling determines numbers of oligodendrocytes and calbindin-expressing interneurons in the cortex. *J Neurosci*, **27**, 7397-7407.
- Sancho, E., Batlle, E. & Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 763-770.
- Sato, N., Sanjuan, I. M., Heke, M., Uchida, M., Naef, F. & Brivanlou, A. H. (2003). Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev Biol*, **260**, 404-413.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A. H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*, **10**, 55- 63.
- Sauer, B. & McDermott, J. (2004). DNA recombination with a heterospecific Cre homolog identified from comparison of the pac-c1 regions of P1-related phages. *Nucleic Acids Res*, **32**, 6086-6095.
- Schaft, J., Ashery-Padan, R., van der Hoeven, F., Gruss, P. & Stewart, A. F. (2001). Efficient FLP recombination in mouse ES cells and oocytes. *Genesis*, **31**, 6-10.
- Schmidt, E. E., Taylor, D. S., Prigge, J. R., Barnett, S. & Capecchi, M. R. (2000). Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13702-13707.
- Schmidt, C. & Patel, K. (2005). Wnts and the neural crest. *Anat Embryol (Berl)*, **209**, 349-355.
- Schmierer, B. & Hill, C. S. (2007). TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 970-982.
- Schuldiner, M., Itskovitz-Eldor, J. & Benvenisty, N. (2003). Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "suicide" gene. *Stem Cells*, **21**, 257-265.
- Shi, Y. & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, **113**, 685-700.
- Silver, D. P. & Livingston, D. M. (2001). Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol Cell*, **8**, 233-243.
- Sirard, C., de la Pompa, J. L., Elia, A., Itie, A., Mirtsos, C., Cheung, A., Hahn, S., Wakeham, A., Schwartz, L., Kern, S. E., Rossant, J. & Mak, T. W. (1998). The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev*, **12**, 107-119.
- Sloots, A. & Wels, W. S. (2005). Recombinant derivatives of the human high-mobility group protein HMGB2 mediate efficient nonviral gene delivery. *FEBS J*, **272**, 4221-4236.

- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M. & Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, **336**, 688-690.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*, **21**, 70-71.
- Sun, J., Chen, H., Chen, C., Whitsett, J. A., Mishina, Y., Bringas, P. Jr., Ma, J. C., Warburton, D. & Shi, W. (2008). Prenatal lung epithelial cell-specific abrogation of Alk3-bone morphogenetic protein signaling causes neonatal respiratory distress by disrupting distal airway formation. *Am J Pathol*, **172**, 571-582.
- Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F. H., Rodríguez-Esteban, C. & Izpisua Belmonte, J. C. (2006). Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10294-10299.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663-676.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, **282**, 1145-1147.
- Toniatti, C., Bujard, H., Cortese, R. & Ciliberto, G. (2004). Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. *Gene Ther*, **11**, 649-657.
- Tropepe, V., Hitoshi, S., Sirard, C., Mak, T. W., Rossant, J. & van der Kooy, D. (2001). Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron*, **30**, 65-78.
- Tünnemann, G., Martin, R. M., Haupt, S., Patsch, C., Edenhofer, F. & Cardoso, M. C. (2006). Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *FASEB J*, **20**, 1775-1784.
- Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science*, **150**, 893-899.
- Wadia, J. S., Stan, R. V. & Dowdy, S. F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med*, **10**, 310-315.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B. E. & Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, **448**, 318-324.
- Williams, R., Hilton, D., Pease, S., Willson, T., Stewart, C., Gearing, D., Wagner, E., Metcalf, D., Nicola, N. & Gough, N. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, **336**, 684-687.
- Wilson, S. I. & Edlund, T. (2001). Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci*, **4**, 1161-1168.
- Wine-Lee, L., Ahn, K. J., Richardson, R. D., Mishina, Y., Lyons, K. M. & Crenshaw, E. B. 3rd. (2004). Signaling through BMP type 1 receptors is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal cord. *Development*, **131**, 5393-5403.

- Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H. K. & Nagy, A. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, **458**, 766-770.
- Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz R. W., Hewick, R. M. & Wang, E. A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, **242**, 1528-1534.
- Wozney, J. M. (1992). The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev*, **32**, 160-167.
- Wunderlich, F. T. (2004). Generation of inducible Cre systems for conditional gene inactivation in mice. Dissertation.
- Xiao, Y. T., Xiang, L. X. & Shao, J. Z. (2007). Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **362**, 550-553.
- Xu, R. H., Chen, X., Li, D. S., Li, R., Addicks, G. C., Glennon, C., Zwaka, T. P. & Thomson, J. A. (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol*, **20**, 1261-1264.
- Yamamoto, H., Quinn, G., Asari, A., Yamanokuchi, H., Teratani, T., Terada, M. & Ochiya, T. (2003). Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology*, **37**, 983-993.
- Ying, Q. L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M. & Smith, A. (2003a). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol*, **21**, 183-186.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. (2003b). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, **115**, 281-292.
- Yu, X., Zhan, X., D'Costa, J., Tanavde, V. M., Ye, Z., Peng, T., Malehorn, M. T., Yang, X., Civin, C. I. & Cheng, L. (2003). Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells. *Mol Ther*, **7**, 827-838.
- Zhang, J. & Li, L. (2005). BMP signaling and stem cell regulation. *Dev Biol*, **284**, 1-11.
- Zhao, G. Q. (2003). Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis*, **35**, 43-56.
- Zhou, X. P., Woodford-Richens, K., Lehtonen, R., Kurose, K., Aldred, M., Hampel, H., Launonen, V., Virta, S., Pilarski, R., Salovaara, R., Bodmer, W. F., Conrad, B. A., Dunlop, M., Hodgson, S. V., Iwama, T., Järvinen, H., Kellokumpu, I., Kim, J. C., Leggett, B., Markie, D., Mecklin, J. P., Neale, K., Phillips, R., Piris, J., Rozen, P., Houlston, R. S., Aaltonen, L. A., Tomlinson, I. P. & Eng, C. (2001). Germline mutations in BMPR1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes. *Am J Hum Genet*, **69**, 704-711.
- Zhou, B. Y., Ye, Z., Chen, G., Gao, Z. P., Zhang, Y. A. & Cheng, L. (2007). Inducible and reversible transgene expression in human stem cells after efficient and stable gene transfer. *Stem Cells*, **25**, 779-789.

Zhu, G., Mehler, M. F., Mabie, P. C. & Kessler, J. A. (2000). Developmental changes in progenitor cell responsiveness to cytokines. *J Neurosci Res*, **56**, 131-145.

## **G 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 April 2010

## H Eigene Publikationen

Christoph Patsch, Michael Peitz, David M. Otte, Daniela Kessler, Johannes Jungverdorben, F. Thomas Wunderlich, Oliver Brüstle, Andreas Zimmer, & Frank Edenhofer. Engineering Cell-Permeant FLP Recombinase for Tightly Controlled Inducible and Reversible Overexpression in Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, **28**, 894-902.

Christoph Patsch, Daniela Kessler & Frank Edenhofer. Genetic engineering of mammalian cells by direct delivery of FLP recombinase protein. *Methods* (unter Begutachtung).

Daniela Kessler, Oliver Brüstle & Frank Edenhofer. Deletion of *Bmpr1a* Promotes Neural Differentiation and Reduces Self Renewal Capacity of ES Cells (in Vorbereitung).

## I Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Brüstle für die Betreuung dieser Dissertation und die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Weiterhin möchte ich mich herzlich für die stete Diskussionsbereitschaft bedanken, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit in diesem spannenden Forschungsumfeld beigetragen hat.

Herrn PD Dr. Edenhofer danke ich für die interessanten und herausfordernden Projekte und die wissenschaftlichen Diskussionen.

Bei Herrn Prof Dr. Schorle bedanke ich mich für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. Fürst und Frau PD Dr. van Echten-Deckert danke ich für die spontane Zusage, der Prüfungskommission als fachnahes und fachangrenzendes Mitglied beizutreten.

Allen SCEG-Mitgliedern danke ich für die wertvollen Diskussionen und eine unvergessliche Zeit. Ihr habt mir mit Eurer steten Hilfsbereitschaft und dem Spaß im Laboralltag auch über schwere Zeiten hinweggeholfen.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Rekonstruktive Neurobiologie möchte ich mich für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken.

Einen besonderen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen. Mein größter Dank gilt meiner Oma und meinem Vater, die immer an mich und das Gelingen dieser Arbeit geglaubt und mich stets in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Auch einen besonders lieben Dank an Fritz für alles, was Du für mich getan hast und dass Du mit Deinem positiven Elan immer für mich da warst.

Vielen, vielen Dank an all meine tollen Freunde! Ich bin sehr froh, dass ich Euch hab!