

**Etablierung eines konditionalen Expressionssystems zur
Analyse des Transkriptionsfaktors Sox2 in murinen und
humanen ES-Zellen**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christoph Patsch

aus

Heidelberg

Bonn, August 2010

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Brüstle

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hoch

Erscheinungsjahr: 2011

Tag der Promotion: 22.11.2010

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
b-Gal	Beta-Galaktosidase
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
bp	Basenpaar
CIS	Cre-induzierbare-Sox2 Zellen
CV1-5B	Transgene Zell-Linie Klon 5B aus Fibroblasten der grünen Meerkatze
d	Tag
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
Feeder	mitotisch inaktivierte embryonale Mausfibroblasten
FLAG-tag	DYKDDDDK
FKS	Fötales Kälber-Serum
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
h	Stunde
HEPES	N-2 Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	Gen der β -Galaktosidase
LB	Luria Bertani Medium
LIF	Leukemia Inhibitory Factor

M	Mol pro Liter
MEF	murine embryonale Fibroblasten
mg	Miligramm
min	Minute
ml	Mililiter
µl	Mikroliter
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
MPW	Milipore-Wasser (entionisiertes Wasser)
MWCO	Molecular weight cut-off
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetic acid
nm	Nanometer
NLS	Kernlokalisierungssignal
OD	Optische Dichte
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkription
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
s	Sekunde
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-Galaktopyranosid

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
INHALTSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Embryonale Stammzellen	1
1.1.1 Intrinsische Pluripotenzfaktoren	2
1.1.1.1 Sox2 in der Pluripotenzerhaltung von ES-Zellen	5
1.1.1.2 Sox2 in der frühen neuralen Entwicklung	8
1.1.2 Extrinsische Pluripotenzfaktoren	9
1.1.3 Methoden zur genetischen Manipulation von ES-Zellen	13
1.2 Ortsspezifische DNA-Rekombinasen	14
1.3 Proteintransduktion	19
1.3.1 Proteintransduktionsdomäne	19
1.3.2 Mechanismus der PTD-vermittelten-Transduktion	20
1.4 Zielsetzung der Arbeit	24
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemische und biologische Werkstoffe	25
2.1.1 Geräte	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3 Chemikalien allgemein	27
2.1.4 Materialien und Chemikalien für proteinbiochemische Methoden	27
2.1.5 Materialien und Chemikalien für molekularbiologische Methoden	27
2.1.6 Materialien und Chemikalien für zellbiologische Methoden	28
2.1.7 Antikörper	29
2.1.8 Enzyme	30
2.1.9 Synthetische Oligonukleotide	30
2.1.10 Inhibitoren	31
2.1.11 Plasmide	31
2.1.12 Bakterienstämme	32
2.1.13 Bakteriennährmedien	32
2.1.14 Säugetierzelllinien	33
2.1.15 Zellkulturmedien	34
2.1.16 Zelladhäsionsfaktoren	36
2.2 Molekularbiologie	37
2.2.1 Photometrische Quantifizierung von DNA	37
2.2.2 Präparation von DNA	37
2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel	40
	III

2.2.4	Southern Blot-Analyse	40
2.2.5	DNA-Sequenzierungen	42
2.2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	43
2.2.1	Durchflusszytometrie	46
2.2.2	Chemisch kompetente Bakterien	46
2.2.3	SDS-PAGE	48
2.2.4	Western Blot	50
2.3	Expression rekombinanter Proteine	52
2.4	Präparation rekombinanter Proteine	53
2.4.1	Native Affinitätschromatographie von TAT-Cre	53
2.4.2	Native Affinitätschromatographie von TAT-Dre	54
2.4.3	Native Affinitätschromatographie von TAT-FLP	54
2.4.4	Überführung von TAT-Cre in einen Glycerinpuffer	55
2.4.5	Überführung von TAT-Dre in einen Glycerinpuffer und Aufkonzentration	56
2.4.6	Überführung von TAT-FLP in einen Glycerinpuffer und Aufkonzentration	57
2.5	Zellkultur	57
2.5.1	Fibroblasten	58
2.5.2	Embryonale Stammzellen der Maus	59
2.5.2.1	Spontane Differenzierung muriner ES-Zellen	60
2.5.3	Embryonale Stammzellen des Menschen	60
2.5.3.1	Spontane Differenzierung von humanen ES-Zellen	61
2.5.3.2	Neurale Konversion von adhärenenten humanen ES-Zellen	62
2.5.4	DNA-Transfektion	64
2.5.4.1	Transiente Transfektion (Lipofektion)	64
2.5.4.2	Stabile Transfektion (Elektroporation)	65
2.5.4.3	Virale Transduktion	66
2.5.5	Cre-Transduktion	68
2.5.6	Dre-Transduktion	69
2.5.7	FLP-Transduktion	70
2.5.8	RNA-Interferenz	71
2.5.8.1	Short interfering RNA (siRNA)	71
2.5.8.2	short hairpin RNA (shRNA)	72
2.6	Immunzytochemie und Immunfluoreszenzfärbung	74
3	ERGEBNISTEIL	75
3.1	Etablierung genetischer Werkzeuge	75
3.1.1	Optimierung der FLP-Transduktion in ES-Zellen der Maus	75
3.1.1.1	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der FLP-Transduktion	76
3.1.1.2	TAT-FLP behandelte ES-Zellen behalten ihr Potenzial zur Keimbahngängigkeit	78
3.1.2	Etablierung der Dre-Rekombinase als neues genetisches Werkzeug	78
3.1.2.1	Herstellung einer transduzierbaren Dre-Rekombinase	79
3.1.2.2	Herstellung eines liganden-induzierbaren Dre-Fusionsproteins	88

3.2 Funktionale Analyse des Transkriptionsfaktors Sox2 in murinen ES-Zellen	91
3.2.1 <i>Loss-of-function</i> Studie mittels Cre-induzierte Sox2 RNAi	92
3.2.2 <i>Gain-of-function</i> Studie mittels Cre-induzierbarer Überexpression von Sox2	96
3.2.2.1 Herstellung einer reversibel induzierbaren Expressionskassette	96
3.2.2.2 Validierung einer Cre-induzierbaren Überexpression von Sox2 in ES-Zellen	98
3.2.2.3 Nachweis der biologischen Funktionalität von transgenem Sox2	100
3.2.2.4 In ES-Zellen induziert eine Cre-vermittelte Sox2 Überexpression Apoptose	102
3.2.2.1 Entzug der extrinsischen Pluripotenzhaltungsfaktoren LIF und BMP4	104
3.2.2.2 Einfluss der ektopischen Sox2 Expression auf das spontane Differenzierungsverhalten von murinen ES-Zellen	105
3.3 Funktionale Analyse von SOX2 in humanen ES-Zellen	107
3.3.1 <i>Gain-of-function</i> Studie mittels Cre-induzierbarer Überexpression von SOX2	107
3.3.1.1 Validierung einer Cre-induzierbaren SOX2-Überexpression	107
3.3.1.2 Entzug des extrinsischen Pluripotenzhaltungsfaktors FGF-2 in humanen Cre-Induzierbaren-SOX2 ES-Zellen	109
3.3.1.3 Einfluss der ektopische SOX2 Expression auf die spontane Differenzierung von humanen ES-Zellen	110
3.3.1.4 Einfluss der ektopischen SOX2 Expression bei der direkten Konversion von humanen ES-Zellen in neurale Vorläuferzellen	115
4 DISKUSSION	119
4.1 Entwicklung und Optimierung neuer genetischer Werkzeuge	119
4.1.1 FLP-Proteintransduktion in embryonalen Stammzellen der Maus	119
4.1.2 Herstellung einer transduzierbaren Dre-Rekombinase	121
4.1.3 Herstellung eines liganden-induzierbaren Dre-Fusionsproteins	124
4.2 Genfunktionsanalysen des Transkriptionsfaktors Sox2	126
4.2.1 Cre-induzierbare Sox2 RNAi in murinen ES-Zellen	126
4.2.2 Cre-induzierbarer Sox2/SOX2-Überexpression in murinen und humanen ES-Zellen	127
4.2.3 SOX2 Expression fördert die direkte Konversion von humanen ES-Zellen in neurale Vorläuferzellen	133
4.3 Ausblick	135
5 ZUSAMMENFASSUNG	137
6 LITERATURVERZEICHNIS	139
7 EIGENE PUBLIKATIONEN	151
8 DANKSAGUNG	152
9 ERKLÄRUNG	154

1 Einleitung

1.1 Embryonale Stammzellen

Aufgrund ihres Ursprungs sind humane embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sowohl für die Entwicklungsbiologie als auch für therapeutische Ansätze in der Medizin von besonderem Interesse. Dieses *in vitro* System ermöglicht es, über die Modulation von Genfunktionen, molekulare Mechanismen zu entschlüsseln, die zum einen mit zellulären Prozessen der menschlichen Entwicklung oder zum anderen mit der Entstehung von Erkrankungen des menschlichen Organismus assoziiert sind.

Ursprung und Eigenschaften von embryonalen Stammzellen

Embryonen der Präimplantationsphase und der frühen Postimplantationsphase haben eine Population von pluripotenten Zellen, die das Potenzial haben, über die Ausbildung der drei Keimblätter in alle Zelltypen des adulten Organismus zu differenzieren. Per Definition beschreibt Pluripotenz die Fähigkeit einer Zelle keimblattübergreifend alle adulten Zelltypen, nicht jedoch extraembryonale Zelltypen auszubilden. Totipotenz beschreibt die Fähigkeit einer Zelle alle Zelltypen auszubilden, sowohl die embryonalen als auch die extraembryonalen. Nur befruchtete Eizellen (Zygoten) und Blastomere der ersten Teilungen sind dazu in der Lage (Abb. 1.1). Die Innere Zellmasse (IZM) einer Blastozyste dient als Quelle für die Gewinnung von embryonalen Stammzellen. Die pluripotenten Zellen der Inneren Zellmasse können *in vitro* als stabile selbsterneuernde Zellpopulation zeitlich unbegrenzt kultiviert werden. Dies wurde 1981 zum ersten Mal für Zellen der Maus (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981) und 1998 für Zellen des Menschen gezeigt (Thomson et al., 1998). Die Eigenschaft der Pluripotenz macht ES-Zellen für entwicklungsbiologische Studien, aber auch für Zellersatz-Therapien interessant.

Humane und murine ES-Zellen benötigen für ihre *in vitro* Kultivierung unterschiedliche Bedingungen. Diese Unterschiede könnten ein Hinweis darauf sein, dass humane und murine ES-Zellen unterschiedliche Entwicklungsstadien widerspiegeln. Die Pluripotenz von ES-Zellen und Zellen der IZM wird über ein präzise ausbalanciertes Transkriptionsnetzwerk, das abhängig von intrinsischen (Abb. 1.2) und extrinsischen Faktoren (Abb. 1.3) ist, aufrechterhalten. Die intrinsischen Faktoren umfassen hauptsächlich Transkriptionsfaktoren, aber auch epigenetische Faktoren spielen eine wichtige Rolle (Boyer et al., 2006; Lee et al., 2006).

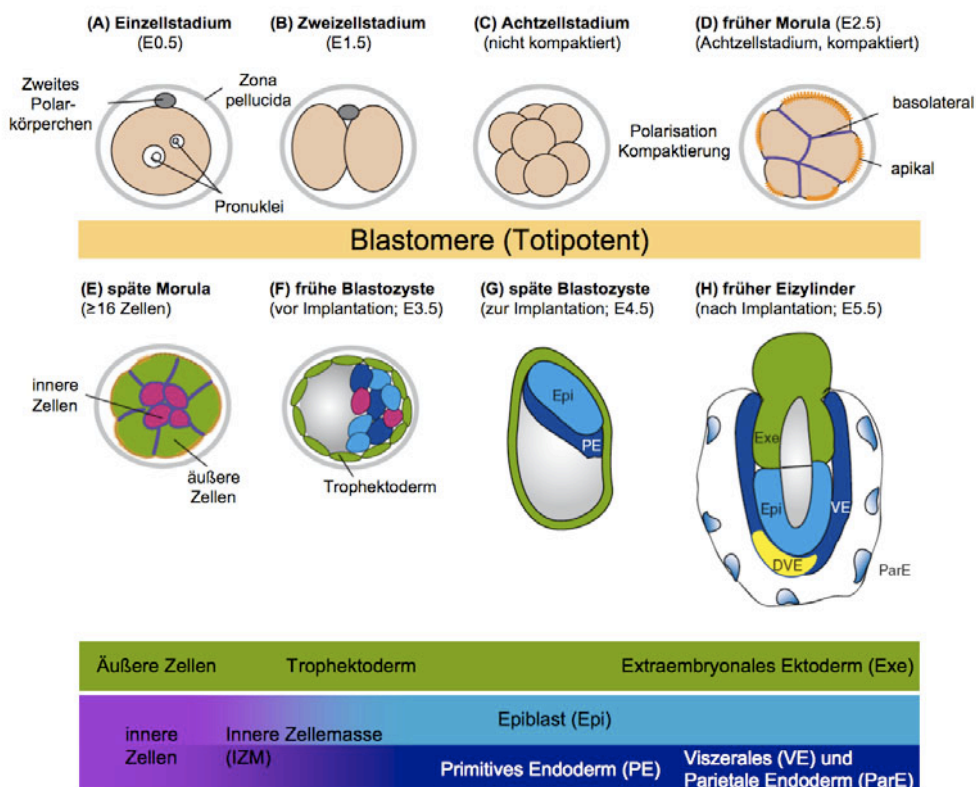


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Prä- und Periimplantationsstadien der Maus. (A-H) zeigen die Zelldeterminierung und die morphologischen Veränderungen eines Mausembryos vom Tag seiner Befruchtung (E0.5) bis zur Ausbildung des frühen Eizylinders (E5.5). E: Embryonaler Tag nach der Befruchtung; DVE: Distates viscerales Endoderm (adaptiert von Rossant und Tam, 2009).

1.1.1 Intrinsische Pluripotenzfaktoren

Zur Gruppe der intrinsischen Pluripotenzfaktoren gehören die Transkriptionsfaktoren Nanog, Oct3/4 (auch Pou5f1 genannt) und Sox2, die sowohl durch ein autoregulatorisches Netzwerk (Kuroda et al., 2005; Masui et al., 2007; Okumura-Nakanishi et al., 2005; Pan et al., 2006; Rodda et al., 2005; Tomioka et al., 2002) als auch durch extrinsische Signale reguliert werden. Diese Triade an Transkriptionsfaktoren bildet hierbei eine Kerneinheit (Abb. 1.2), die eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Transkriptionsnetzwerkes zur Erhaltung der Pluripotenz bei murinen (Loh et al., 2006) und humanen ES-Zellen (Boyer et al., 2005) einnimmt und einzigartig für Säugetiere ist (Chickarmane et al., 2006). Oct-3/4 und Sox2 assoziieren zu Komplexen und binden kooperativ mit Nanog an Promotoren von Transkriptionsfaktoren (Kim et al., 2008). Auch zusätzliche Faktoren können an diesen Multiproteinkomplexen assoziiert sein, wie zum Beispiel der Transkriptionsfaktor Zfp281

(Wang et al., 2006). Das derzeitige Modell beschreibt, dass die Transkriptionsfaktoren Nanog, Oct-3/4 und Sox2 zum einen an die Promotorregion von Pluripotenz-assoziierten Genen und zum anderen auch an Promotoren von an Differenzierungsprozessen beteiligten Genen binden (Abb. 1.2). Dabei wirkt der Proteinkomplex auf die Transkription von Pluripotenzgenen aktivierend und auf die Differenzierungsgene reprimierend (Wang et al., 2008).

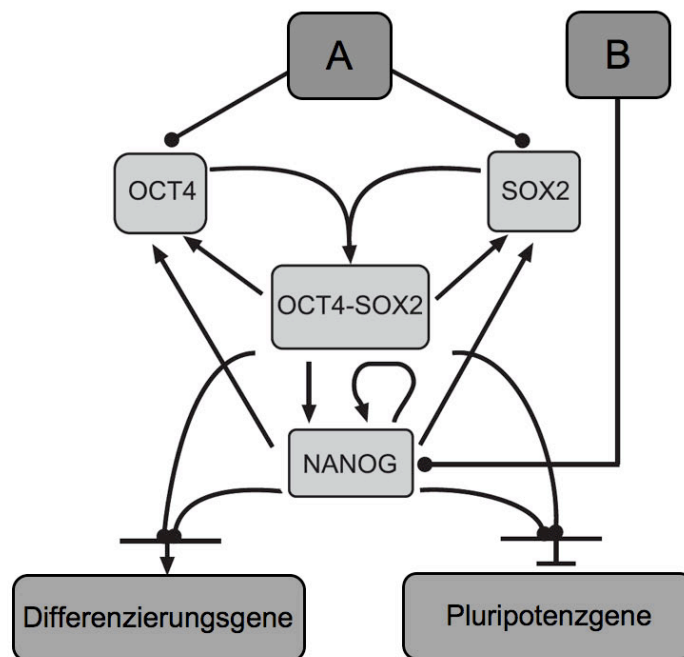


Abb. 1.2: Modell der Pluripotenzhaltung in ES-Zellen. Die Transkriptionsfaktoren Oct4, Nanog und Sox2 bilden die Kerneinheit eines komplexen Transkriptionsnetzwerkes zur Pluripotenzhaltung. Diese Triade übernimmt eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Transkriptionsnetzwerkes, das sowohl durch ein autoregulatorische Netzwerkes als auch durch extrinsische Faktoren reguliert wird. Nanog und Sox2 binden an die regulatorische Region von einer Vielzahl an Genen. Dabei können sie aktivierend oder reprimierend auf die jeweilige Transkription des Zielgens wirken. Zu den reprimierten Genen zählen differenzierungs- und entwicklungspezifische Transkriptionsfaktoren. Unter den aktivierten Genen sind Transkriptions- und epigenetische Faktoren die mit dem Pluripotenzhalt assoziiert sind. A und B repräsentieren extrinsische (bspw. LIF) und intrinsische (bspw. Klf4) Faktoren. (Abbildung modifiziert nach Chickarmane et al., 2006)

Auch epigenetische Mechanismen zur Regulation der Genexpression spielen bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz eine wichtige Rolle. In ES-Zellen wurde eine Chromatinstruktur entdeckt, deren sogenannte bivalente Domänen sich transkriptionell durch lange inaktive und kurze aktive Abschnitte auszeichnen (Bernstein et al., 2006). In den aktiven Bereichen kommt es zur Initiation der Transkription, die in Anwesenheit von Polycomb Gruppen Proteinen (PcG) unterdrückt wird (Guenther et al., 2007). Bivalente Chromatinregionen sind häufig kongruent mit Promotorregionen von Differenzierungsgenen, die von Oct-3/4, Sox2 und Nanog reprimiert werden. Kürzlich wurde ein neues Paradigma zur

Genregulation identifiziert. Hierbei handelt es sich um nicht kodierende RNA Moleküle, die eine Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene regulieren können (zur Übersicht siehe Ambros, 2004 oder Bartel, 2004). Die nicht kodierende microRNA-145 (miR-145) reguliert die Differenzierung in humanen ES-Zellen direkt, indem sie die Transkription der Pluripotenzfaktoren Klf4, Oct-3/4 und Sox2 reprimiert (Xu et al., 2009). Zur detaillierten Übersicht der unterschiedlichen regulatorischen Ebenen zum Erhalt der Pluripotenz siehe Bosnali et al. (2009).

Nanog

Der Transkriptionsfaktor Nanog („Tir na nÓg“ = „Land der ewigen Jugend“ aus der Keltischen Mythologie entliehen) gehört zur Gruppe der Homöodomänenproteine und wurde 2003 erstmalig unabhängig von zwei Gruppen beschrieben (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). In der Mausentwicklung wird Nanog ab dem Morula Stadium exprimiert und erreicht in der frühen Blastozyste sein höchstes Expressionsniveau. Bereits im Epiblast wird die Expression von Nanog wieder herunterreguliert und bleibt nach der Gastrulation auf Keimbahnzellen beschränkt (Chambers et al., 2003). In der IZM der Blastozyste ist die Expression von Nanog, nicht wie Oct-3/4 und Sox2 in allen Zellen gleich, sondern das Expressionsmuster gleicht einer „Salz-und-Pfeffer-Verteilung“ (Singh et al., 2007). Eine ektopische Expression von Nanog in ES-Zellen der Maus ermöglicht deren Selbsterneuerung in Abwesenheit von LIF (*leukemia inhibitory factor*; Chambers et al., 2003). Eine ähnliche Beobachtung wurde bei humanen ES-Zellen beschrieben. Bei humanen ES-Zellen ermöglicht eine ektopische Expression von NANOG eine Kultivierung der Zellen ohne Feederzellen in nicht konditioniertem Medium (Darr et al., 2006). Interessanter Weise fluktuiert die Nanog Expression in ES-Zellen und ist für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz nicht erforderlich. Allerdings ist eine Expression von Nanog für die Induktion der Pluripotenz Voraussetzung. Dies konnte in einer eleganten Studie von Chambers et al. (2007) gezeigt werden. In dieser Studie verwendeten die Autoren Nanog^{-GFP} ES-Zellen, die über ein episomal vorliegendes konditionales Nanog Allel verfügten, das eine induzierbare Nanog-Expression für Kompensationsversuche ermöglicht. Es gelang Chambers und Kollegen aus Nanog defizienten ES-Zellen chimäre Mäuse zu gewinnen. Für einen erfolgreichen Keimbahntransfer musste zuerst der Nanogverlust durch die Aktivierung des transgenen Nanogs kompensiert werden. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass Nanog zum einen für die

Entwicklung von primordiales Keimbahnzellen in Keimzellen und zum anderen für die Etablierung als auch den Aufbau der IZM notwendig ist (Chambers et al., 2007).

Oct-3/4

Der Transkriptionsfaktor Oct-3/4 (*Octamer binding transcription factor 4*) gehört zur Familie der POU-Transkriptionsfaktoren. Das für den Transkriptionsfaktor kodierende Gen wird als *Pou5f1* bezeichnet. Von der unbefruchteten Eizelle bis zum Epiblast des frühen postimplantierten Embryos wird die Expression von Oct-3/4 aufrechterhalten (Rosner et al., 1991; Schöler et al., 1990; Nichols et al., 1998). Während der Gastrulation wird die Oct-3/4 Expression herunterreguliert und bleibt auf Zellen der Keimbahn beschränkt. Aus Oct-3/4 defizienten Blastozysten lassen sich keine ES-Zellen gewinnen. Oct-3/4 defiziente Zellen der IZM entwickeln sich in trophektodermale Zellen, da auf transkriptioneller Ebene die Repression von *Cdx2* (*caudal type homeobox transcription factor 2*) aufgehoben wird (Nichols et al., 1998). Ein RNAi-basierter *knockdown* von OCT-3/4 in humanen ES-Zellen führte wie bei murinen ES-Zellen zur Differenzierung der ES-Zellen in Trophektoderm (Matin et al., 2004). Die Erhaltung eines stabilen Oct-3/4 Expressionsniveaus ist kritisch für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz. Wird das Expressionsniveau von Oct-3/4 auf 50% des Wildtyp-Niveaus reduziert, differenzieren ES-Zellen in trophektodermale Zellen. Eine Hochregulation von Oct3/4 auf das zwei- bis vielfache Expressionsniveau führt zu einer Differenzierung der ES-Zellen in meso- und endodermale Zellen (Niwa et al., 2000).

1.1.1.1 Sox2 in der Pluripotenzerhaltung von ES-Zellen

Der Transkriptionsfaktor Sox2 (*sex determining region Y-related HMG box 2*) gehört zur Familie der High Mobility Group (HMG) DNA Bindeproteine. HMG Proteine binden an die kleine Furche der Doppelhelix und erzeugen eine starke Beugung des DNA-Strangs. Bisher wurden 30 unterschiedliche Sox Gene identifiziert, wovon 20 Gene sowohl im Genom der bei Maus als auch des Menschen vorkommen (Kiefer, 2007). Sox Proteine besitzen eine 79 Aminosäuren große *HMG box* Domäne, die für die sequenzspezifische Bindung an DNA verantwortlich ist (Gubbay et al., 1990; Wright et al., 1993). Die Sox Gene der Säugetiere werden in 8 Gruppen (A-H) unterteilt. Die Gruppenzugehörigkeit basiert auf einer phylogenetischen Analyse der *HMG box* Domäne. Die Sox Gene weisen auf Aminosäureebene zueinander eine 60%ige Homologie und innerhalb der Gruppen eine 90% Homologie auf (Bowles et al., 2000). Die Sox-Gene der B Gruppe werden aufgrund ihres

Einflusses auf die Transkription in zwei Untergruppen unterteilt: SoxB1 Proteine (Sox1, 2, 3), deren Domäne aktivierend wirkt und in die SoxB2 Proteine (Sox14 und 21), deren Proteininteraktionsdomäne reprimierend wirkt (Uchikawa et al., 1999). Die Stabilität des Sox-DNA-Komplexes ist relativ gering (Dissoziationskonstante $K_d = 10^{-9} - 10^{-8}$) verglichen mit den Dissoziationskonstanten anderer Transkriptionsfaktoren. Eine kooperative Bindung mit weiteren Faktoren kann für eine stabilere Bindung sorgen. Unterschiedliche Bindungspartner erklären auch die zellspezifischen Eigenschaften der Sox Proteine. (Kamachi et al., 2000). In der Tat ist die kooperative Bindung eines Sox-Partners abhängig vom Entwicklungsstadium. In der Implantationsphase beispielsweise aktiviert Sox2 im Verbund mit Oct-3/4 die Expression der Zielgene FGF, Nanog und UTF1 (Ambrosetti et al., 1997; Kuroda et al., 2005; Nishimoto et al., 1999; Rodda et al., 2005; Yuan et al., 1995). In späteren Phasen der Embryogenese, in denen Oct-3/4 nicht mehr exprimiert wird, bildet Sox2 mit anderen Partnern heterodimere Komplexe. Ein Beispiel hierfür ist: Der Sox2-Pax6-Komplex, der die Expression des δ -Kristallin Gens während der Augenlinsenentwicklung aktiviert (Inoue et al., 2007; zur Übersicht siehe Kondo und Kamachi, 2009).

Sox2 ist einer der Hauptregulatoren der Pluripotenzerhaltung in ES-Zellen. In der frühen embryonalen Phase ist die Sox2 Expression auf Zellen mit Stammzeleigenschaften beschränkt. Hierzu zählen die IZM, der Epiblast, Trophoblaststammzellen und Keimbahnzellen (Avilion et al., 2003; Wood et al., 1999). Hingegen ist die Expression von Sox2 in Zellen mit limitiertem Entwicklungspotential herunterreguliert. Die Expression von Sox2 ist essentiell während der Embryogenese, homozygote Sox2-defiziente Embryonen der Maus sterben kurz nach Implantation. *Sox2*^{-/-} Embryonen sind weder in der Lage den Epiblast, noch extraembryonales Ektoderm auszubilden (Avillion et al., 2003). Ein *knockdown* oder konditionaler *knock-out* von Sox2 in ES-Zellen der Maus führt zur spontanen Differenzierung in Trophektoderm und Mesendoderm (Avilion et al., 2003; Ivanova et al., 2006; Masui et al., 2007), was die Rolle von Sox2 für die Pluripotenzerhaltung verdeutlicht. Wie bereits beschrieben dimerisiert der Transkriptionsfaktor Sox2 mit Oct-3/4 und aktiviert die Transkription vieler Pluripotenz-assoziiierter Gene. Zusätzlich zu den Genen FGF, Nanog, UTF1 werden auch Lefty1 (Nakatake et al., 2006), Fbxo15 (Tokuzawa et al., 2003) vom Oct-3/4-Sox2 Komplex reguliert. Interessanterweise besitzen die Gene Pou5f1 und Sox2 regulatorische Enhancer-Regionen, die auch vom Oct-3/4/Sox2 Proteinkomplex aktiviert werden, dadurch entsteht eine autoregulatorische Rückkopplung (Okumura-Nakanishi et al., 2005; Tomioka et al., 2002). Durch Chip-on-Chip Analysen konnte gezeigt werden, dass auch

der Transkriptionsfaktor Nanog an viele der von Oct-3/4-Sox2 Proteinkomplexen okkupierten Promotorregionen bindet (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006; Kim et al., 2008). Die Kerntranskriptionsfaktoren regulieren wahrscheinlich Tausende von Genen, jedoch sind bislang nur einige wenige der möglichen Zielgen-Aktivitäten gut charakterisiert und validiert. Sowohl ES-Zellen die eine dominant-negative Form des Transkriptionsfaktors Sox2 exprimieren, als auch ein RNAi *knockdown* in ES-Zellen, führt zum Pluripotenzverlust und induziert die Differenzierung in Trophektoderm (Li et al., 2007). Obwohl induzierbare Sox2^{-/-} ES-Zellen ihre Pluripotenz verlieren und hauptsächlich in Trophektoderm differenzieren, ist Sox2 unerwarteter Weise nicht notwendig, um die meisten regulatorischen Regionen mit Octamer- und Sox-Bindestellen zu aktivieren (Utf1, Fgf4, Pou5f1, Sox2, Nanog und Lefty1; Masui et al., 2007). Dies ist höchstwahrscheinlich auf die Redundanz der Sox-Gene zurückzuführen. In ES-Zellen werden auch die Transkriptionsfaktoren Sox4, Sox11 und Sox15 (Bowles et al., 2000; Wiebe et al., 2003; Maruyama et al., 2005) exprimiert. Nichtsdestotrotz konnte in der Studie von Masui und Kollegen (2007) gezeigt werden, dass eine Sox2-Expression in ES-Zellen notwendig ist, um das für Pluripotenz erhalt erforderliche Expressionsniveau von Oct-3/4 einzustellen. Die These wurde unterstützt von der Erkenntnis, dass Sox2^{-/-} ES-Zellen durch eine transgene Oct-3/4 Expression gerettet werden können (Masui et al., 2007). 2004 beschrieben Zhao und Kollegen, dass die ektopische Expression von Sox1 und Sox2 in ES-Zellen der Maus keine Auswirkungen auf die Selbsterneuerung der ES-Zellen habe, aber dass bei spontaner Differenzierung hauptsächlich neuroektodermale Zellen und weniger meso- als auch endodermale Zellen entstünden. In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass eine moderate Erhöhung (auf das maximal zweifache) des Expressionsniveaus von Sox2 zur Differenzierung der ES-Zellen in Neuroektoderm, Mesoderm und Trophektoderm, jedoch nicht Endoderm führt (Kopp et al., 2008). Eine massive Überexpression von Sox2 beeinträchtigt die Zellviabilität (Mitsui et al., 2003; Boer et al., 2007; Kopp et al., 2008). Sox2 scheint wie Oct-3/4 (Niwa et al., 2000) ein molekularer Rheostat zur Kontrolle zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung zu sein. Über die Rolle des Transkriptionsfaktors Sox2 konnten *in vivo* und *in vitro* Tiermodellen bereits weitreichende Erkenntnisse gewonnen werden. Beim Menschen hingegen ist weit weniger über die Funktion von SOX2 bekannt. Die Chip-on-Chip Analyse von Boyer et al. (2005) zeigte, dass auch beim Menschen die OCT-3/4/SOX2 Proteinkomplexe an Promotorregionen von über tausend Genen binden. Ein RNAi-induzierter *knockdown* von SOX2 in humanen ES-Zellen führt zum Verlust des undifferenzierten Stammzellstadiums und resultiert in einer

erhöhten Expression trophektodermaler Marker. (Fong et al., 2008; Ivanova et al., 2006;). Wie bei der Maus, wird auch beim Menschen SOX2 in der Augenlinse exprimiert (Kamachi et al., 1995). Der heterozygote SOX2-Funktionsverlust verursacht mehrere Defekte, zu denen die bilaterale Anophthalmie (Ragge et al., 2005), sowie Missbildungen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (Kelberman et al., 2006) zählen. Diese führen zu einer Fehlbildung des sensorischen Organs des Innenohrs (Kiernan et al., 2005).

Induktion von Pluripotenz in somatischen Zellen

Eine bahnbrechende Veröffentlichung aus dem Jahr 2006 beschreibt erstmals, dass eine ektopische Ko-Expression von vier Transkriptionsfaktoren ausreicht, um Fibroblasten der Maus zu dedifferenzieren (Takahashi und Yamanaka 2006). Die dabei generierten Zellen teilen viele Eigenschaften mit ES-Zellen und wurden folglich als induzierte pluripotente Stammzellen (iPS Zellen) bezeichnet. Bei den vier Transkriptionsfaktoren handelt es sich um Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-myc, die retroviral in Fibroblasten eingebracht wurden. Mittlerweile wurde diese Beobachtung von vielen Gruppen für unterschiedliche Spezies (Maus, Mensch, Ratte, Schwein und Schaf), unterschiedliche Zielzellen (Fibroblasten, Hepatozyten, Keratinozyten, Nabelschnurblutzellen, NSZ, B-Zellen, Beta-Zellen, Knochenmarkzellen, Zahnmarkzellen, Melanozyten und gastrointestinale Zellen) mit ähnlichen Reprogrammierungsstrategien reproduziert (Amabile und Meissner, 2009; Hochedlinger und Plath, 2009; Stadtfeld und Hochedlinger, 2009; Trounson, 2008).

1.1.1.2 Sox2 in der frühen neuralen Entwicklung

Noch bevor die frühe entwicklungsbiologische Rolle von Sox2 gezeigt wurde, war bereits bekannt, dass die Expression von Sox2 in der Entwicklung des Zentralen Nervensystems vom Zebrafisch bis zum Menschen konserviert ist (Collignon et al., 1996). Gleiches trifft auch für die Expression von Dichaete, dem Sox2 Homolog in *Drosophila melanogaster* zu. Sox2 ist im Nervensystem bereits in den ersten neuralen Entwicklungsstadien, vornehmlich in proliferierenden Vorläuferzellen aktiv (Pevny und Placzek, 2005; Wegner und Stolt, 2005). Darüber hinaus übt Sox2 eine essentielle Funktion in der Erhaltung von neuralen Stammzellen (NSZ) aus. Multipotente NSZs definieren sich wie folgt: Sie können sich selbst erneuern und aus ihnen können Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten hervorgehen. Zum Nachweis der Multipotenz von Sox2 wurden Zellen aus einem transgenen Embryo (bzw. einer adulten Maus) präpariert. Durch den *knock-in* eines *beta-geo* Gens in ein Sox2 Allel

exprimieren diese Zellen das Fusionprotein β -Galoktosidase-Neomycinresistenz unter der Kontrolle des endogenen Sox2 Promotors. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde gezeigt, dass diese *beta-geo* positiven Zellen multipotent sind und sich selbst erneuern können (Ferri et al., 2004). Darüber hinaus berichteten Ferri und Kollegen, dass Mäusen, denen eine für neurale Zellen spezifische Enhancer-Region des Sox2 Gens fehlt, nur noch eine eingeschränkte Neurogenese aufweisen und dass in diesen Mäusen eine Neurodegeneration induziert wurde (Ferri et al., 2004). Unterstützt wurden die Resultate durch die Beobachtung, dass in Mäusen mit einem Sox2 GFP *knock-in* Allel eine GFP Expression in proliferierenden Vorläufern *in vivo* und in NSZ *in vitro* detektierbar ist (Ellis et al., 2004). Im Jahr 2004 demonstrierten Kondo und Raff, dass ein *knockdown* von Sox2 in primären neuronalen Stammzellen der Ratte die Proliferation der Zellen blockiert und deren Differenzierung in Neurone einleitet. Des Weiteren gelang es ihnen oligodentroytäre Vorläuferzellen in NSZ zu konvertieren. Die Konversion hatte die Reaktivierung des Sox2 Allels zur Folge (Kondo und Raff, 2004). Eine neuere Studie liefert den experimentellen Nachweis, dass Sox2 exprimierende Zelle im *Gyrus dentatus* des Hippocampus tatsächlich ein ähnliche funktionelles Verhalten *in vivo* haben, wie die NSZs *in vitro* (Suh et al., 2007).

1.1.2 Extrinsische Pluripotenzfaktoren

Extrinsische Faktoren dienen zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz von ES-Zellen unter Zellkulturbedingungen. Das Zusammenspiel von extrinsischen Signalen und der intrinsischen transkriptionellen Architektur (Abb. 1.3) bestimmt, ob ES-Zellen sich für Selbsterneuerung oder Differenzierung entscheiden. Die ersten murinen ES-Zellen wurden analog zu EC-Zellen (Embryonale Karzinomzellen) auf einer Schicht muriner embryonaler Fibroblasten (MEF) kultiviert. Die MEF sekretieren lösliche Faktoren in das Medium und supplementieren somit das Medium mit den notwendigen Stimulanzien, um ES-Zellen kultivieren zu können. Die hierzu verwendeten MEF Zellen werden auch Feederzellen („Fütterzellen“) genannt. Vor über 20 Jahren wurde der Faktor LIF (*leukemia inhibitory factor*) als Bestandteil in konditioniertem Medium ausgemacht. Es konnte gezeigt werden, dass LIF zur Inhibition der Differenzierung von pluripotenten ES-Zellen der Maus unabdinglich ist (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Einige ES-Zelllinien können unter LIF-Stimulation ohne Feederzellen in serumhaltigem Medium kultiviert werden (Magin et al., 1992; Thompson et al., 1989). LIF gehört zur IL6 Zytokin-Familie und bindet die extrazelluläre Domäne des LIF-Rezeptors (LIFR), was eine Trimerisierung mit Glycoprotein-130 (gp130) ermöglicht. Dieser trimere

Komplex gibt das Signal über die zytoplasmatische Domäne an Stat3 (*signal transducer and activator of transcription*) weiter, was wiederum eine Kerntranslokation des aktivierten Stat3 zur Folge hat (Boeuf et al., 1997; Niwa et al., 1998). Die Aktivierung von Stat3 ist ausreichend, um die Selbsterneuerung von ES-Zellen aufrecht zu erhalten (Matsuda et al., 1999). Eine neuere Publikation von Niwa et al. beschreibt, dass die LIF vermittelte Signaltransduktion parallel über zwei unterschiedliche Signalwege (Jak/Stat3 und PI3K/Akt) die Transkriptionsfaktoren Tbx3 und Klf4 aktiviert, die wiederum die Pluripotenzfaktoren Nanog, Sox2 und Oct3/4 aktivieren. Die transgene Expression von Tbx3 und Klf4 ermöglicht den Pluripotenzerhalt über die Aufrechterhaltung einer Oct-3/4 Expression. (Niwa et al., 2009). Die Pluripotenz muriner ES-Zellen kann durch LIF nur unter serumhaltigen Bedingungen aufrechterhalten werden (Ying et al., 2003). Daher kann davon ausgegangen werden, dass mindestens ein weiterer extrinsischer Faktor notwendig ist, um ES-Zellen der Maus pluripotent zu halten. Seit der Publikation von Ying und Kollegen (2003) ist bekannt, dass entweder BMP4, BMP2 (*bone morphogenetic proteins*) oder das BMP-verwandte GDF6 (*growth and differentiation factor-6*) dazu verwendet werden können, um die Pluripotenzerhaltung unter serumfreien Bedingungen einzustellen. Jeder dieser Faktoren ist in der Lage das normalerweise erforderliche fötale Kälberserum (FKS) zu ersetzen. Somit reicht LIF in Kooperation mit BMP aus, um bei murinen ES-Zellen die Pluripotenz unter serumfreien Bedingungen zu bewahren (Ying et al., 2003). Bei der Stimulation mit BMP oder GDF werden so genannte Id-Proteine (*inhibitors of differentiation*) aktiviert, die eine Differenzierung in Neuroektoderm verhindern (Abb. 1.3). Durch eine Überexpression von Id1, Id2 oder Id3 konnte BMP/GDF Stimulation umgangen werden (Ying et al., 2003). Wnt (*wingless type*) Proteine unterdrücken ebenfalls die neurale Differenzierung von ES-Zellen. Wnt ist in undifferenzierten ES-Zellen exprimiert und wird während der Differenzierung herunterreguliert (Aubert et al., 2002). Der Wnt-Signaltransduktionsweg scheint in der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von murinen und humanen ES-Zellen eine Rolle zu spielen. Dies konnte mit Hilfe eines Pharmakons gezeigt werden, welches einen Wnt Stimulus durch die Inhibition der Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) simuliert (Sato et al., 2004). Eine weiterführende Studie von Ying et al. aus dem Jahr 2008 zeigte, dass die Inhibition des FGF4-ERK-Signaltransduktionswegs und die Inhibition von GSK3 durch chemische Inhibitoren ausreichend sind, um die Pluripotenzerhaltung von ES-Zellen der Maus zu gewährleisten. Demnach können ES-Zellen in einem chemisch definierten Medium ohne Wachstumsfaktoren oder Zytokine kultiviert werden. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass

der Stimulus von LIF und BMP nicht die Selbsterneuerung aktivieren, sondern die Differenzierung pluripotenter Zellen blockieren. Die Verwendung des GSK3 Inhibitors fördert die Proliferation und Viabilität der Zellen (Ying et al., 2008).

Im Gegensatz zu ES-Zellen der Maus scheinen humane ES-Zellen unabhängig von LIF zu sein, zumindest wurde publiziert, dass der LIF/Stat3 Signaltransduktionsweg nicht in der Lage ist die Selbsterneuerung von humanen ES-Zellen aufrecht zu erhalten (Abb. 1.3; Dahéron et al., 2004). Werden humane ES-Zellen mit BMP4 stimuliert, induziert dies eine Differenzierung in Trophektoderm (Pera et al., 2004; Xu et al., 2002; Xu et al., 2008). Die Kokultivierung mit murinen Feederzellen stellt dennoch die gebräuchlichste Kultivierung von humanen ES-Zellen dar. Die Feederzellen scheinen, die für den Pluripotenzerhalt notwendigen Faktoren ins Kulturmedium zu sekretieren (Richards et al., 2002; Thomson et al., 1998). Seit der Etablierung von Serumersatz wird für die Kultivierung von humanen ES-Zellen keine fötales Kälberserum (FKS) mehr verwendet (Amit et al., 2000). Humane ES-Zellen können ohne Feederzellen kultiviert werden, wenn sie auf Matrigel beschichtete Schalen mit konditioniertem Medium kultiviert werden (Xu et al., 2002). Für beide Kulturbedingungen muss das Medium zusätzlich mit bFGF (*basic fibroblast growth factor*) supplementiert werden, um den Pluripotenzerhalt zu gewährleisten. Ein Antrieb für die Etablierung neuer Kulturbedingungen ist, ein Xeno-freies und idealer weise chemisch definiertes Medium zu erhalten. Es wurde gezeigt, dass eine höhere Konzentration von bFGF in der Lage ist, humane ES Zellen in Abwesenheit von Feederzellen zu kultivieren (Xu et al., 2005; Klimanskaya et al., 2005; Levenstein et al., 2006). Allerdings handelte es sich dabei, um bereits etabliert Zelllinien, bei denen eine Anpassung, mit einhergehenden zellulären Veränderungen nicht ausgeschlossen werden kann. Die Ko-Stimulation von humanen ES-Zellen mit bFGF und TGF β /Activin (*transforming growth factor β*) ist für den Pluripotenzerhalt ausreichend (Amit et al., 2004; Beattie et al., 2005; Levenstein et al., 2005; Ludwig et al., 2006b; Vallier et al., 2005; Xu et al., 2008). Im Gegensatz dazu scheint Activin bei der Selbsterneuerung von ES-Zellen der Maus keine Rolle zu spielen (Abb. 1.3; Ogawa et al., 2007). Ein stringenter Nachweis dafür, dass die Stimulation mit bFGF und TGF β /Activin den Pluripotenzerhalt in humanen ES-Zellen fördert, wurde durch die Generierung neuer humaner Stammzelllinien in exakt diesen Kulturbedingung erbracht (Ludwig et al., 2006a).

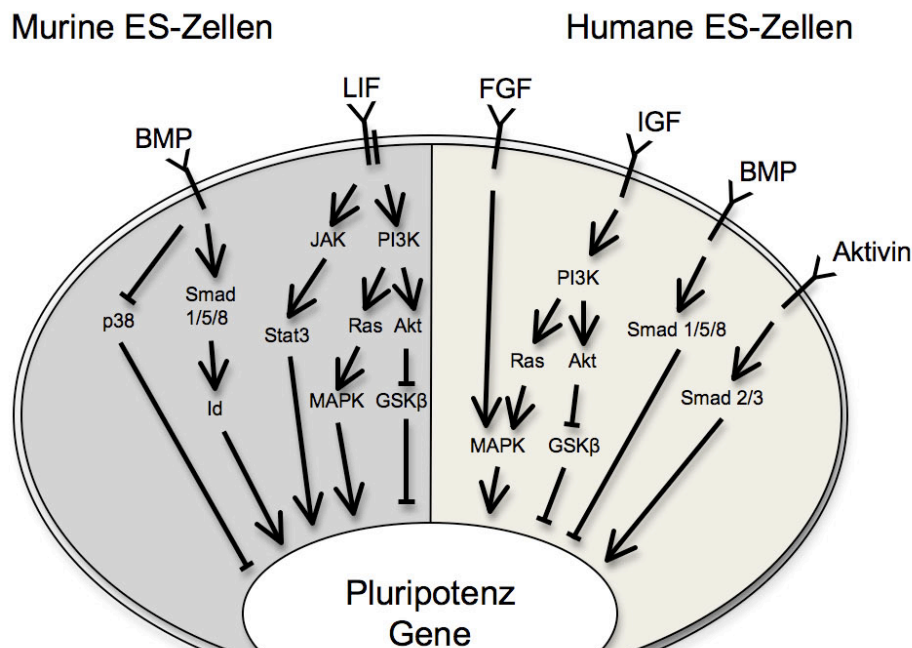


Abb. 1.3 Signaltransduktionswege in murinen und humanen ES-Zellen. Anders als humane ES-Zellen benötigen murine ES-Zellen unter Standardkulturbedingungen einen LIF-Stimulus, um pluripotent zu bleiben. Das LIF scheint die Pluripotenz über den Stimulus der Signalwege von JAK/STAT und PI3K zu erhalten. Der Pluripotenzhalt von humanen ES-Zellen scheint wiederum von einem kombinierten TGFβ/Aktin und FGF2 Stimulus abhängig zu sein. Der BMP-Stimulus induziert bei humanen ES-Zellen eine trophektodermale Differenzierung. Wohingegen der BMP-Stimulus bei ES-Zellen der Maus über die Aktivierung der Id-Proteine (*inhibitors of differentiation*) zur Unterstützung des Pluripotenzhalts führt. (Abbildung modifiziert von Ptaszek und Cowan, 2009)

Eine der zentralen Fragen ist, ob die Unterschiede zwischen humanen und murinen ES-Zellen Spezies abhängig sind, oder ob sie unterschiedliche Entwicklungsstadien widerspiegeln. Maus ES-Zellen proliferieren mit einer Verdopplungsrate von 12 Stunden fast dreimal schneller als humane ES Zellen, die dafür 35 Stunden brauchen (Amit et al., 2000). Humane ES-Zellen bilden zweidimensionale, flachere und weniger deutlich abgegrenzte Kolonien als murine ES-Zellen. Das Zellvolumen der humanen ES-Zellen ist wesentlich größer und hat einen höheren Anteil an Zytoplasma. Die ES-Zellen von Maus und Mensch unterscheiden sich auch in der Expression der *stage-specific embryonic antigens* (SSEA). SSEA-1 wird in murinen ES-Zellen exprimiert, wohingegen SEA-3 und SSEA-4 in humanen ES-Zellen exprimiert werden. Im Vergleich zu murinen ES-Zellen besitzen humane ES-Zellen eine weitaus geringere Klonogenität. Mechanisch oder enzymatisch vereinzelte humane ES-Zellen sterben zum Grossteil ab (ca. 99%). Evidenz für die Hypothese, dass humane ES-Zellen aus einem späteren entwicklungsbiologischen Stadium generiert wurden, lieferten zwei unabhängige Studien aus dem Jahr 2007. Es gelang den Autoren Stammzellen aus einem späteren

Entwicklungsstadium, dem Epiblastenstadium der Maus zu generieren. Erstaunlicher Weise sind die so gewonnenen Epiblast-Stammzellen LIF unabhängig und auch ihre Morphologie ähnelt der von humanen ES-Zellen (Tesar et al., 2007 und Brons et al., 2007). Werden die Epiblast-Stammzellen BMP4 ausgesetzt, differenzieren sie in Trophektoderm. Auf der anderen Seite ist die Stimulation mit TGF β /Aktivin für die Pluripotenzerhaltung notwendig. Demnach repräsentieren humane ES-Zellen und murine Epiblast Stammzellen möglicherweise einen entwicklungsbiologisch äquivalenten Zelltyp. Eine entwicklungsbiologische Plastizität zwischen ES-Zellen und Epiblast Stammzellen konnte *in vitro* demonstriert werden, indem es gelang Epiblast Stammzellen durch die Kultivierung mit konditioniertem und LIF-haltigem Medium in ES-Zellen zu konvertieren (Bao et al., 2009). Der Arbeitsgruppe um Austin Smith gelang es Epiblast-Stammzellen der Maus mit nur einem Faktor (Klf4) in ES-Zell-ähnliche Zellen zu reprogrammieren (Guo et al., 2009). Ein Indiz, dass durch das Reprogrammieren von humanen Fibroblasten iPS Zellen generiert werden könnten, die womöglich „echten“ humanen ES-Zellen eher gleichen als die existierenden humanen ES-Zelllinien, lieferte eine Veröffentlichung aus der Arbeitsgruppe von Shen Ding (Li et al., 2009).

1.1.3 Methoden zur genetischen Manipulation von ES-Zellen

Die genetische Manipulation von embryonalen Stammzellen spielt eine zentrale Rolle, um das Potential der Stammzellen für entwicklungsbiologischen Analysen als auch für Zelltherapien nutzen zu können. Im Gegensatz zu murinen ES-Zellen lassen sich humane ES-Zellen ungleich schlechter genetisch modifizieren. Mittlerweile sind seit der Generierung der ersten humanen ES-Zelllinie (Thomson et al., 1998) mehr als ein Jahrzehnt vergangen und es hat sich herausgestellt, dass viele der in murinen ES-Zellen etablierten Techniken nur unzureichend in humanen ES-Zellen angewendet werden können. Ein Grund für die schlechte Zugänglichkeit von humanen ES-Zellen scheint der epithelartige Zell-Zell-Kontakt zu sein. Bei humanen ES-Zellen werden interzelluläre Kontakte unter anderem über Adhäsionskomplexe wie *tight junctions*, *adherens junction*, *desmosomen* und *gap junctions* ausgebildet, was den Zellen einen epithelartigen Charakter verleiht (Dormeyer et al., 2008; Braam et al. 2008). Eine Grundvoraussetzung zur genetischen Modifikation ist die Klonogenität der Zielzellen. Die Klonogenität von humanen ES-Zellen ist dürftiger Natur, ca. 1% der dissoziierten Einzelzellen überleben, massive Apoptose wird bei 99% Zellen

beobachtet. Die Technik der homologen Rekombination wird in murinen ES-Zellen routinemäßig eingesetzt. Bei humanen ES-Zellen hingegen gab es bisher nur drei Veröffentlichungen mit erfolgreich angewendeter homologer Rekombination (Zwaka et al., 2003; Irion et al., 2007; Davis et al. 2008). Eine kürzlich erschienene Publikation beschreibt ein auf der BAC-Technologie basiertes Homologes Rekombinationssystem, was eine zukünftige Anwendung stark vereinfachen könnte (Song et al., 2010). Die Transfektion mit plasmidischer DNA erzielt sehr variable Transfektionseffizienzen, die zwischen 3-35% liegen (Braam et al., 2010). Die Elektroporation zum Einbringen von DNA wird von ES-Zellen der Maus weitestgehend toleriert. Für die Elektroporation von humanen ES-Zellen muss eine um den Faktor 10 größere Zellzahl verwendet werden, da die transfizierte DNA in den meisten Zellen nur transient exprimiert wird und die stabile Transfektion ein sehr seltenes Ereignis ($\sim 0,5-5 \times 10^{-4}$) ist (Costa et al., 2007). Für den stabilen Gentransfer in humanen ES-Zellen ist die lentivirale Infektion die effizienteste Methode. Limitationen ergeben sich aus der Inkompatibilität mit einer homologen Rekombination und dem *silencing* von Transgenen (He et al., 2005). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass viele der in murinen ES-Zellen routinemäßig angewendeten Methoden zur genetischen Manipulation wie die BAC-Technologie und homologe Rekombination in humanen ES-Zellen nur sehr ineffizient oder überhaupt nicht umgesetzt werden können. Eine weitere Technik, um humane ES-Zellen zu modulieren ist die Proteintransduktionstechnik (Kwon et al., 2005). Im Jahr 2006 schleusten Nolden und Kollegen ein rekombinantes Cre-Fusionsprotein mit einer Effizienz >90% in humane ES-Zellen ein, um eine *loxP* abhängige Mutagenese zu katalysieren.

1.2 Ortsspezifische DNA-Rekombinasen

Ortsspezifische DNA-Rekombinasen (*site-specific recombinases*; SSRs) katalysieren die Rekombination von DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. Der Einsatz von SSRs als molekulargenetisches Werkzeug ermöglicht sowohl vorwärtsgerichtete als auch revers genetische DNA Manipulation, indem sie sequenzspezifische DNA-Modifikationen *in vitro* als auch *in vivo* induzieren können (Branda und Dymecki, 2004; Glaser et al., 2005; Garcia-Otin und Guillou, 2006). Über die relative Orientierung und Lokalisation der Erkennungssequenz lässt sich eine Deletion, Integration, Inversion oder Translokation von genomischer DNA (Abb. 1.4) kontrolliert durchführen (O’Gorman et al., 1997). Die SSR-Technologie kann verwendet werden, um embryonal letale *knock-out* Mutationen, wie es

beispielsweise bei Sox2^{-/-} Mutanten der Fall ist, in postnatalen Stadien zu untersuchen (Gu et al., 1994). Das am häufigsten genutzte Rekombinationsereignis zur genetischen Manipulation, ist die DNA-Deletion (Abb. 1.4.A). Die Deletion als Rekombinationsereignis wird bei gewebespezifischen und konditionalen *knock-outs*, zur induzierbaren Genexpression oder auch zur Entfernung von Selektionsmarkern verwendet.

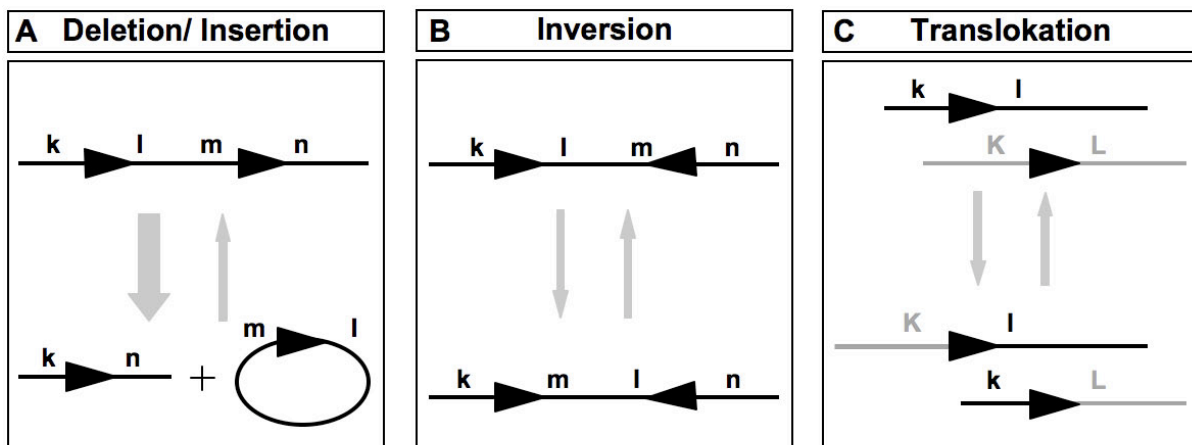


Abb. 1.4: SSR-vermittelte Rekombinationsereignisse. Die relative Orientierung der Erkennungssequenzen (loxP-/FRT/rox-Stellen) zueinander bestimmen das Rekombinationsereignis. (A) Sind zwei Erkennungssequenzen mit gleicher Orientierung auf einem Substrat erfolgt eine Deletion, bzw. haben ein zirkuläres und ein lineares Substrat jeweils eine Erkennungssequenz erfolgt eine Integration. (B) Inversion einer DNA-Sequenz innerhalb zweier Erkennungsstellen mit entgegengesetzter Orientierung. (C) SSRs können intermolekular Sequenzen rekombinieren und dadurch Chromosomen-Translokationen bewirken (Branda und Dymecki, 2004).

Des Weiteren findet die SSR-Technologie Anwendung bei der Analyse entwicklungsbiologischer Prozesse (Dymecki and Tomaszewicz, 1998). Es sind zwei ortsspezifische Rekombinase-Familien bekannt, die Resolvase/Invertase- und die λ -Integrase-Familie. Mitglieder beider Unterfamilien katalysieren die Rekombination zweier DNA-Doppelstränge nach der Bindung von vier Rekombinase-Molekülen, die zwei Erkennungssequenzen binden. Die Unterfamilien unterscheiden sich im Aufbau des katalytischen Zentrums. Die Resolvase/Invertasen-Familie besitzt im katalytisch aktiven Zentrum ein konserviertes Serin und die λ -Integrase-Familie ein konserviertes Tyrosin (Esposito et al., 1997). Ein bekannter Vertreter der Serin-Rekombinasen ist die ϕ C31 Integrase aus dem *Streptomyces* Phagen (Thorpe und Smith, 1998). Die prominentesten Tyrosin-Rekombinasen sind Cre (*causes recombination*) des *Bakteriophagen P1* und FLP (benannt nach der Fähigkeit eine Inversion bzw. einen *flip* der DNA-Sequenz zu verursachen) der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Erkennungssequenzen von Cre werden loxP-Stellen (*locus of x-over in P1*; Hoess et al.; 1982) und die von FLP werden FRT-Stellen (*FLP*

recognition target; McLoed et al.; 1986) genannt (Abb. 1.5). Die Erkennungssequenzen unterscheiden sich auf der Ebene der Nukleotide, besitzen jedoch eine gleiche übergeordnete Struktur. Die Erkennungsstelle besteht aus zwei Palindromen (13 bp), die durch eine asymmetrische Kernsequenz (8 bp) voneinander getrennt sind (Abb. 1.5).

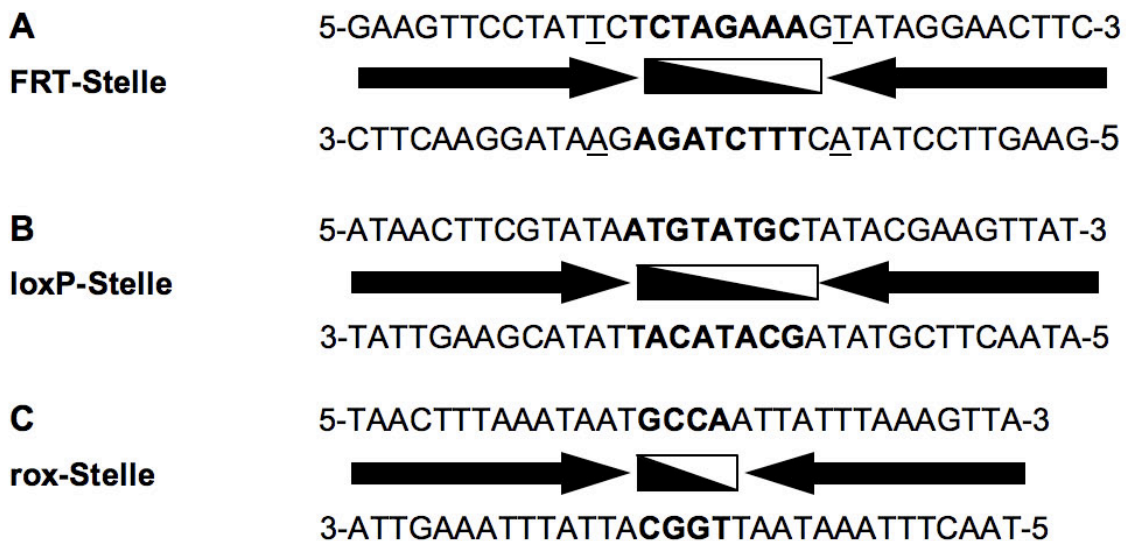


Abb. 1.5: Erkennungsstellen der ortsspezifischen Rekombinasen FLP, Cre und Dre. Die Erkennungssequenzen unterscheiden sich auf Nukleotidebene, besitzen aber eine gleiche übergeordnete Struktur. Sie bestehen aus zwei invertierten Wiederholungssequenzen (Horizontalpfeile), die eine asymmetrische Kernsequenz (asymmetrisch gefärbtes Rechteck) flankieren. Das Rekombinationsereignis findet in der Kernsequenz statt. (A) Erkennungsstelle von FLP (*FLP recognition target*; FRT-Stelle). Im Gegensatz zu einer loxP-Stelle enthält eine FRT-Stelle ein nicht ganz perfektes Palindrom mit einer unterschiedlichen Base (unterstrichen). (B) Erkennungsstelle von Cre (*locus of X-over in P1*; loxP-Stelle). (C) Erkennungsstelle von Dre (*region of X-over recombination*; rox).

Die DNA-Rekombination findet innerhalb der Kernsequenz statt (Amin et al.; 1991). Die Asymmetrie legt die Orientierung der FRT- und loxP-Stellen zu einander fest. Tyrosin-Rekombinasen deletieren eine dazwischen liegende DNA-Sequenz, wenn die Erkennungsstellen gleich orientiert sind (Hoess et al.; 1986) und invertieren das Fragment bei entgegengesetzter Orientierung (Abb. 1.5.B). FLP und Cre benötigen beide keine Kofaktoren, um DNA sequenzspezifisch zu rekombinieren (Stark et al.; 1992). Sie eignen sich daher auch für den heterologen Einsatz in anderen Organismen. Das Cre/loxP-System wird gegenüber der Anwendung des FLP/FRT-Systems aufgrund seiner höheren Effizienz bevorzugt (zur Übersicht siehe Lewandoski 2001). Die schlechtere Effizienz von FLP in Säugetierzellen lässt sich darauf zurückzuführen, dass das Temperaturoptimum des Herkunftsorganismus von FLP (*S. cerevisiae*) bei 25-30°C liegt. Die FLP-Rekombinase zeigt eine deutlich verringerte

Enzymstabilität und damit einhergehend eine niedrigere Rekombinationseffizienz in Säugerzellen (Buchholz et al.; 1996). In einer Folgestudie aus dem Jahr 1998 generierten Buchholz und Kollegen eine thermostabilere Variante (FLPe; FLP *enhanced*). Obwohl FLPe ungefähr fünfmal effizienter als die wildtypische FLP-Rekombinase ist, beträgt ihre relative Effizienz verglichen mit Cre nur 25% (Buchholz et al., 1998). Diese FLP intrinsische Limitation erschwert die Anwendung in Säugetierzellen. Die jüngste Publikation von Sauer und McDermott (2004) beschreibt eine Cre ähnliche Rekombinase aus dem Phagen D6, welche die Autoren Dre nannten. Die Dre-Rekombinase weist auf DNA-Ebene eine 39%ige Homologie zur Cre-Rekombinase auf. Ist aber ein heterospezifisches Cre-Homolog, welches ähnlich effizient wie Cre, statt der loxP-Stellen rox-Stellen (*region of X-over recombination*; Sauer McDermott, 2004) erkennt und diese miteinander rekombiniert. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu Cre könnte Dre in Zukunft zu einer vielversprechenden Alternative für die FLP-Rekombinase werden.

Regulation der Rekombinasen-Aktivität in Säugerzellen

Die konditionale Mutagenese ist eine effiziente Technik, um Gene zeitlich oder räumlich kontrolliert zu manipulieren. Die Erkennungssequenzen beeinflussen in der Regel nach ihrer Integration nicht die Expression der angrenzenden Gene (Silver et al.; 2001). Ein konditionales Allel verhält sich im Normalfall wie das Wildtyp-Allel. Nur durch eine SSR-vermittelte Rekombination kann die konditionale Mutagenese induziert werden (zur Übersicht siehe Lewandoski, 2001). Die Regulation der Aktivität von ortsspezifischen Rekombinasen nimmt dabei eine Schlüsselrolle ein. Erst die kontrollierte SSR-Aktivität ermöglicht eine Genfunktion zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Entwicklung oder aber gewebespezifisch zu analysieren. Hierbei werden verschiedene Strategien verfolgt, die Deletion (*loss of function*) oder Überexpression (*gain of function*) des entsprechenden Gens. Im Mausmodell wird durch Kreuzung zweier transgener Linien eine Mauslinie hergestellt, die ein modifiziertes Zielgen und eine SSR-Expressionskassette hat, die sich unter Kontrolle eines zellspezifischen, entwicklungsspezifischen oder Tetracyclinabhängigen Promotor befindet. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Mausstämmen, die Cre oder Flp unter unterschiedlichen Promotoren exprimieren (Imai et al. 2001; Dymecki and Tomaszewicz 1998).

Klassische Methoden zur *in vitro* Regulation der Rekombinase-Aktivität, beruhen auf dem Einbringen der entsprechenden kodierenden DNA (z.B. durch Transfektion oder virale

Transduktion; Abb. 1.6.A). Bei diesen Anwendungen besteht das Risiko permanenter genetischer Modifikationen durch insertionale Mutagenese. Darüber hinaus müssen transfizierte Zellen meist selektiert, bzw. isoliert werden bevor der biologische Effekt analysiert werden kann.

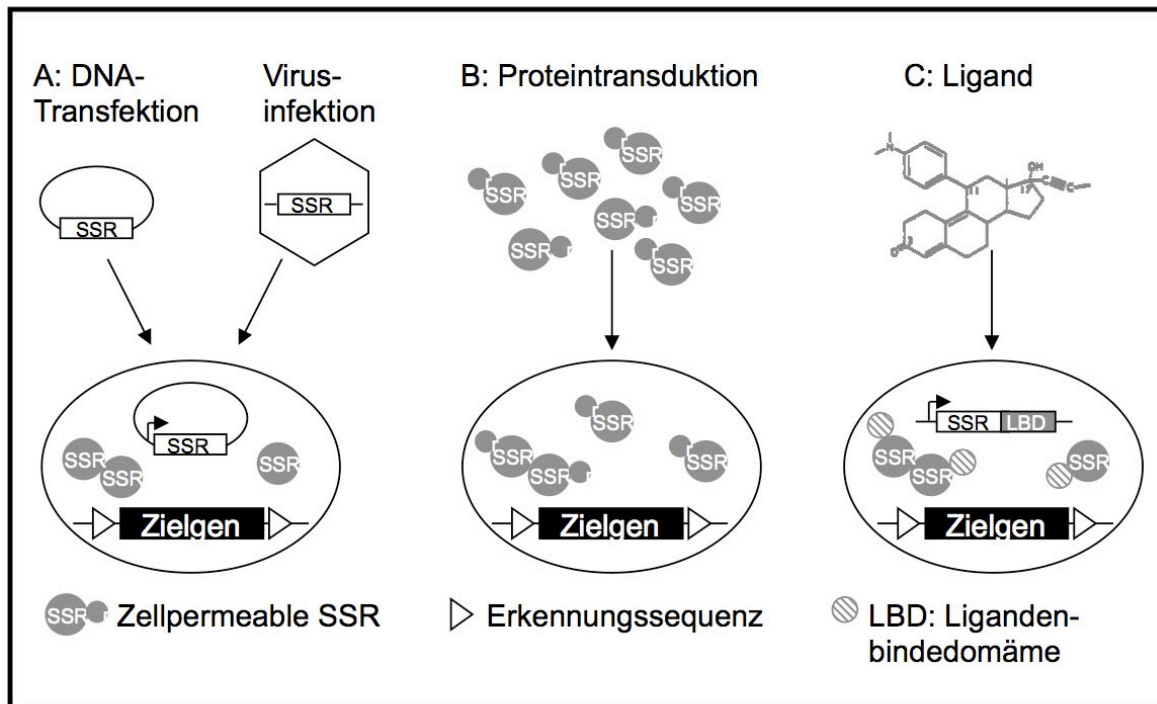


Abb. 1.6: Übersicht der experimentellen Herangehensweisen zur Induktion von SSR-Aktivität in Säugerzellen. (A) DNA-Transfer durch Transfektion oder Virusinfektion. (B) Proteintransfer durch Verwendung zellpermeabler Rekombinasen. (C) Transgene Zellen, die eine SSR als Fusionsprotein gekoppelt an eine Ligandenbindedomäne exprimieren, können auf der posttranslationalen Ebene aktiviert werden.

Zumal technische Limitierungen, wie schlechte Transfektionsraten, hohe erforderliche Zellzahlen oder eine unzureichende Kontrolle der Expression des Zielgens die Analyse erschweren können. Eine Alternative, um die aufgeführten Limitation zu umgehen, ist der direkte Transfer von biologisch aktivem Protein in Zielzellen (Abb. 1.6.B). Diese Technik wird Proteintransduktion genannt und ist im nachfolgenden Kapitel 1.5 ausführlich beschrieben. Eine weitere Methode, um die Aktivität von SSRs zu regulieren, erfolgt auf posttranslationaler Ebene. Bei der posttranslationalen Regulation liegt im Zytoplasma die translatierte Rekombinase in einem temporär inaktivierten Zustand vor (Abb. 1.6.C). Die ortsspezifische Rekombinase wird als Fusionsprotein mit einer mutierten ligandenbindenden Domäne eines Steroidrezeptors (LBD) exprimiert. Das Fusionsprotein verbleibt aufgrund seiner Bindung an das molekulare Chaperon Hsp90 im Zytoplasma. Erst nach der Bindung

des Induktors an die LBD löst sich das Hsp90 und die Rekombinase kann in den Zellkern translozieren, wo sie die FRT-, loxP- oder rox-modifizierte Allele rekombinieren kann. Als Induktor werden synthetische Steroide verwendet. Im Fall einer mutierten Progesteron-LBD (PR-LBD) wird der synthetische Ligand RU486 (Kellendonk et al., 1996; Schwenk et al., 1998) und bei einer mutierten Estrogen-LBD (ER-LBD) wird der synthetische Ligand Tamoxifen benutzt (Hunter et al., 2004; Indra et al. 1999). Dadurch ist die SSR-vermittelte Rekombination abhängig von der extrazellulären Applikation des synthetischen Steroids. Speziell bei posttranslationaler Regulation kann eine basale Hintergrundaktivität ein Problem darstellen. Bei der PR1-Domäne konnte die Hintergrundaktivität erfolgreich reduziert und gleichzeitig die Sensitivität für RU486 gesteigert werden (Wunderlich et al. 2001). Die kombinatorische Verwendung von Progesteron- und Estrogen-LBD würde es erlauben, zwei Rekombinationsereignisse unabhängig voneinander, z.B. zu unterschiedlichen Zeitpunkten, zu induzieren.

1.3 Proteintransduktion

Die Aufnahme von Makromolekülen in Zellen erfolgt weitgehend Rezeptorkontrolliert, da die Barrierefunktion der Zellmembran eine unspezifische Aufnahme von aktivem Protein stark einschränkt. Die Technik der Proteintransduktion ist eine Möglichkeit diese Barriere zu überwinden. Durch Fusion einer so genannten Proteintransduktionsdomäne (PTD) an Frachtmoleküle erhalten diese zellpermeable Eigenschaften und können dadurch die Zellmembran durchqueren.

1.3.1 Proteintransduktionsdomäne

Proteintransduktionsdomänen (PTDs) sind kurze Peptidsequenzen, die an sich eine zellpermeable Eigenschaft besitzen. Durch die Fusion einer PTD kann die Zellpermeabilität auf ein Frachtmolekül übertragen werden. Natürlich vorkommende PTDs, die auch *cell penetrating peptides* (CPPs) genannt werden, wurden in pflanzlichen und bakteriellen Toxinen (Falnes und Sandvig, 2000), Wachstumsfaktoren (Jans und Hassan, 1998), Homeoproteinen (Joliot et al., 1998; Sugiyama et al., 2008) sowie in viralen Proteinen (Frankel und Pabo, 1988; Green und Loewenstein, 1988; Elliott und O'Hare, 1997) identifiziert (zur Übersicht siehe Prochiantz, 2000). Die Proteintransduktionstechnik findet in der Regel in Form von rekombinanten Proteinen Anwendung (Übersicht bei Dietz und Bähr,

2004; Patsch und Edenhofer, 2007). Die Entwicklung der Proteintransduktionstechnik basiert auf der Fähigkeit des Tat (*trans-activator of transcription*) Proteins aus dem HI-Virus-1 (*human immunodeficiency virus type 1*). Tat ist ein Schlüsselfaktor für die Virusreplikation und vermittelt darüber hinaus die Pathogenität der HI-Viren (Madore et al., 1993). Im Jahr 1988 berichteten Green und Loewenstein sowie Frankel und Pabo unabhängig voneinander, dass synthetisiertes Tat Protein in der Lage ist in HeLa Zellen einzudringen und die Transkription am viralen Promotor zu transaktivieren. In einer Studie konnten Fawell und Kollegen zeigen, dass ein kurzer Sequenzabschnitt des Tat Proteins (AS 37-72) ausreicht, um die Zellpermeabilität zu vermitteln (Fawell et al., 1994). Eine nachfolgende Studie identifizierte innerhalb dieses Abschnittes eine 10 Aminosäuren lange basische Region (TAT), welche die Aminosäurereste 48-57 des HIV-Tat-Proteins umfasst (Nagahara et al., 1998). In der Studie wurde die basische Region (TAT) an den rekombinant hergestellten CDK-Inhibitor p27Kip1 fusioniert (TAT-p27Kip1), welcher die Migration von Zellen induzierte (Nagahara et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die TAT-Domäne als PTD verwendet. Die TAT Domäne stellt die gebräuchlichste und am erfolgreichsten verwendete PTD dar (Dietz und Bahr, 2004).

1.3.2 Mechanismus der PTD-vermittelten-Transduktion

Der Mechanismus der Proteintransduktion ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Die ursprünglich formulierte Hypothese ging davon aus, dass rekombinante Fusionsproteine durch direkte Penetration die Membran überwinden. Als Triebkraft des Prozesses wurde die Freisetzung von Energie nach dem Membrantransfer durch die intrazelluläre Rückfaltung des denaturierten PTD-Fusionsproteins vermutet (Abb. 1.7.B; Nagahara et al., 1998; Bonifaci et al., 1995). Eine weitere Hypothese beschreibt die zelluläre Aufnahme von PTD-Fusionsproteinen über invertierte Mizellen (Abb. 1.7.A; Derossi et al., 1998). Neuere Studien widersprechen allerdings den ursprünglich formulierten Hypothesen, da nicht nur denaturierte sondern auch native PTD-Fusionsproteine, deren PTD eine positive Nettoladung aufweisen, die Zellmembran durchqueren. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird davon ausgegangen, dass die zelluläre Aufnahme der Frachtmoleküle zum Grossteil über Makropinozytose erfolgt (Abb. 1.7.C; Kaplan et al., 2005). Die Makropinozytose, und die mit ihr einhergehenden Reorganisierung des Aktinzytoskeletts, ist einer der Hauptinternalisierungswege von PTD-Fusionsproteinen. Zusätzlich gibt es Indizien dafür, dass die zelluläre Aufnahme parallel über

verschiedene endozytotische Internalisierungsmechanismen erfolgt, wie die Clathrin-/Caveolin-abhängige Form der Endozytose (Abb. 1.7.C). Das relative Verhältnis der Mechanismen zueinander ist variabel, abhängig von der PTD-Struktur und von den Eigenschaften des Frachtmoleküls (Nakase et al., 2004).

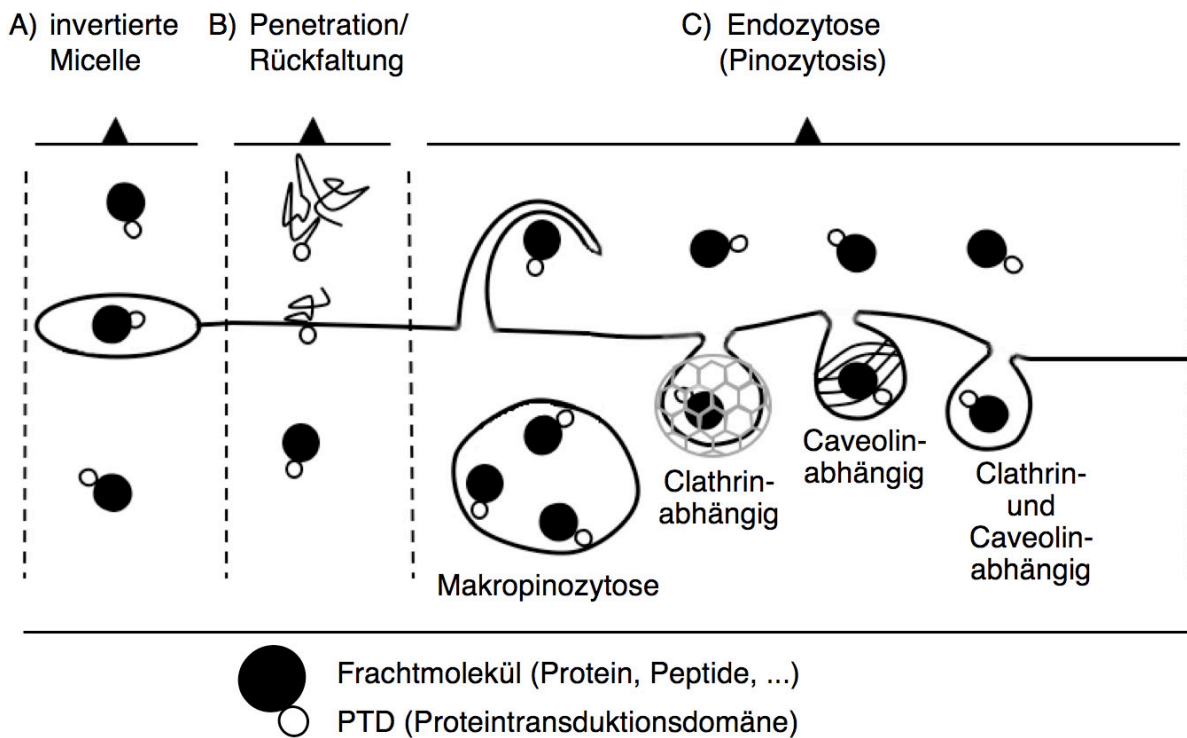


Abb. 1.7: Verschiedene Modelle für den zellulären Aufnahmemechanismus von Proteinen mit fusionierter Proteintransduktionsdomäne (PTD). (A) Zelluläre Aufnahme über die Ausbildung von invertierten Mizellen. (B) Direkte Penetration der Lipiddoppelmembran des PTD-Fusionsproteins und nachfolgender Rückfaltung. (C) Unterarten der endozytotischen Aufnahme. Adaptiert von Patsch und Edenhofer (2007).

Darüber hinaus gibt es Evidenz dafür, dass kleinere Proteine oder Peptide über einen Endozytose unabhängigen Internalisierungsweg in die Zelle aufgenommen werden (Tünnemann et al. 2006). Rothbard et al. (2005) zufolge könnte dieser alternative Internalisierungsmechanismus über die initiale Ausbildung von lipophilen Ionenpaaren zwischen den Guanidin-Gruppen der PTD und den Sulfat- oder Phosphatresten der Zellmembran ablaufen. Die Diffusion entlang des Membranpotentials würde als treibende Kraft die Internalisierung ermöglichen. Des Weiteren zeigten Tünnemann und Kollegen, dass der Aufnahmemechanismus von der Größe und der Gesamtladung des PTD-Fusionsproteins abhängig ist. Als Initialschritt gilt die Bindung der positiv geladenen PTD an die negativ geladene Zelloberfläche über elektrostatische Wechselwirkungen. Die basische Guanidin-Gruppe des Aminosäure Arginin bindet als essentielles Strukturelement der PTDs an die

sauren Heparansulfate (HS) der extrazellulären Proteoglykanmatrix (Wender et al., 2000). Das polyanionischen HS ist als essentiell für eine zelluläre Aufnahme von PTD-Fusionsprotein beschrieben worden (Console et al., 2003; Tyagi et al., 2001). Die Aufnahme des PTD-Fusionsproteins erfolgt kaum über die Rezeptor-vermittelte oder Clathrin-/Caveolae-abhängige Form der Endozytose, sondern hauptsächlich über Makropinozytose (Abb. 1.7.C; Kaplan et al., 2005).

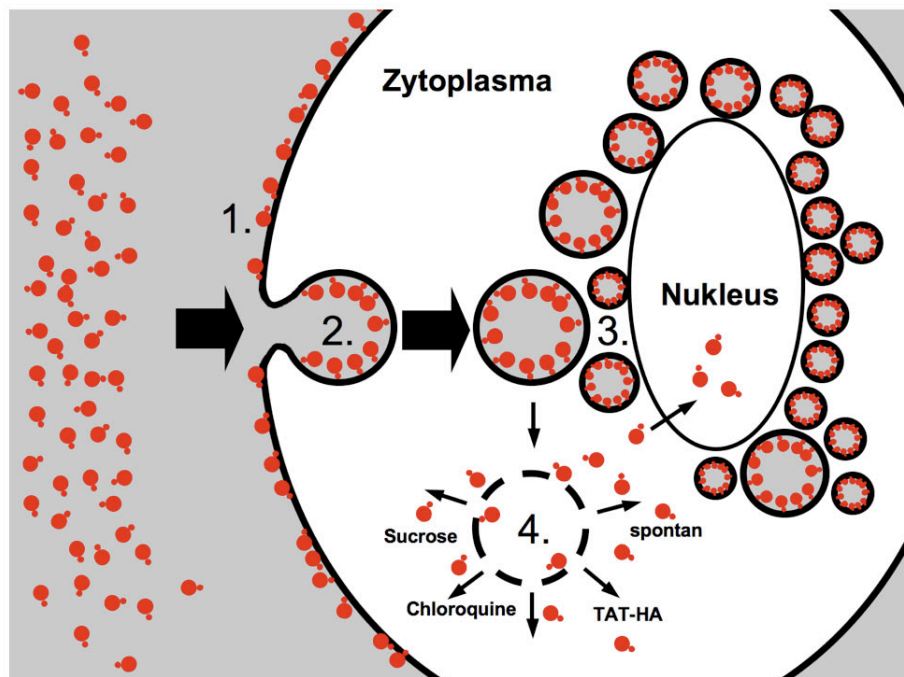


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der zellulären Aufnahme von TAT-Fusionsproteinen. (1.) Die Elektrostatische Interaktion zwischen der basischen TAT-Domäne und den sauren Heparansulfat-Proteoglykanen der extrazellulären Matrix ist der initiale Schritt. (2.) Internalisierung der Fusionsproteine über Makropinozytose. (3.) Die mit PTD-Fusionsproteinen beladenen Vesikel lagern sich häufig perinukleär an. (4.) Die spontane Freisetzung des TAT-Fusionsprotein ins Zytoplasma ist der limitierende Schritt einer Proteintransduktion (Kaplan et al., 2005). Modifiziert von Patsch und Edenhofer, 2007.

Die endozytotischen Einschlüsse werden als Makropinosomen bezeichnet und erreichen eine Größe von bis zu 1 μm Durchmesser. Die Makropinosomen werden nicht Teil des endosomen-lysosomalen Aufnahmeweges, wie es bei Clathrin-/Caveolae-abhängigen Endosomen der Fall ist. Makropinosomen beladen mit PTD-Fusionsproteinen ordnen sich häufig perinukleär an, was ein Indiz dafür sein könnte, dass sie über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgiapparat *recycled* werden (Caron et al., 2004). Wie die PTD-Fusionsproteine aus den Makropinosomen in das Zytoplasma gelangen ist noch nicht bekannt. Das Wissen um den Mechanismus könnte helfen die Proteintransduktion effizienter zu

machen, da es sich hierbei um den limitierenden Schritt der PTD-vermittelten Transduktion handelt. Es wurde abgeschätzt, dass mehr als 99% des aufgenommenen PTD-Fusionsproteins in den Makropinosomen verbleibt und nicht freigesetzt wird (Kaplan et al., 2005). Eine Strategie zum Aufbruch der Vesikelmembran und der damit verbundenen zytoplasmatischen Freisetzung des PTD-Fusionsproteins ist die Ko-Transduktion mit dem fusogenen dTAT-HA2. Mit dTAT-HA2 konnten die Makropinosomen aufgebrochen und die Menge an intrazellulär freigesetztem TAT-Fusionsprotein erhöht werden (Wadia et al., 2004). Auch andere lysomotrophe Agenzien wie Chloroquin oder Sucrose können verwendet werden, um die endosomale Integrität zu zerstören (Wadia et al., 2004). Das aus D-Aminosäuren synthetisierte dTAT-HA2 Peptid ist eine Fusion aus der N-terminalen TAT-Domäne und den C-terminal gelegenen 20 Aminosäuren des Hemagglutininproteins (HA2) des Influenzavirus. HA2 ist ein pH-sensitives, fusogenes Peptid, das bei sinkendem pH-Wert in der Lage ist, den Zusammenhalt von Vesikelmembranen zu destabilisieren (Skehel et al., 2001; Han et al., 2001).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die funktionale Rolle des Transkriptionsfaktors Sox2 sowohl in pluripotenten ES-Zellen als auch in der frühen neuralen Differenzierung analysiert werden. Um Aufschluss über die Rolle von Sox2 in der Pluripotenzerhaltung von ES-Zellen zu erhalten, sollten die Auswirkungen eines Cre-induzierbaren Sox2 *knockdown* (*loss-of-function*) sowie einer Cre-induzierbaren Sox2-Überexpression (*gain-of-function*) in ES-Zellen untersucht werden. Ein *knockdown* von Sox2 sollte durch die Verwendung des pSico-shSox2 Expressionssystems und eine Sox2-Überexpression mit Hilfe des pBO1-Sox2-IP Expressionssystem erzielt werden. Die Cre-induzierbare pBO1-IP Expressionskassette erlaubt eine reversiblen konditionale Transgenexpression.

Generell sollte der Einsatz von zellpermeablen ortsspezifische Rekombinasen zur Induktion konditionaler Systeme in embryonalen Stammzellen des Menschen und der Maus evaluiert werden.

Hierfür sollte FLP als zusätzliche zell-permeable DNA-Rekombinase zu Cre zur Durchführung einer reversiblen konditionalen Überexpression etabliert werden, um eine Modulation des Sox2-Expressionsniveaus zu erreichen. Es galt zu untersuchen, ob die FLP-Proteintransduktion in ES-Zellen eine geeignete Methode zur konditionalen Manipulation von ES-Zellen darstellt und inwieweit die TAT-FLP behandelten ES-Zellen ihre Pluripotenz beziehungsweise ihre Fähigkeit zum Keimbahntransfer beibehalten.

Als weitere mögliche Alternative zur FLP-Rekombinase sollte in diesem Zusammenhang auch das Potential der Dre-Rekombinase in seiner Funktion als genetisches Werkzeug analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemische und biologische Werkstoffe

2.1.1 Geräte

Bakterienschüttler

innova 44	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
innova 4300	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
EB KS-15	Johanna Otto GmbH (Hechingen)
Inkubationshaube TH 15	Johanna Otto GmbH (Hechingen)

Chemielumineszenzdetektion

ChemiDocXRS	BioRad (München)
-------------	------------------

Elektrophorese

Standard Power Pack P25	Biometra (Göttingen)
Powerpack 200	BioRad (München)
Agagel Mini	Biometra (Göttingen)
Agagel Midi-Wide	Biometra (Göttingen)
Agagel Maxi	Biometra (Göttingen)
Protean III Mini Gel System	BioRad (München)

Elektroporationsgerät

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

FACS

FACSdiva	BD (Mountain view, USA)
----------	-------------------------

Hybridisierungsöfen

BFD53	Binder GmbH (Tuttlingen)
-------	--------------------------

Inkubator

Heracell	Heraeus (Hanau)
----------	-----------------

Mikroskope

Axiovert 25	Zeiss (Göttingen)
Axiovert 40C	Zeiss (Göttingen)

Axiovert 200M
Axioskop2

Zeiss (Göttingen)
Zeiss (Göttingen)

pH-Meter

CG840

Schott (Mainz)

Photometer

BioPhotometer
NanoDrop

Eppendorf (Hamburg)
Peqlab (Erlangen)

Schüttler

ROTO-SHAKE Genie
VORTEX-2 Genie

Scientific Industries (New York, USA)
Scientific Industries (New York, USA)

Sonikator

SONOPLUS HD 2070

BANDELIN electronic (Berlin)

Sterile Werkbänke

Herasafe
Hera guard HPH 12/95

Heraeus (Hanau)
Heraeus (Hanau)

UV-Transilluminatoren

GelVue GVM20
Gel Doc EQ

SYNGENE (Cambridge, GB)
BioRad (München)

Waagen

LA310S
BL610

Sartorius (Göttingen)
Sartorius (Göttingen)

Zentrifugen

5416 R
5415 D
Biofuge pico
Megafuge 1.0R
RC5B plus
RC26 plus
Discovery 90SE

Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf (Hamburg)
Heraeus (Hanau)
Heraeus (Hanau)
Thermo (Waltham, USA)
Thermo (Waltham, USA)
Sorvall (Newton, USA)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Pipetten, Gewebekulturschalen, *multi-well* Platten, Zentrifugations-Röhrchen, Zellschaber und Zellsiebe wurden 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) bezogen. Die verwendete Glasware wurde von der Firma Schott (Mainz) erworben.

2.1.3 Chemikalien allgemein

Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden die Chemikalien von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Fluka (Bad Homburg), Merck (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe) und PAA (Pasching, Österreich) bezogen.

Generell wurden Lösungen mit entionisiertem Wasser einer Milipore-Filteranlage angesetzt.

2.1.4 Materialien und Chemikalien für proteinbiochemische Methoden

6xHis Protein Leiter	Qiagen (Hilden)
15ml-Konzentratoren (10.000 MWCO)	Sartorius (Göttingen)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Carbenicillin	Roth (Karlsruhe)
Chloramphenicol	Roth (Karlsruhe)
Dialysemembran ZelluTrans (V-Serie)	Roth (Karlsruhe)
DTT	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
<i>GelCode Blue</i> Farbe-Reagenz	Perbio (Bonn)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
Nitrozellulosemembran	Roth (Karlsruhe)
Penta-His HRP Conjugate Kit	Qiagen (Hilden)
<i>Prestained</i> Protein Marker (6-175 kDa)	NEB (Frankfurt am Main)
<i>SuperSignal</i> West Pico	Perbio (Bonn)
<i>SuperSignal</i> West Femto	Perbio (Bonn)

2.1.5 Materialien und Chemikalien für molekularbiologische Methoden

100mM dATP-, dCTP-, dGTP- und dCTP Set	Peqlab (Erlangen)
1kb DNA Leiter	NEB (Frankfurt am Main)
100bp DNA Leiter NEB	NEB (Frankfurt am Main)

Agarose für präparative Zwecke	Biozym (Hess. Oldendorf)
NHS-Rhodamine	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
pGEM-T Easy Vector System I	Promega (Mannheim)
Trizol	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.6 Materialien und Chemikalien für zellbiologische Methoden

Albumax	Gibco (Karlsruhe)
B27	Gibco (Karlsruhe)
BMP4 (<i>Bone Morphogenetic Protein 4</i>)	R&D Systems (Wiesbaden)
BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	Gibco (Karlsruhe)
DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
D-MEM Medium 4500mg/l Glukose	Gibco (Karlsruhe)
D-MEM/F-12	Gibco (Karlsruhe)
D-MEM Knockout	Gibco (Karlsruhe)
DMSO	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dulbecco's PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	Gibco (Karlsruhe)
EGF	R&D Systems (Wiesbaden)
FCS (<i>Fetal Calf Serum</i>)	Gibco (Karlsruhe)
FGF-2 human (Basic Fibroblast Growth Factor 2)	Invitrogen (Karlsruhe)
FGF-2 bovine (Basic Fibroblast Growth Factor 2)	R&D Systems (Wiesbaden)
Fibronektin (bovine)	Invitrogen (Karlsruhe)
Fugene HD	Roche (Mannheim)
G-418 Sulfat	PAA (Pasching)
Gelatine Typ A	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Gentamycin-Lösung	Gibco (Karlsruhe)
GlutaMAX D-MEM mit 4500mg/l Glucose	Gibco (Karlsruhe)
Insulin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Laminin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin	Gibco (Karlsruhe)
LIF (<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>)	Chemicon (Hofheim)
Matrigel	Gibco (Karlsruhe)
β -Mercaptoethanol	Gibco (Karlsruhe)
N2 Supplement	Gibco (Karlsruhe)
Natriumpyruvat	Gibco (Karlsruhe)
Natrium-Selenit	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Neurobasal Medium	Gibco (Karlsruhe)
nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco (Karlsruhe)
Opti-MEM Medium	Gibco (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco (Karlsruhe)
Progesteron	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Puromycin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Polyornithin (PO)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Putrescin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RU486	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TAT-HA	Invitrogen (Karlsruhe)
Transferrin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypan-Blau	Gibco (Karlsruhe)

2.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper für Zellfluoreszenzfärbungen:

α -AFP (Kaninchen IgG, 1:100)	Dako (Hamburg)
α -Caspase-3 (Kaninchen IgG, 1:500)	Cell Signaling (Danvers, USA)
α -FLAG (Maus IgG, 1:500)	Sigma-Aldrich (München)
α -hNestin (Kaninchen , 1:200)	Chemicon (Hofheim)
α -mNestin (Maus IgG, 1:100)	Chemicon (Hofheim)
α -Oct3/4 (Maus IgG, 1:4100)	Santa Cruz Biotechn. (Santa Cruz, USA)
α -Pax6 (Kaninchen, 1:200)	Covance (München)
α -Sma (Maus IgG, 1:200)	Dako (Hamburg)
α -Sox2 (Maus IgG 1:200)	R&D Systems (Wiesbaden)
α -TUJ1 (Kaninchen IgG, 1:1000)	Covance (München)
α -TUJ1 (Maus IgG, 1:500)	Covance (München)
α -ZO-1 (Kaninchen, 1:100)	Invitrogen (Karlsruhe)

Sekundäre Antikörper für Zellfluoreszenzfärbungen:

α -Kaninchen IgG Alexa Fluor 488 (1: 1000)	Invitrogen (Karlsruhe)
α -Maus IgG Alexa Fluor 488 (1: 1000)	Invitrogen (Karlsruhe)
α -Kaninchen IgG Alexa Fluor 555 (1: 1000)	Invitrogen (Karlsruhe)
α -Maus IgG Alexa Fluor 555 (1:1000)	Invitrogen (Karlsruhe)

Primäre Antikörper für Western Blots:

α -FLAG (Maus IgG, 1:1000)	Sigma-Aldrich (München)
α -Oct3/4 (Maus IgG, 1:400)	Santa Cruz (
α -Penta-His (Maus IgG, 1:2000)	Qiagen (Hilden)
α -Sox2 (Maus IgG 1:500)	R&D Systems (Wiesbaden)
α -STAT3 (Kaninchen, 1:800)	Cell Signaling (Danvers, USA)

Sekundäre Antikörper für Western Blots:

α -Kaninchen IgG HRP (1:3000)	Cell Signaling (Danvers, USA)
α -Maus IgG HRP (1:3000)	Cell Signaling (Danvers, USA)

2.1.8 Enzyme

Alfazym	PAA (Pasching)
Benzonase	Novagen (Darmstadt)
Dispase	Gibco (Karlsruhe)
DNase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
GoTaq Polymerase	Promega (Mannheim)
Kollagenase Typ IV	Gibco (Karlsruhe)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	NEB (Frankfurt am Main)
Restriktionsendonucleasen	NEB (Frankfurt am Main)
RNase A	Qiagen (Hilden)
Proteinase K	Roche (Mannheim)
Shrimp-Alkalische Phosphatase	Roche (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	NEB (Frankfurt am Main)
T4-DNA-Polymerase	NEB (Frankfurt am Main)
TAT-HA	Invitrogen (Karlsruhe)
Taq DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin/EDTA	Gibco (Karlsruhe)

2.1.9 Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders aufgeführt von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Alle Sequenzierprimer wurden so konstruiert, dass sie eine Schmelztemperatur von ca. 60 °C haben.

BOI-Sox2-IP (sense):
TAC AGC TGT GCG GCC ACC

BOI-Sox2-IP (antisense):
GAG ATC GAC GGT ATC G

pSico (sense) :
CAA ACA CAG TGCA CAC CAC GC

pNN_Dre_PR650-914 (sense):
TCT CCA CAG GTGT CCA CTC

pNN_Dre_PR650-914 (antisense):
GCT TGG CTT TCA TTT GGA AC

pSESAME-HTNDre (sense):
TAA TCC GGG ACC TTT AAT TC

pSESAME-HTNDre (antisense):
GCT CAA GGG GCT TCA TGA TG

2.1.10 Inhibitoren

Camptothecin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dorsomorphin	Merck (Darmstadt)
Purmorphamine	Merck (Darmstadt)
PI(3) Kinase Inhibitor	Merck (Darmstadt)
SB432542	Merck (Darmstadt)
SU5402	Merck (Darmstadt)
Trypsin-Inhibitor	Gibco (Karlsruhe)
Y-27632 (ROCK Inhibitor)	Merck (Darmstadt)

2.1.11 Plasmide

pTriEx-1 (Novagen, Darmstadt)

Zu Beginn dieser Arbeit lagen bereits die folgenden Konstrukte im pTriEx-1-Vektor vor: pTriExHTNCre (Peitz et al., 2002), pTriExHTNFLP (Patsch et al., eingereicht), Der pTriEx-Vektor enthält pro- und eukaryotische Regulationselemente für die Genexpression.

pNN_CrePR650-914 (Wunderlich et al. 2001)

Expressionsplasmid für das CrePBD-Fusionsprotein (Cre-Progesteron-ligandenbinde-Domäne).

pSico (Ventura et al., 2004)

Lentiviraler Vektor mit einer Cre-induzierbaren RNAi Expressionskassette. Nach Cre-vermittelter Rekombination werden shRNAs transkribiert.

pMD2.G (Aus dem Labor von Didier Trono)

Das pMD2.G Plasmid codiert für ein heterologes Hüllenprotein, um den Virusvektor zu pseudotypisieren. Es exprimiert *VSV.G*, angetrieben durch den CMV-Promoter

psPAX2 (Aus dem Labor von Didier Trono)

Verpackungs-Vektor codiert für das HIV-GAG zur Produktion von Lentiviren in Säugetierzellen.

pSV-krox-LacZ (Zhang and Stewart, unpubliziert)

Das Plasmid trägt das offene Leseraster für ein LacZ-Gen, welches erst nach einer Dre-vermittelte Rekombination exprimiert werden kann. Die eukaryotische Expressionskassette wird durch einen ^PSV40 Promoter angetrieben.

2.1.12 Bakterienstämme

BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt)

lon- und *ompT*-Proteasen defizienter BL21-Stamm mit T7 RNA-Polymerase. Bakterienstamm wurde für Expression von TAT-FLP und TAT-Dre verwendet.

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

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

DH5a (Gibco, Karlsruhe)

Bakterienstamm für Standardklonierungen

Stb13 (Invitrogen, Karlsruhe)

Bakterienstamm wurde zur Klonierung und Plasmidpräparation lentiviraler Konstrukte benutzt.

2.1.13 Bakteriennährmedien

LB-Medium (*Luria-Bertani*; Sambrook et al., 1989):

10 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	Natriumchlorid
ad 1 l	H ₂ O

TB-Medium (*Terrific-Broth*; Tartof und Hobbs, 1987)

12 g/l	Trypton
24 g/l	Hefeextrakt
2,31 g/l	KH ₂ PO ₄
12,54 g/l	K ₂ HPO ₄
4 ml	Glycerin
ad 1 l	H ₂ O

LB-Agar-Platten:

Diese Festmediumplatten bestehen aus LB-Medium dem 1 % Agar zugesetzt wurden. Dieses Festmedium wurde im kochenden Wasserbad geschmolzen. Dem auf 50°C abgekühltem

Medium wurde eine entsprechende Konzentration an Antibiotikum zugegeben und in Plastik-Petrischalen gegossen. Die Platten wurden über Nacht bei RT ausgehärtet und anschließend bei 4°C maximal vier Wochen gelagert.

finale Antibiotikakonzentrationen:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml
Carbenicillin	50 µg/ml

2.1.14 Säugetierzelllinien

Bruce4 FC-LacZ (Kessler 2009)

Murine ES-Zellen (Mausstamm C57/Bl6), die als transgene Flp-Reporterzelllinie die FC-lacZ-Expressionskassette integriert haben. Das Transgen enthält ein offenes Leseraster eines LacZ-Gens, welches nach FLP-vermittelter DNA-Rekombination als β -Galaktosidase exprimiert wird.

CV1 (Jensen et al. 1964)

Die CV1-Zelllinie wurde aus der Niere einer männlichen afrikanischen Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) gewonnen.

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

Ein Subklon der CV1- Zelllinie. Sie enthält ein einzelnes, stabil im Genom integriertes Cre-Reporterkonstrukt. Dieses Transgen enthält ein offenes Leseraster des β -Galaktosidasegens (LacZ), welches nach Cre-vermittelter Rekombination exprimiert wird.

CV1-krox-LacZ (Patsch und Edenhofer, unveröffentlicht)

Ein Subklon der CV1- Zelllinie, die ein stabil ins Genom integriertes Dre-Reporterkonstrukt (aus pSV-krox-LacZ) trägt. Dieses Transgen enthält ein offenes Leseraster des β -Galaktosidasegens (LacZ), welches nach Dre-vermittelter Rekombination exprimiert wird.

DR3 (aus dem genetischen Hintergrund C57Bl/6)

Dreifach resistente (Neomycin^R, Puromycin^R und Hygromycin^R) murine embryonale Fibroblasten (MEFs), die durch γ -Bestrahlung mitotisch inaktivierte wurden, um als

Fütterzellen (*feeder cells*) zur Kultivierung von humanen und murinen ES-Zellen verwendet zu werden.

E14 (Kehler et al., 2004)

Wildtyp ES-Zellen der Maus. Ein Subklon dieser Zelllinie (Bosnali 2008) wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die transgenen BO1-Sox2-IP zu generieren.

H9.2 (Amit et al., 2000)

Wildtypische humane embryonale dieser Stammzelllinie (Haifa, Israel) wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die transgenen BO1-SOX2-IP zu generieren.

HEK 293FT (Invitrogen, Karlsruhe)

Immortalisierte humane Zelllinie aus der Niere (*Human embryonic kidney Zellen*), die zur Virusherstellung verwendet wurde.

NIH 3T3 (ATCC Nummer: CRL-1658)

Murine Fibroblasten vom Zelltyp *swiss mouse embryo* wurden für transiente Expressionsstudien verwendet.

Rosa-rox-LacZ (Anastassiadis et al., 2009)

R1 ES-Zellen der Maus, die im ROSA26 Locus heterozygot für ein offenes Leseraster des β -Galaktosidasegens (LacZ) sind. Eine Dre-vermittelte Rekombination induziert die Expression der β -Galactosidase

2.1.15 Zellkulturmedien

Medium zur Kultivierung von Fibroblasten (MEF-Medium):

[10% v/v]	fötale Kälberserum (FCS)
[1 mM]	Natriumpyruvat
1x	nicht-essentielle Aminosäuren
[2 mM]	L-Glutamin
	in D-MEM + 4500mg/l Glucose

Medium zur Kultivierung von murinen ES-Zellen in Kokultur mit Feeder (MES-Medium):

[15% v/v]	fötale Kälberserum (FCS)
[1 mM]	Natriumpyruvat
1x	nicht-essentielle Aminosäuren
[2 mM]	L-Glutamin
[0,1 mM]	β -Mercaptoethanol

[5x 10⁵ U/l] LIF
in D-MEM + 4500mg/l Glucose

Medium zur Kultivierung von murinen ES-Zellen auf Gelatine (N2B27-Medium):

[12,5 µg/ml] Insulin
[50 µg/ml] Transferrin
[3 ng/ml] Progesteron
[8 µg/ml] Putrescin
[15 nM] Natrium-Selenit
[25µg/ml] BSA
[1 mM] L-Glutamin
0,5 x B27
[0,1 mM] β-Mercaptoethanol
[10⁶ U/l] LIF
10 ng/ml BMP4
in D-MEM/F-12 / Neurobasal Medium (1:1)

Medium für die neurale Differenzierung von ES-Zellen (N2-Medium):

[20 NM] Progesteron
[10µM] Putrescine
[30 nM] Na-Selenit
[25 µg/ml] Insulin,
[1,6 g/L] Glucose
[100 µg/ml] Transferrin
0,5x B27 Supplement
[10 ng/ml] EGF
[10 ng/ml] FGF-2
in DMEM/F12

Medium zur Kultivierung von humanen ES-Zellen in Kokultur mit Feeder (HES-Medium):

[20% v/v] Serum Replacement (SR)
[1 mM] Natriumpyruvat
1x nicht-essentielle Aminosäuren
[2 mM] L-Glutamin
[0,1 mM] β-Mercaptoethanol
[4 ng/µl] basic FGF
in Knockout-DMEM

dTAT-HA2-Lösung.

Das Peptid dTAT-HA2 wurde von der Firma Invitrogen bezogen. Es besteht aus D-Aminosäuren in folgender Aminosäuresequenz: RQRRKKRGGDIMGEWGNEIFGAI AGFLG. Das lyophilisierte Peptid wurde in Reinstwasser mit 1 mM DTT aufgenommen und auf eine Konzentration von 500 µM eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert und bei -80°C eingefroren.

Einfriermedium für Fibroblasten und murinen ES-Zellen:

[80%]	FCS
[20%]	DMSO

Einfriermedium für humane ES-Zellen

[80%]	SR
[20%]	DMSO

Dispase-Lösung:

[0,2 mg/ml]	Dispase in D-MEM/F-12
-------------	--------------------------

Kollagenase-Lösung:

[0,2 mg/ml]	Kollagenase in Knockout-D-MEM
-------------	----------------------------------

Trypsin/EDTA-Lösung

[0,25%]	Trypsin-EDTA in PBS
---------	------------------------

2.1.16 Zelladhäsionsfaktoren

Fibronectin

[1 µg/µl]	humanes Fibronectin in H ₂ O	Inkubation: 4 h bei 37°C
-----------	--	--------------------------

Gelatine

[0,1% v/v]	Gelatine Typ A in H ₂ O	Inkubation: 20 min bei 37°C
------------	---------------------------------------	-----------------------------

Laminin

[1 µg/ml]	humanes Laminin in PBS	Inkubation: 2 h bei 37°C
-----------	---------------------------	--------------------------

Matrigel

Matrigel 1:30	in Knockout-DMEM	Inkubation: 12 h bei 4°C
---------------	------------------	--------------------------

Polyornithine (PO)

[1.5 mg/ml]	Polyornithin in H ₂ O	Inkubation: 2 h bei 37°C
-------------	-------------------------------------	--------------------------

2.2 Molekularbiologie

2.2.1 Photometrische Quantifizierung von DNA

Eine DNA-Lösung unbekannter Konzentration wurde in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1 einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Durch Bestimmung der OD bei 280 nm kann über den Quotienten OD_{260}/OD_{280} die Reinheit der DNA bestimmt werden. Ein Quotient von $>1,8$ entspricht einer hinreichend reinen DNA-Lösung. Eine Erniedrigung des Quotienten deutet auf eine erhöhte Kontamination durch Proteine hin, da aromatische Aminosäuren wie auch DNA Licht der Wellenlänge von 280 nm absorbieren.

Enzymatische Hydrolyse von DNA

Zur Spaltung von DNA wurden ausschließlich Restriktionsendonucleasen vom Typ II (NEB, Frankfurt) verwendet. Die Reaktionen erfolgten unter Verwendung der vom Hersteller mitgelieferten Puffer und dem Zusatz von 1 % BSA bei empfohlener Temperatur. Die Inkubationszeit und die eingesetzte Enzymmenge richteten sich nach Art der DNA. Plasmid DNA wurde mit 2 - 5 U Enzym/ μg DNA für 1-2 Stunden inkubiert. Genomische DNA wurde mit 50 – 100 U für 24 - 48 Stunden inkubiert.

Dephosphorylierung von freien DNA Enden

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

Ligation von DNA

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

2.2.2 Präparation von DNA

Präparation von 100 – 200 mg Plasmid DNA aus E. coli

Eine Übernachtskultur von 100 ml LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum wurde von einer Agarplatte oder mit einem frischen Transformationsansatz angeimpft. Die Inkubation

erfolgte in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen über Nacht bei 37°C und 100 rpm in einem Bakterienschüttler (New Brunswick Scientific, Nürtingen). Die Plasmid DNA wurde aus den pelletierten Bakterien mit Hilfe des Plasmid Maxi Kit (Qiagen) extrahiert. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangabe unter der Zuhilfenahme der mitgelieferten Puffer und Aufreinigungssäulen nach dem Anionenaustauschverfahren.

Präparationen von 20 µg Plasmid DNA aus E. coli

Drei ml LB-Übernachtskultur wurden in einem 15 ml Falcon angeimpft. Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch einen Zentrifugationsschritt in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415 R) für 1 min mit 13.000 rpm pelletiert. Aus dem Bakterienpellet wurde mit Hilfe des GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham) entsprechend der Herstellerangabe die Plasmid DNA extrahiert. Eluiert wurde mit 50 µl 10 mM Tris/pH 8,5.

Präparation von genomischer DNA aus adhärenenten Zellen

Die Zellen wurden trypsiniert und für 3 min mit 1200 rpm pelletiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. In diesem Reaktionsgefäß wurden die Zellen erneut, diesmal in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415 R) für 4 min mit 4000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde aufgeschnippt und in 500 µl Lysepuffer auf dem Vortexer gut vermischt. Die Lyse erfolgte bei 50°C über Nacht auf einem Eppendorfthermoschüttler. Durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde die DNA gefällt. Ein Zentrifugationsschritt von 13.000 rpm (Eppendorf 5415 R) für 30 min bei RT pelletierte die DNA. Mit 1 ml 70 % EtOH wurde das Pellet 15 min lang bei 13.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5415 R), um Isopropanolreste und Salze auszuwaschen. Die Ethanollösung wurde dekantiert und das DNA Pellet für etwa 10 min bei RT getrocknet. Abhängig von der Größe des DNA Pellets wurde es in 50 – 300 µl TE-Puffer (+ RNase) gelöst. Der Lösevorgang fand über Nacht bei 37°C auf dem Thermoschüttler statt. Die so gewonnene genomische DNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

Zellysepuffer:	100 mM Tris-Cl/pH 8,0
	200 mM NaCl
	5 mM EDTA
	0,2 % (w/v) SDS
	200 µg/ml Proteinase K (frisch zugeben; Stammlösung 10 mg ml)

TE (Tris/EDTA) + RNase:	10 mM Tris-Cl/pH 8,5 1 mM EDTA 50 µg/ml RNase
-------------------------	---

Phenol-Chloroform-Extraktion

Über eine Phenol-Chloroform-Extraktion wurde genomische DNA von Protein-Verunreinigungen befreit. Die wässrige DNA-Lösung wurde mit einem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1; v/v; Roth) vermischt. Eine Beschleunigung der Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (5 min, 3000 rpm, Eppendorf 5415 R). Die untere, phenolhaltige Phase, wurde verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt und die wässrige, obere Phase, in der sich die DNA befindet, in ein neues Gefäß überführt. Um Phenolreste aus der Lösung zu entfernen, wurde sie mit einem gleichen Volumen Chloroform gut gemischt und abzentrifugiert. Die untere Chloroformphase wurde verworfen und der Schritt wiederholt.

Ethanolpräzipitation von DNA

Die wässrige DNA-Lösung wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung und 2,5 Volumen 100 % EtOH (Roth) gefällt. Durch 10faches Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde der Ansatz gemischt. Dabei wird die Hydrathülle der DNA durch das Ethanol verdrängt und die anionische DNA fällt abgesättigt mit Natriumkationen als Salz aus. Anschließend wurde das Präzipitat für 20 min bei 13.000 rpm pelletiert (Eppendorf 5415 R). Das DNA Pellet wurde nach 10 min trocknen in Tris-Cl/pH 8,5 aufgenommen.

Isolieren von DNA aus einem Agarose-Gel

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach einer Restriktionshydrolyse wurde die DNA in einem *Low Melting* Agarosegel (SeaKem) nach Größe aufgetrennt. Unter langwelligem UV-Licht wurde die erwartete Bande sichtbar gemacht und konnte mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten werden. Zur Extraktion des DNA-Fragments aus dem Agaroseblock wurde das Aufreinigungskit QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei dieser Methode wird zunächst die Agarose unter leicht sauren Bedingungen bei 50°C aufgelöst und anschließend wird die DNA an eine Sepharosesäule gebunden. Nach dem Entfernen der Agarose durch einen Waschschrift wird die DNA unter alkalischen Bedingungen wieder in Lösung gebracht.

2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel

DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt. In einem elektrischen Feld bewegt sich DNA aufgrund des negativ geladenen Phosphatrückgrats zur Anode. Dies geschieht mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts des DNA-Fragments ist. Durch die Zugabe des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid konnte die DNA unter kurzwelligen UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht werden. Die Größe der DNA-Fragmente wurde durch das parallele Auftragen eines Längenstandards ermittelt.

0,5 - 2 % (m/v) Agarose (Roth), abhängig von der Größe des aufzutrennenden Fragments wurde durch Aufkochen in einer Mikrowelle in TAE-Puffer gelöst. Nachdem die Lösung auf 40°C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Stammlösung 10 mg/ml) 1:10.000 hinzugegeben. Diese handwarme Argaroselösung wurde in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen, in der sie durch Abkühlen erstarrte. Das erstarrte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gelegt, mit TAE-Puffer überschichtet und die aufzutrennende DNA mit 1:10 Ladepuffer in die Geltaschen gegeben. Zur Orientierung während des Gellaufs, wie weit die Auftrennung bereits fortgeschritten ist, enthält der Ladepuffer zwei Farbstoffe Bromphenolblau (dunkelblau) und Xylencyanol (türkis), die abhängig der Agarosekonzentration mit definierten Fragmentgrößen ko-migrieren.

1 x TAE-Puffer (Tris-Acetat/EDTA):	40mM Tris 1 mM EDTA
10 x Ladepuffer:	30 % Glycerin Spatelspitz Bromphenolblau Spatelspitze Xyelencyanol

2.2.4 Southern Blot-Analyse

Mit der Analyse nach Southern (1975) können spezifisch Nukleotid-Sequenzen in einem Gemisch aus DNA-Fragmenten nachgewiesen werden, die zuvor über eine Gelelektrophorese aufgetrennt wurden.

Auftrennen und Blotten der genomischen DNA

Genomische DNA wurde 48 h mit 50 -100 U des entsprechenden Restriktionsenzym bei 37°C restringiert und anschließend in einem 0,9 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Zur späteren Zuordnung der Fragmentgröße wurde das Gel unter UV-Licht zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal photographiert und anschließend 20 min auf einem Schüttler in 0,25 M HCl depuriniert. In dieser Zeit wurde der Kapillartransfer vorbereitet. Dafür wurde eine Glasplatte über eine Wanne mit 0,4 M NaOH gelegt. Auf diese wurden Lagen von in NaOH getränktes Whatmanpapier (Schleicher & Schüll GmbH, Dassel) mit Kontakt zum Reservoir als Unterlage für das Gel platziert. Auf dieser Brücke aus Filterpapier wurden das Agarosegel und darüber eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim) gelegt und blasenfrei geglättet. Die Nylonmembran wurde mit einem zurechtgeschnittenen, angefeuchteten Whatmanpapier abgedeckt. Unter der Ausnutzung der Kapillarkraft als Triebkraft wurden zuletzt noch zwei Päckchen trockenes Apurapapier auf den Aufbau gelegt und mit einer Glasplatte und einem kleinen Gewicht (etwa 500 g) stabilisiert. Um einem Kurzschluss, (Puffertransfer an der Nylonmembran vorbei) ausgelöst durch einen Kontakt von Apurapapier mit dem Whatmanpapier unter dem Agarosegel vorzubeugen, wurde mit Hilfe einer Frischhaltefolie isoliert. Nach 13 – 20 Stunden wurde der Blot abgebaut und die Membran für eine Minute in 2 x SSC gewaschen. Danach wurde die Nylonmembran zwischen zwei Whatmanpapieren für zwei Stunden bei 80°C gebacken, um die DNA kovalent an das Nylonmaterial zu binden.

Radioaktive Markierung

Die trockene Nylonmembran mit der fixierten genomischen DNA wurde in eine Hybridisierungs-Röhre gesteckt und durch Ausspülen mit 6 x SSC angefeuchtet. Danach wurden 20 ml einer auf 65°C vorgewärmten Prähybridisierungslösung (ExpressHyp™, BD Bioscience) zugegeben und für mindestens 30 min inkubiert.

Die Sonde wurde mit Hilfe des *Random Primers DNA Labeling System* (Invitrogen) hergestellt: Als Templat diente ein 1,2 kb Fragment, welches aus der LacZ-Sequenz des CHL-DR-Vektor (S. Haupt und F- Edenhofer, unveröffentlichte Daten) mit *EcoR V* und *Kpn I* ausgeschnitten wurde. Die LacZ-Sequenz des FC-LacZ-Vektors wurde aus dem CHG-DR-Vektor kloniert.

Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei RT inkubiert und durch Zugabe von 5 µl Stopp-Reagenz (EDTA) abgestoppt. Die Aufreinigung der Sonde erfolgte auf einer mit TE-Puffer äquilibrierten Zentrifugationssäule mit Sepharosematrix (*Probe Quant™ G50 Micr Columns*, Amersham). Beschleunigt durch den Zentrifugationsschritt (1min; 3000 rpm, Eppendorf 5415 R) wurde durch das Prinzip der Größenausschlusschromatographie

Reaktionsansatz zur Polymerisierung eingesetzt. Wenn nun ein markiertes Nukleotid in den Strang eingebaut wird, kann die Synthese nicht fortgeführt werden, da das nächste Nukleotid nicht mit dem 3'OH-Ende des vorangegangenen verknüpft werden kann. Gegen Ende der Reaktion wird die Wahrscheinlichkeit immer größer, dass ein längerer Strang synthetisiert wird, da schon eine gewisse Menge an markierten Nukleotiden verbraucht ist. Die Reaktionsprodukte werden in einem Automaten aufgetrennt. Ein Laserstrahl des Sequenzierautomats liest aus der Abfolge der fluoreszenzmarkierten Abbruchbanden die Sequenz. Die Sequenzierreaktionen und Analysen wurden extern im Analyselabor der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Es wurden daher zur Sequenzierung eines Plasmids lediglich 150 – 300 ng hochreine DNA und Primer in einem Volumen von 6 µl vorgelegt.

2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Technik zur Amplifikation definierter, doppelsträngiger DNA-Fragmente (Saiki et al.; 1985). Das typische PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungs-, einem Hybridisierungs- und einem Elongationsschritt. Zu Beginn wird die Matrizen-DNA bei hoher Temperatur (95°C) aufgeschmolzen. Während des nachfolgenden Hybridisierungsschritts können an die frisch denaturierten Einzelstränge zwei kurze synthetische Oligonukleotide (*Primer*) hybridisieren. Die Primer sind zu der Rand-Sequenz beiderseits der zu vervielfältigenden Region komplementär. Die DNA-Sequenz des komplementären Bereichs bestimmt die Hybridisierungstemperatur wie folgt (Baldino et al., 1989):

$$T_{TM} = 4 \times (\text{Anzahl der G + C-Basenpaare}) + 2 \times (\text{Anzahl der A + T-Basenpaare})$$

Die hybridisierten Primer dienen der DNA-Polymerase als Startpunkt. Diese synthetisiert ausgehend von den 3'-OH-Enden beider Oligonukleotide einen neuen Doppelstrang. Hierbei werden die zuvor in den Reaktionsansatz gegebenen Desoxynukleotide komplementär zur Matrize eingebaut. Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem PCR-Thermocycler (Triblock von Biometra) durchgeführt:

Reaktionszyklus eines PCR-Programms:

1. Denaturieren 95°C 5 min
 2. Denaturieren 94°C 30 sec
 3. Hybridisieren ___°C 45 sec
 4. Elongation 72°C 1 min
 5. Elongation 72°C 10 min
 6. Ende 4°C ∞ min
- Schritte 2 – 4 mit 40 Zyklen

quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Über die reverse Transkription der mRNA kann das Transkriptom der Zellpopulation analysiert werden. Die Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Zellextrakt erfolgte mit Hilfe des RNeasy Kit (Qiagen, Hilden). Während der RNA-Aufreinigung über eine Säulenmatrix wurde die gesamte RNA mit der RQ1 RNase-freien DNase nach Herstellerangaben behandelt, um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern. Danach wurde je Probe 2 µg RNA mit iScript reverse Transcriptase (BioRad, München) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

Alle quantitativen RT-PCR-Ansätze wurden in einem Volumen von 25 µl in einem Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Hamburg) im Triplikat durchgeführt. Für jede Reaktion wurde 1:5 verdünnte cDNA, 0,13 µM je Primer, 200 µM von jedem dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 1:2.000.000 SYBR I Green, 10 µM Fluorescein und 0,5 U GoTaq Polymerase (Promega, Mannheim) verwendet.

Die qRT-PCR wurde mit folgendem PCR-Zyklus durchgeführt:

1. Denaturieren 95°C 2 min
 2. Denaturieren 95°C 30 sec
 3. Hybridisieren 60°C 30 sec
 4. Elongation 72°C 50 sec
 5. Elongation 72°C 10 min
 6. Ende 4°C ∞ min
- Schritte 2 – 4 mit 40 Zyklen

Die Spezifität der Primer wurde über die Analyse der Schmelzkurve und durch eine Analyse der PCR-Produkte in einer Gelelektrophorese überprüft. Die Quantifizierung erfolgt über die Fluoreszenz-Messungen, welche während eines jeden PCR-Zyklus erfasst wurde. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Nach 40 PCR-Zyklen und dem Ende des Programms wurde anhand von den erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen, das heißt der c_t -Wert

wurde bestimmt. Die c_t -Werte von *GAPDH* und *18S rRNA* dienten als Kontrolle, beziehungsweise die c_t -Werte der Zielgene wurden gegen die c_t -Werte der *housekeeping* Gene normiert. Alle verwendeten qRT-Primer sind in der nachfolgenden Tabelle gelistet.

Gene	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'	Ta
SOX1 ²	AGTATCTTCTGCTCCGGCTGT	TCCCTCCTCTGGACCAAACCT	60°C
SOX17 ²	AGCAGAATCCAGACCTGCAC	GTAAGTGTAGTTGGGGTGGTCCT	60°C
PAX6 ¹	CCAGGGCAATCGGTGGTAGT	ACGGGCACTCCCGCTTATAC	60°C
NANOG ¹	CCTGTGATTTGTGGGCCTG	GACAGTCTCCGTGTGAGGCAT	60°C
Pou5F ¹	GTGGAGGAAGCTGACAACAA	ATTCTCCAGGTTGCCTCTCA	60°C
REX ³	GCACACTAGGCAAACCCACC	CATTTGTTTCAGCTCAGCGATG	60°C
LEFTY1 ³	AATGTGTCATTGTTTACTTGTCTGTC	CAGGTCTTAGGTCCAGACTGGTG	60°C
total SOX2	GCCGAGTGGAAACTTTTGTCTG	GCAGCGTACTTATCCTTCTT	60°C
endo SOX2	GTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG	TCCTAGTCTTAAAGA	60°C
trans SOX2	GCGATTACAAGGACGACGAT	GGTCCGGGCTGTTTTTCT	60°C
CDX2 ¹	TCACTACAGTCGCTACATCACCATC	TTAACCTGCCTCTCAGAGAGCC	60°C
EOMES ¹	CGGCCTCTGTGGCTCAA	AAGGAAACATGCGCCTGC	60°C
HAND1 ¹	ACATCGCCTACCTGATGGAC	AGGAAAACCTTCGTGCTGCT	60°C
GATA-4 ³	CATCAAGACGGAGCCTGGCC	TGACTGTCCGCCAAGACCAG	60°C
GATA-6 ³	CCATGACTCCAACCTCCACC	ACGGAGGACGTGACTTCGGC	60°C
T/Brachyury ¹	CCTGGAGGAGAGCGAGCTG	CCTCCTGCCGTTCTTGGTC	60°C
Vimentin ¹	GGAGCTGCAGGAGCTGAATG	GACTTGCCTTGGCCCTTGAG	60°C
PHDLA2 ¹	GGCGCCTTAAGTTATTGGAC	TGCAATGGGCACAGTGATG	60°C
TBPG ³	CCCCACATTAGGGTTTTCT	GGACCCGATTCTCATTITTT	60°C
ID2 ¹	AATCCTGCAGCACGTCATCG	CTGGTGATGCAGGCTGACAA	60°C
GAPDH ²	TGACAACTTTGGTATCGTGGA	CCAGTAGAGGCAGGGATGAT	60°C
18S rRNA	TTCCTTGGACCGGCGCAAG	GCCGCATCGCCGGTCCG	60°C

2.2.1 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der PGK-GFP-Expressionskassette des pSico Vektors wurde eine FACS-basierte Selektion von lentiviral infizierten murinen ES Zellen durchgeführt. Dadurch konnten die GFP-positiven von den negativen ES-Zellen isoliert werden und die GFP⁺ Population angereichert werden. Durchflusszytometrische Selektion wurde mit einem FACSDiva Gerät (BD Biosciences) durchgeführt. Die Daten-Analyse erfolgte mit der CellQuest Acquisition Software (BD Biosciences).

2.2.2 Chemisch kompetente Bakterien

Herstellung kompetenter Bakterien nach Chung Miller et al (1988):

Bei der Herstellung kompetenter Zellen ist darauf zu achten, dass alle verwendeten Gefäße, Pipetten, Pufferlösungen und Zentrifugen eiskalt sind (0-4°C). Von einer DH5 α -Kolonie wurde eine 20 ml Übernachtskultur in LB-Medium angeimpft. Am Folgetag wurde eine Menge von 200 – 400 ml LB mit der Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 beimpft und unter kräftigem Schütteln (110 rpm) in einem Bakterienschüttler (New Brunswick Scientific, Nürtingen) bei 37°C bebrütet. Bei einer OD₆₀₀ von 0,40 – 0,45 wurde die Kultur auf Eis für fünf Minuten abgekühlt und in eisgekühlte 50 ml Falcons überführt. Die Zellen wurden für 8 min bei 4500 G und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in eiskaltem TSS von 1/10 Kulturvolumens unter Verwendung gekühlter Einmalpipetten vorsichtig resuspendiert.

Die resuspendierten *E. coli* Bakterien wurden als 100 –150 μ l Aliquots in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und im EtOH/Trockeneisbad schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80°C. Die so präparierten Zellen ergaben eine Transformationseffizienz von 5 x 10⁶ Kolonien/ μ g pUC 19 Kontrollplasmid (Novagen).

TSS-Puffer:

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

Transformation von E. coli nach der Methode von Chung & Miller

Die Bakterien wurden für ca. 20 min auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde ein Aliquot von 100 µl entnommen. Die zu transformierende DNA (≥ 100 ng) wurde in einem Volumen von 1 bis 5 µl zu den kompetenten Bakterien gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis stehen gelassen. Nach der Inkubation wurde 800 µl SOC-Medium hinzugegeben und für eine Stunde zur Expression des Resistenzplasmids auf einem Thermoschüttler (Eppendorf) bei 37°C geschüttelt (500 rpm). Dann wurde der Ansatz in einer Tischzentrifuge (3 min, 3000 rpm, Eppendorf 5415 R) pelletiert und 800 µl des Überstands abpipettiert. Im verbliebenen Medium wurden die Bakterien vorsichtig resuspendiert. Diese konnten entweder auf einer LB-Platte ausgestrichen werden oder zum Beimpfen eines Flüssigbakterienmediums verwendet werden, jeweils mit dem entsprechenden Zusatz an Antibiotikum.

SOC-Medium:	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	2 % Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose
	sterilfiltriert

Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford beruht auf dem Prinzip, dass die saure Coomassie Brilliant Blue Lösung ihr Absorptionsmaximum nach Bildung von Komplexen mit Proteinen von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Bei geeigneter Protein und Farbstoffkonzentration ist die Absorption zum Proteingehalt nahezu proportional. Dadurch konnte mit Hilfe bekannter BSA-Konzentration eine Äquilibrierungsfunktionskurve erstellt werden. Über diese Äquilibrierungsfunktionskurve und die Absorption der unbekanntes Proteinkonzentration bei 595 nm wurde die Konzentration bestimmt.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 25 µl der zu untersuchenden Probe mit 750 µl Bradfordreagenz vermischt. Als Nullwert dienten 25 µl des proteinfreien Mediums. Der Test wurde in 1 ml Einmalküvetten durchgeführt, wobei die Extinktion nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 595 nm bestimmt wurde. Die Probenmenge wurde durch Verdünnen so gewählt, dass die OD₅₉₅ zwischen 0,1 und 0,2 lag. Dadurch konnte der Wert mit der Steigung des linearen Bereichs der Äquilibrierungskurve multipliziert und die Konzentration der Lösung berechnet werden.

2.2.3 SDS-PAGE

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die aufzutrennenden Proteine zunächst mit einem Überschuss an SDS bei 95°C denaturiert und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken aufgelöst. Disulfidbrücken wurden mit β -Mercaptoethanol reduziert.

Das anionische Detergenz SDS lagert sich an die Polypeptidketten und maskiert die Eigenladung von Proteinen so effektiv, dass das Ladungs-Massen-Verhältnis der Proteine annähernd proportional ist (1,4 g SDS pro g Protein).

Die Proteinauftrennung erfolgte standardmäßig mit der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Diese hat den Vorteil, dass das Aggregieren von Proteinen beim Eintritt in das Gel verhindert wurde. Hierfür hat die Gelmatrix zwei Bereiche; das obere, weitporige Sammelgel, welches zur Konzentrierung der Proteine (durch Stapellauf der Proteine zwischen Leit- (Cl⁻) und Folgeion (Glycin)) dient und das untere, engporige Trenngel, welches die Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend auftrennt. Außerdem besitzen die beiden Gelphasen unterschiedliche pH Werte. Der unterschiedlichen Vernetzungsgrad des Polyacrylamids und die PH-Diskontinuität ermöglicht eine besonders scharfe Proteinauftrennung.

Die Methode wurde zum Abschätzen der Reinheit von Proteinpräparationen und zum Abschätzen des Expressionsverhaltens der rekombinanten Proteine verwendet.

2 x Probenpuffer:	6 % (w/v) SDS
	20 % (v/v) Glycerin
	Messerspitze Bromphenolblau
	6 % (w/v) β -Mercaptoethanol

Herstellung des SDS-Gels

Zur Herstellung von SDS-Gelen (30 % Bis-/Acrylamid-Lösung, Bio-Rad) und zu elektrophoretischen Auftrennung dieser wurde ein Komplett-Gelsystem (Mini-PROTEAN 3 System, Bio-Rad) verwendet. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und vor der Polymerisierung mit Isopropanol überschichtet, damit eine nivellierte Oberfläche entsteht. Dann wurde der Isopropanol entfernt und das Sammelgel über das Trenngel gegossen. Vor dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde ein Kamm eingesetzt. Das Gel wurde in eine Laufkammer eingespannt und mit 1 x Laemmli-Puffer überschichtet und anschließend wurden

die im Probenpuffer für 3 – 5 min bei 95°C denaturierten und abzentrifugierten Proteinproben in die Geltaschen geladen. Der Gellauf erfolgte bei 200 V für ca. 45 min.

Sammelgel: 3,05 ml H₂O
0,65 ml 30 % Bis-/Acrylamid-Lösung
25 µl APS
5 µl TEMED
1,25 ml Tris-Cl/SDS
pH 6.8

Trenngel: 3,15 ml H₂O
2,5 ml 30 % Bis-/Acrylamid-Lösung
30 µl APS
8 µl TEMED
1,9 ml Tris-Cl/SDS
pH 8.8

Coomassie-Blaufärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die aufgetrennten Proteine wurden direkt im Gel sichtbar gemacht. Hierfür wurde der GelCode Blue Stain Reagent (Pierce Biotechnology) verwendet. Der Vorteil dieser Lösung im Vergleich zu herkömmlicher Coomassie-Färbungen ist, dass sie gebrauchsfertig ohne Zusätze von Methanol und Essigsäure benutzt und in Wasser entfärbt werden kann. Zudem ist die Sensitivität höher und die Proteine können bereits während des Färbens (nach ca. 5 min) analysiert werden.

Das Gel wurde auf einem Schüttler dreimal für 5 min in Wasser gewaschen, bevor es für mindestens eine Stunde in der Färbelösung schüttelnd inkubiert wurde. Nach der Färbung wurde das Gel für mindestens eine Stunde in Wasser gewaschen und anschließend mittels des DryEase®-Systems (Invitrogen) getrocknet, um es lagerungsfähig zu machen. Das Gel und zwei Folien des DryEase®-Systems wurden für ca. eine Minute im Gel Drying Buffer inkubiert. Danach wurde das Gel zwischen den beiden Folien in einem Rahmen zum Trocknen über Nacht bei RT eingespannt.

Gel Drying Buffer: 20 % Methanol
2 % Glyceri

2.2.4 Western Blot

In Anlehnung an den Erfinder der Blotting-Technik Namens Southern, der 1970 die Methode vom DNA-Blotting unter dem Namen *Southern Blot* einführte, wurde das Protein-Blotting ironisierend *Western Blot* genannt. Die Technik des Western Blots geht auf Tombin und Renard 1979 zurück.

Western Blot (semi-dry)

Der Western Blot semi-dry wurde als Qualitätskontrolle bei der Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli* verwendet. Die Proteinproben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch das Semidry-Blotting-System auf eine Nitro-Cellulose-Membran (Bio-Rad) transferiert. Der Aufbau hierfür war wie folgt: zuunterst auf der Anode befanden sich vier in Western-Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere (Schleicher & Schüll), darauf lag die mit Transferpuffer befeuchtete NC-Membran, auf dieser wiederum das Gel, und schließlich noch einmal vier in Transferpuffer getränkte Filterpapiere. Es wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Schichten blasenfrei auflagen. Die Apparatur wurde mit sanften Druck auf den Stapel geschlossen und der Strom proportional zur Größe des Geles (1,5 mA/cm² Gel) eingeschaltet. Die Proteine wandern im Strom zur Anode hin und bleiben in der Membran hängen, um ein Durchblotten zu vermeiden, sollte der Transfer nicht länger als 10 – 25 min dauern.

Western-Transferpuffer (semi-dry) :	10 % (v/v) 10 x Laemmlipuffer 15 % (v/v) Methanol in H ₂ O
TBS:	150 mM NaCl 10 mM Tris-Cl pH 7.5
TBS-Tween:	150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20 20 mM Tris-Cl pH 7.5
TBS-Tween/Triton:	500 mM NaCl 0,01 % (v/v) Triton X-100 0,05 % (v/v) Tween 20 20 mM Tris-Cl pH 7.5

Western Blot (Wet-Blot)

Beim Wet-Blot findet eine vollständige Übertragung der Proteine auf die Membran statt, deswegen war diese Western Blot Variante das Mittel der Wahl um Proteine der Zellysate zu analysieren. Das Gel der SDS-PAGE wurde vor dem Aufbau des Blots 15 min in dem Western-Transfer-Puffer (*wet*) eingeweicht. Die Membran und 4 Lagen Whatmanpapier wurden ebenfalls kurz angefeuchtet. Der Blot wurde auf der Kathode in folgender Reihenfolge luftblasenfrei aufgebaut: ein dünner saugfähiger Schwamm, 2 Lagen Whatmanpapier, das Gel, die Membran, 2 Lagen Whatmanpapier und ein weiterer dünner saugfähiger Schwamm. Der Aufbau wurde mit dem Auflegen der Anode abgeschlossen und in eine bis zum Rand mit Western-Transfer-Puffer (*wet*) gefüllte Kammer überführt. Die elektrische Spannung von 100 Volt wurde für 1 h bei 4 °C angelegt.

10x Western-Transfer-Puffer (<i>wet</i>):	25 mM Tris 192 mM Glycin
1x Western-Transfer-Puffer (<i>wet</i>):	20% (v/v) Methanol 10% (v/v) 10x Western-Transfer-Puffer (<i>wet</i>) in H ₂ O

Immunodetektion der geblotteten Proteine

Unabhängig vom Transfer-Verfahren war die Vorgehensweise zur Identifikation eines bestimmten Proteins nach dem Übertragen der Proteine auf die Membran gleich. Alle Schritte wurden in einem 50 ml Falcon-Röhrchen, unter Rotation durchgeführt. Zuerst wurde die Membran 5 min in 10 ml TBS-T gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermindern wurde die Membran für 1 Stunde bei RT mit einer Blockierlösung inkubiert. Danach wurde die Membran 2-mal für 5 min mit 10 ml TBS-T gewaschen. Der primäre Antikörper wurde entsprechend seiner Verdünnung in 3 ml Detektionslösung verdünnt und über Nacht bei 4°C zur Membran in ein Falcon-Röhrchen gegeben. Nach der Inkubation mit dem Erstantkörper wurde der Blot 3-mal 5 min mit 10 ml TBS-T gewaschen. Der korrespondierende sekundäre Antikörper war gekoppelt mit einer Horse-Redish-Peroxidase (HRP) und wurde in 3 ml TBS-T verdünnt. Der Blot wurde für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Danach wurde der Blot 3 Mal 5 min mit TBS-T gewaschen. Der Anti-His-HRP Antikörper (Qiagen) wurde Herstellerangaben verwendet. Die Peroxidase-Aktivität des sekundären Antikörpers wurde durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Dazu wurde das SuperSignal West Pico Chemilumineszenz Substrat (Pierce) nach Angaben

des Herstellers verwendet. Bei schwachen Signalen wurde zur Signalverstärkung das SuperSignal West Femto Chemilumineszenz Substrat benutzt. Die Signale wurden mit der CCDKamera eines ChemiDoc XRS Systems (BioRad) eingefangen und vom Programm QuantityOne (Version 4.5.2; BioRad) als TIF-Dateien gespeichert.

Western-Blot Blockierlösung: 5% Milchpulver
in TBS-T

Western-Blot Detektionlösung: 0.5% TBS-T
in TBS-T

Regeneration von Membranen

Zur Analyse spezifischer Bindungseigenschaften unterschiedlicher Antikörper, ist es möglich den primären Antikörper zu entfernen. 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.

Regeneration-Puffer: 2 % (w/v) SDS
100 mM β -Mercaptoethanol
62,5 mM Tris-Cl
pH 6,7

2.3 Expression rekombinanter Proteine

Generell wurde für Bakterienkulturen zur besseren Belüftung Erlenmeyerkolben mit Schikanen und einem mindestens fünffach größeren Fassungsvermögen als das eingesetzte Volumen verwendet. Wenn nicht anders beschrieben wurden Bakterienkulturen in einem Bakterieneschüttler (New Brunswick Scientific, Nürtingen) bei 37°C inkubiert. Im Folgenden wird eine typische Proteinexpression beschrieben.

Von einer Glycerinkultur wurde in ca. 250 ml LB-Medium als Übernachtskultur angeimpft. Dem LB-Medium wurden 1 % (w/v) Glucose und die Antibiotika Carbenicillin (25 μ g/ml) und im Fall von TUNER BL21 (DE3) pLacI Stamm zusätzlich Chloramphenicol (34 μ g/ml) zugegeben. Am Folgetag wurde von der Übernachtskultur eine Expressionskultur im Verhältnis 1:25 im Fall von TAT-FLP, 1:50 im Fall von TAT-Cre oder 1:40 im Fall von TAT-Dre angeimpft. Das TB-Medium der Expressionskultur wurde mit 1 % Glucose und 100 μ g/ml Ampicillin versetzt. Für die Expression von TAT-Cre und TAT-Dre wurden die

Bakterien bis zu einer OD_{600} von 1,5 kultiviert und dann durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Für die Expression von TAT-FLP wurden die Bakterien bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 1,0 kultiviert, dann wurde die Inkubationstemperatur im Bakterieneschüttler auf 28°C abgesenkt und die Kultur weiter bis zu einer OD_{600} von 1,5 herangezogen. Die Absenkung der Temperatur bei einer OD_{600} von 1 gewährleistete, dass das Kulturmedium bis zur Induktion auf 28°C abgekühlt war. Bei einer OD_{600} von 1,5 wurde die Proteinexpression durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Nach einer Stunde wurden die Zellen in einer Ultrazentrifuge (Kendro, SS34 Rotor) bei 4000 rpm für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet konnte bei -20°C eingefroren und gelagert werden.

2.4 Präparation rekombinanter Proteine

2.4.1 Native Affinitätschromatographie von TAT-Cre

Die tiefgefrorenen Bakterienpellets wurden in 10 ml Phosphatpuffer (1x PTB) pro Liter Expressionskultur resuspendiert. Zu dieser homogenen Suspension wurde Lysozym (Sigma-Aldrich) mit einer finalen Konzentration von 1 mg/ml gegeben. Die Lösung wurde für 15 – 30 min bei RT auf einem Magnetrührer gerührt bis sie viskos wurde. Zur Viskositätssenkung wurde die Endonuklease Benzonase (Novagen) im Verhältnis 1:1000 (v/v) hinzugegeben und für 15 – 30 min bei RT gerührt. Der Ansatz wurde auf Eis gekühlt und sonifiziert (1,5 min mit einem Zyklus von 5 Sekunden bei 45 % Leistung). Danach wurde ein gleiches Volumen an TSB (*tataric salt buffer*) hinzugegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Der Puffer verhindert, dass das HTNC später im Glycerinstock präzipitiert. Nach der Zugabe von TSB wurde das Zelllysate in einer Ultrazentrifuge (SS34 Rotor, Kendro) für 30 min mit 16.000 rpm bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig in 50 ml Falcons überführt und mit 2 ml einer Nickel-Agarose-Matrix (Ni-NTA, Qiagen) pro Liter Expressionskultur versetzt und für eine Stunde bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Präparation im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Nach der Inkubation mit Ni-NTA wurde die Suspension auf eine 20 ml Säule (Biorad) gegeben, deren Fritte die Nickel-Agarose-Matrix zurückhält. Es folgten zwei Waschstreps mit Cre-Waschpuffer in einem fünffachen Volumen des Säulenbetts. Eluiert wurde das TAT-Cre mit Cre-Elutionspuffer in einem zwei- bis dreifachen Volumen des Säulenbetts. Kam es aufgrund ungelöster Proteine zur Trübung des Eluats wurde bis zur Klärung weiterer Cre-Elutionspuffer hinzugegeben. Das Eluat wurde bis zur Dialyse auf Eis gelagert (Münst et al., 2009).

10 x PTB (Phosphatpuffer):
 500 mM Na₂HPO₄
 50 mM Tris
 pH 7.8

Cre-Waschpuffer:
 500 mM NaCl
 1 x PTB
 10 mM Imidazol

TSB (Tartrat-Salz-Puffer):
 2 M KNaC₄H₄O₆
 1 x PTB
 20 mM Imidazol

Cre-Elutionspuffer :
 750 mM NaCl
 1 x PTB
 250 mM Imidazol

2.4.2 Native Affinitätschromatographie von TAT-Dre

Zur Zellyse der Bakterien wurden 20 ml Dre-Lysepuffer pro Liter Expressionskultur verwendet. Die nachfolgenden Schritte zum Aufschluss der Bakterien stimmten mit denen der TAT-Cre Aufreinigung überein. Allerdings wurde der Bakteriensuspension kein TSB-Puffer zugeführt und sie wurde auch nicht sonifiziert. Das Zellysat wurde in einer Ultrazentrifuge (SS34 Rotor, Kendro) für 30 min bei 13.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 1,5 ml Ni-NTA pro Liter Expressionskultur versetzt. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine 20 ml Säule (Biorad) gegeben. Es folgten zwei Waschstritte mit Dre-Waschpuffer in einem sechsfachen Volumen des Säulenbetts. Eluiert wurde das TAT-Dre mit Dre-Elutionspuffer in einem sechsfachen Volumen des Säulenbetts. Das Eluat wurde bis zur Dialyse bei 4°C gelagert.

Dre-Lysepuffer:
 1x PTB
 500 mM NaCl
 5 mM Imidazol

Dre-Waschpuffer:
 1x PTB
 500 mM NaCl
 10 mM Imidazol

Dre-Elutionspuffer:
 1x PTB
 500 mM NaCl
 250 mM Imidazol

2.4.3 Native Affinitätschromatographie von TAT-FLP

Die tiefgefrorenen Bakterienpellets wurden in 10 ml FLP-Lysepuffer pro Liter Expressionskultur resuspendiert. Zu dieser homogenen Suspension wurde Lysozym (Sigma-Aldrich) mit einer finalen Konzentration von 1 mg/ml gegeben. Die Lösung wurde für 15 – 30 min bei RT auf einem Magnetrührer gerührt. Die Lösung wurde stark viskos, so dass sie einer

Gallerte glich. Die Rührgeschwindigkeit wurde so gewählt, dass Schaumbildung vermieden wurde. Zur Viskositätssenkung wurde die Endonuklease Benzonase (Novagen) im Verhältnis 1:600 (v/v) zugegeben und für 15 – 30 min bei RT gerührt. Der Ansatz wurde mit dem gleichen Volumen NaCl-Puffer vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte das Sonifizieren, der auf Eis gekühlten Probe, für 2 min mit einem Zyklus von 5 Sekunden bei 50 % Leistung (Bandelin Electronic). Danach wurde das Zelllysate in einer Ultrazentrifuge (SS34 Rotor, Kendro) für 30 min mit 16.000 rpm bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig in 50 ml Falcons überführt und mit 1 ml Ni-NTA pro 10 ml Liter Expressionskultur versetzt. Nach der Zugabe von Ni-NTA wurde die Probe für eine Stunde bei 4°C auf einem Überkopfschüttler vorsichtig geschwenkt. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Präparation im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Nach der Inkubation wurde die Suspension auf eine 20 ml Säule (Biorad) gegeben. Es folgten zwei Waschschrte mit FLP-Waschpuffer im vierfachen Volumen des Säulenbetts. Das Säulenbett entspricht der Hälfte des verwendeten Volumens an Ni-NTA. Eluiert wurde das rekombinante FLP-Protein mit FLP-Elutionspuffer in einem vierfachen Volumen des Säulenbetts. Kam es zur Trübung des Eluats, wurde bis zur Klärung weiterer FLP-Elutionspuffer hinzugegeben. Das Eluat wurde bis zur Dialyse auf 4°C gelagert.

FLP-Lysepuffer (10 x PTB):

500 mM Na₂HPO₄
50 mM Tris
pH 7.8

NaCl- Puffer:

2 M NaCl
1 x PTB
1 x PTB

FLP-Waschpuffer:

500 mM NaCl
1 x PTB
10 m Imidazol

FLP-Elutionspuffer:

750 mM NaCl
1 x PTB
250 mM Imidazol

2.4.4 Überführung von TAT-Cre in einen Glycerinpuffer

Zum Pufferaustausch wurden die Proteine bei 4°C im Kühlraum dialysiert. Alle verwendeten Glasgeräte sowie Medien wurden vorgekühlt. Es wurde ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 5 kDa (Roth, Karlsruhe) auf die erforderliche Größe zurechtgeschnitten und kurz mit MPW und dann mit Dialysemedium durchgespült. Das zu Eluat des rekombinanten Proteins wurde in den Dialyseschlauch gefüllt und dieser in ein Becherglas mit Dialysemedium gegeben. Dialysiert wurde meist gegen einen 50 – 100-fachen Überschuss

an Dialysemedium. Dabei wurde zweimal nach mindestens einer Stunde das Medium gewechselt und der letzte Dialyseschritt wurde über Nacht durchgeführt. Zur Beschleunigung der Diffusionsvorgänge wurde das Dialysemedium mit einem Magnetrührer gemischt.

Der Elutionspuffer von TAT-Cre wurde zunächst für 5 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R), um den Elutionspuffer von Präzipitaten zu befreien. Anschließend wurde dieser gegen Hochsalzpuffer dialysiert. Nach einer Stunde wurde der Hochsalzpuffer erneuert und über Nacht dialysiert. Im Hochsalzpuffer war das TAT-Cre bis zu einer Konzentration von 4 mg/ml löslich. Das Dialysat des Hochsalzpuffers wurde zweimal gegen einen 50 %igen Cre-Glycerinpuffer dialysiert. Der erste Dialyseschritt wurde für einige Stunden und der zweite Dialyseschritt über Nacht ausgeführt. Die Dialyse gegen den Cre-Glycerinpuffer verringerte das Volumen und konzentrierte dabei das TAT-Cre um das Dreifache auf. Der Glycerinstock wurde bei -20°C gelagert und konnte für einen Transduktionsversuch direkt ins erforderliche Medium verdünnt werden.

Hochsalzpuffer:
1 M NaCl
20 mM HEPES
pH 7,4

Cre-Glycerinpuffer:
750 mM NaCl
50 % (v/v) Glycerin
20 mM HEPE
pH 7,4

2.4.5 Überführung von TAT-Dre in einen Glycerinpuffer und Aufkonzentration

Das Eluat von TAT-Dre wurde vor dem Transfer in den Dialyseschlauch für 5 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Der erste Dialyseschritt erfolgte für mindestens eine Stunde gegen das hundertfache Volumen an DCB-Puffer. Danach wurde ein zweites Mal diesmal über Nacht gegen DCB-Puffer dialysiert. Am Folgetag wurde das Dialysat in 15 ml Konzentratoren (10.000 MWCO, Vivascience) überführt. Diese 'Zentrikons' haben eine Membran, welche Moleküle bis zu einer Größe von 10 kDa passieren lässt. Durch Zentrifugation mit 3500 rpm bei 4°C (Heraeus Megafuge 1.0R) wurde die Ultrafiltration des Puffers beschleunigt. Das Volumen wurde um die Hälfte verringert. Durch die Volumenreduktion konnte die Konzentration TAT-Dre um den Faktor 1,8 erhöht werden (~160 µM). Die Stocklösung wurde im Falcon-Röhrchen bei -20°C gelagert.

Dre-Concentration-Buffer (DCB):

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

2.4.6 Überführung von TAT-FLP in einen Glycerinpuffer und Aufkonzentration

Bevor der Elutionspuffer des rekombinanten FLP-Proteins in den Dialyseschlauch überführt werden konnte, wurde dieser zunächst für 5 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Der Zentrifugationsschritt dient dem Abtrennen von unlöslichen Bestandteilen, die während der Dialyse als Kristallisationskeime wirken und eine vermehrte Bildung von Präzipitaten verursachen könnten. Der erste Dialyseschritt erfolgte gegen das hundertfache Volumen an FCB-Puffer für mindestens eine Stunde. Es wurde ein zweites Mal gegen das hundertfache Volumen an FCB-Puffer dialysiert, diesmal über Nacht.

Am Folgetag wurde das Dialysat in 15 ml Konzentratoren (10.000 MWCO, Vivascience) überführt. Diese 'Zentrikons' besitzen eine leicht schrägverlaufende, longitudinale Membran, welche Moleküle bis zu einer Größe von 10 kDa passieren lässt. Durch Zentrifugation mit 3500 rpm bei 4°C (Heraeus Megafuge 1.0R) wurde die Ultrafiltration des Puffers beschleunigt. Das Volumen wurde auf ein fünftel eingengt und dadurch die Konzentration TAT-FLP um den Faktor fünf erhöht (~ 100 µM). Die Stocklösung wurde sterilfiltriert (0,22 µm), in Kryoröhrchen allquotiert und bei -80°C eingefroren.

FCB (Flp concentration buffer):

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

2.5 Zellkultur

Generell fand die Arbeit der Zellkultur unter sterilen Bedingungen statt. Es wurde unter einer Sterilbank gearbeitet und nur sterile Medien, Plastik- und Glasware verwendet. Alle Zelllinien wurden in Inkubatoren bei 37°C und einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert.

Bestimmung der Zellzahl

Vor dem Zentrifugationsschritt (s.o.) der Zellpassage wurde ein Aliquot der homogenen Zellsuspension abgenommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung (Gibco) vermischt. Hiervon wurden 15 µl in eine Neubauer-Zählkammer überführt und ausgezählt. Nur vitale nicht angefärbte Zellen werden gezählt. Blaue Zellen haben keine funktionale Zellmembran mehr und werden nicht mitgezählt. Die Zellzahl auf 16 kleinen Quadraten multipliziert mit 10.000 ergibt die Zellzahl pro ml.

Einfrieren von Säugetierzellen

Nach dem ablösen der Säugetierzellen von den Zellkulturschalen wurden die Zellen in pelletiert und in und das Pellet wurde in Einfriermedium resuspendiert. Es wurden 1-2,5x 10⁶ Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden in Styroporboxen über Nacht bei -80°C inkubiert. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Auftauen und Langzeitlagerung Säugetierzellen

Die Langzeitlagerung Säugetierzellen erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt. Sobald der Inhalt aufgetaut war, wurde dieser zu 6 ml Wachstumsmedium in ein Falcon überführt, um das DMSO enthaltende Einfriermedium zu verdünnen. Die Zellen wurden durch einen Zentrifugationsschritt von 1000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) für 3 min bei 4°C im Falcon pelletiert. Das Pellet wurde in frischem Medium aufgenommen und auf eine Schale ausgesät.

Induktion von Apoptose

Camptothecin ist ein zelltoxisches Chinolinalkaloid, das als irreversibler Inhibitor an die Topoisomerase I bindet und dadurch DNA-Strangbrüche verursacht. Dies führt zum programmierten Zelltod (Apoptose). Zur Induktion von Apoptose in murinen ES-Zellen wurden die Zellen mit 4-8 µM Camptothecin (Sigma-Aldrich) für 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die so behandelten Zellen dienten als positive Kontrolle bei den Immunfärbungen mit dem α-Caspase-3-Antikörper.

2.5.1 Fibroblasten

NIH 3T3, CV1, HEK 293FT Fibroblasten und embryonale Fibroblasten (MEFs) wurden in DMEM (4500 mg/l Glucose) mit 10% FCS, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, Natrium

Pyruvat und 2 mM L-Glutamins kultiviert. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie im Verhältnis 1:7 passagiert. Die adhärenen Zellen wurden mit 0,25% Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst. In der Regel war dies alle 3-4 Tage der Fall. Jeden zweiten Tag bekamen die Zellen neues Wachstumsmedium.

Mitotische Inaktivierung der MEFs durch γ -Bestrahlung

Zur γ -Bestrahlung wurden $1-2 \times 10^8$ murine embryonale Fibroblasten nach dem Abtrypsinieren in 35 ml MEF-Medium aufgenommen und in eine T125-Zellkulturflasche überführt. Die γ -Bestrahlung fand in der Funktionseinheit Strahlentherapie der Radiologischen Universitätsklinik Bonn statt. Sie erfolgte an einem medizinischen Linearbeschleuniger (MEVATRON MD2, Siemens, München) mit 6MV Photonen im Dosismaximum (17 mm) oder alternativ in einem gewebeäquivalenten Festkörperphantom (RW3, PTW Freiburg) bei einem Fokus-Haut-Abstand von 100cm. Die Fibroblasten wurden mit 15Gy Einzeldosis bestrahlt.

Konditioniertes Medium

Zur Gewinnung von konditioniertem Medium wurden 1×10^6 mitotisch inaktivierte MEFs in eine 15 cm Zellkulturschale ausgesät. Nach einem Tag wurden die MEFs mit 50 ml HES-Zellmedium ergänzt mit 4ng/ml FGF-2 überschichtet. Nach 24 h Inkubation im erfolgte die Abnahme und Filtration des Mediumüberstands. Diese wurde insgesamt 5-mal wiederholt. Die Lagerung von konditioniertem fand bei -20°C statt. Vor Gebrauch erfolgte eine erneute Zugabe von 4ng/ml FGF-2.

2.5.2 Embryonale Stammzellen der Maus

R1 und Black6 ES-Zellen

R1 (Rosa-rox-LacZ) und Black6 (Bruce4-FC-LacZ) ES-Zellen der Maus wurden standardmäßig in MES-Medium und in Kokultur mit *Feeder* Zellen kultiviert. Das Kulturmedium der murinen ES-Zellen wurde täglich erneuert. Alle drei bis vier Tage wurden die ES-Zellen mit 0,25% Trypsin/EDTA abgelöst und $5-7 \times 10^4$ ES-Zellen auf eine neue Schale passagiert.

E14 ES-Zellen

E14 ES-Zellen wurden in N2B27-Medium (Ying et al. 2003) kultiviert. Das N2B27-Medium ermöglicht die Kultivierung/ Pluripotenzhaltung von murinen ES-Zellen unter definierten Bedingungen ohne die Kokultur von *Feeder* Zellen. Die murinen ES-Zellen wurden routinemäßig auf Gelatine-beschichteten 6 cm Zellschalen kultiviert. Alle 4-5 Tage wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin/EDTA abgelöst und $5-7 \times 10^4$ ES-Zellen auf eine neue Schale passagiert. Ein Mediumwechsel wurde jeden Tag durchgeführt.

2.5.2.1 Spontane Differenzierung muriner ES-Zellen

Die spontane Differenzierung muriner ES-Zellen wurde über die Formierung von *embryoid bodies* (EBs) eingeleitet. Murine ES-Zellen wurden für 4-5 Tage auf einer Gelatine-beschichteten 6 cm Schalen kultiviert, bevor sie mit Trypsin abgelöst wurden. Die ES-Zellen wurden für 1-3 min mit Trypsin bei Raumtemperatur inkubiert, in MES-Differenzierungsmedium aufgenommen ohne die ES-Zellkolonien zu zerkleinern. Die Zellaggregate wurden auf eine 10 cm Petrischale überführt. Nach 5-6 Tagen und einem Mediumwechsel jeden zweiten Tag wurden die EBs auf 5 mit Gelatine-beschichteten 3,5 cm Schalen überführt. Es wurde jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt bis die Zellen für eine Immunfluoreszenz-Analyse verwendet wurden. Für eine reproduzierbare und standardisierte EB-Größe wurden *hanging drops* ,wie in Kapitel 2.5.3.1 beschrieben, gemacht.

MES-Differenzierungsmedium:

N2B27-Medium \emptyset LIF und \emptyset BMB4

2.5.3 Embryonale Stammzellen des Menschen

Das Kulturmedium der humanen ES-Zellen wurde täglich erneuert. Routinemäßig wurden die humanen ES-Zellen in Vertiefungen einer 6-Lochplatten kultiviert und alle 3 bis 4 Tage passagiert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen wurden für 45 Minuten mit 1 mg/ml Kollagenase IV (1 ml pro Well) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kollagenase mit 1 ml HES-Zellmedium pro Well verdünnt und die Kolonien wurden von der Zellkulturplatte abgespült. Die Zellsuspension wurde für 3 Minuten bei

800 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml HES-Zellmedium aufgenommen. Die ES-Zellkolonien wurden mit einer 1000 µl-Eppendorfpipette resuspendiert und zu kleinen Aggregaten von 50-100 Zellen zerkleinert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 bis 1:6 in hES Zellmedium auf mitotisch inaktivierte Fibroblasten ausplattiert.

Einzelzellsuspension von humanen ES-Zellen

Für die Durchführung mancher Experimente war es notwendig, dass die humanen ES-Zellen nicht als Zellhaufen, sondern als Einzelzellen ausgesät wurden. Zunächst wurden die humanen ES-Zellen mit 10 µM ROCK-Inhibitor präinkubiert. Nach einer Stunde wurde das Medium abgenommen und mit 500 µl Alfazyme (PAA) pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ersetzt. Die Inkubationszeit von Alfazyme bei 37°C beträgt 10-20 min. Die humanen ES-Zellen lösen sich von der Mitte einer Kolonie her als Einzelzellen ab. *Feeder* Zellen und undifferenzierte ES-Zellen sind resistenter gegenüber Alfazyme und lösen sich erst nach einer verlängerten Inkubation ab. Die Enzymatische Reaktion wurde mit 500 µl HES-Medium abgestoppt, in ein Falcon-Röhrchen überführt, die Vertiefungen wurden mit weiteren 2 ml HES-Medium abgespült und ins Falcon überführt. Das Falcon mit den vereinigten Fraktionen wurde für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden der Überstand abgenommen, die Zellen in frischem HES-Zellmedium mit resuspendiert und in der benötigten Dichte in Anwesenheit von 10 µM ROCK-Inhibitor ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium gegen HES-Medium ohne ROCK-Inhibitor ersetzt.

2.5.3.1 Spontane Differenzierung von humanen ES-Zellen

Die spontane Differenzierung von humanen ES-Zellen wurde über die Ausbildung von *embryoid bodies* (EBs) eingeleitet. Humane ES-Zellen wurden für 4-5 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Die ES-Zellkolonien von 4-6 Vertiefungen einer 6-Lochplatte wurden wie für eine normale Zellpassage für 45-60 min mit 1 mg/ml Kollagenase inkubiert. Die abgelösten Kolonien wurden pelletiert (800 rpm, 3 min und 4°C, in HES-Differenzierungsmedium aufgenommen und auf eine 10 cm Petrischale überführt. Am nächsten Morgen wurde die Suspension mit den EBs auf eine neue Petrischale transferiert. Jeden zweiten Tag wurde das alte Differenzierungsmedium gegen neues ersetzt. Nach 5 Tagen wurden die Zellaggregate einer 10 cm Petrischale auf fünf mit PO/Laminin beschichtete 3,5 cm Zellkulturschalen ausgesät. Auf diesen Zellkulturschalen verblieben die

Zellen bis zur Immunfluoreszenz-Analyse. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gegen frisches HES-Differenzierungsmedium ersetzt. Um EBs in einer reproduzierbaren und uniformen Größe herzustellen wurden *hanging drops* generiert oder ein AggreWell™ 400 (StemCell Technology, Düsseldorf) nach Herstellerangaben verwendet.

Für die Herstellung von *hanging drops* mussten die humanen ES-Zellen zu erst enzymatisch mit Alfasyme (PAA) vereinzelt werden. Die Zellen wurden nach dem Zentrifugieren (1000 rpm, 5 min, 4°C) in HES-Differenzierungsmedium aufgenommen. Die Zelldichte der Einzelzellsuspension wurde auf 40000 Zellen pro ml eingestellt. Auf den Deckel einer 10 cm Schale wurden 50-70 Tropfen mit jeweils 1000 ES-Zellen pipetiert, der Deckel wurde auf die Schale gesetzt und die Zelle für 2 Tage in diesen *hanging drops* kultiviert, bevor sie am dritten Tag in eine 10 cm Petrischale gespült wurden.

HES-Differenzierungsmedium:

hES-Medium Ø bFGF

2.5.3.2 Neurale Konversion von adhärennten humanen ES-Zellen

Die Publikation von Chambers et al. (2009) beschreibt erstmalig ein Protokoll für die Konversion von adhärennten humanen ES-Zellen in neurale Vorläuferzellen durch die gezielte Inhibition des TGF- β /SMAD Signalwegs. In der Studie wurde für die kombinierte Blockade des SMAD Signalweges der BMP (*bone morphogene protein*)-Inhibitor Noggin (Smith und Harland, 1992) und das Pharmakon SB431542 (Smith et al. 2008) als Inhibitor des Activin/Nodal-Signaltransduktionsweges verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde das Protokoll modifiziert. Zum einen wurde das Noggin Protein durch das Pharmakon Dorsomorphin (Yu et. al, 2008) ersetzt und zum anderen wurde zusätzlich das Pharmakon SU5402 (Xu et al., 2008) als Inhibitor des FGF-Signaltransduktionsweges verwendet. Das Protokoll wurde in drei Varianten durchgeführt (Tab.: 2.1). Einmal unter den Bedingungen des original Protokolls, lediglich mit der Modifikation, dass Dorsomorphin (Yu et al., 2008) statt des Noggins eingesetzt wurde. Eine Dorsomorphin Konzentration von 10 μ M hat denselben Effekt wie 500 ng/ml Noggin (persönliche Kommunikation mit S. Chambers). In der zweiten Variante wurde ab dem vierten Tag kein FGF-2 mehr hinzu gegeben. In der dritten Variante wurde zusätzlich zum FGF2-Entzug der FGF-Signaltransduktionsweg durch die Applikation von SU5402 inhibiert.

Tag	Chambers et al.	- bFGF-2	- bFGF + SU5402
1	Expansion	Expansion	Expansion
2	Expansion	Expansion	Expansion
3	Expansion	Expansion	Expansion
4	hES-Diff.-Medium - + FGF-2, + SB432542 + Dorsomorphin	hES-Diff.-Medium - - + SB432542 + Dorsomorphin	hES-Diff.-Medium + SU5402 - + SB432542 + Dorsomorphin
5	wie an Tag 4	wie an Tag 4	wie an Tag 4
6	wie an Tag 4	wie an Tag 4	wie an Tag 4
7	wie an Tag 4	wie an Tag 4	wie an Tag 4
8	wie an Tag 4	wie an Tag 4	wie an Tag 4
9	wie an Tag 4	wie an Tag 4	wie an Tag 4
10	25% N2 –Medium - + bFGF-2 + Dorsomorphin	25% N2 –Medium - - + Dorsomorphin	25% N2-Medium + SU5402 - + Dorsomorphin
11	wie an Tag 10	wie an Tag 10	wie an Tag 10
12	50% N2 media - + bFGF-2 + Dorsomorphin	50% N2 media - - + Dorsomorphin	50% N2 media + SU5402 - + Dorsomorphin
13	wie an Tag 12	wie an Tag 12	wie an Tag 12
14	75% N2 media - + bFGF-2 + Dorsomorphin	75% N2 media - - + Dorsomorphin	75% N2 media + SU5402 - + Dorsomorphin
15	wie an Tag 14	wie an Tag 14	wie an Tag 14

Tabelle 2.1: Chronologischer Ablauf und Zusammensetzung der Medien für die neurale Konversion von humanen ES-Zellen modifiziert nach Chambers et al. (2009).

Der chronologische Ablauf des Protokolls sah vor, dass humane ES-Zellen mit 10 μ M ROCK-Inhibitor präinkubiert wurden, bevor sie mit Alfasyme (PAA) enzymatisch dissoziiert wurden. $2,4 \times 10^5$ vereinzelte ES-Zellen wurden pro Vertiefung einer mit Matrigel beschichteten 6-Lochplatte in Expansions-Medium ergänzt mit ROCK-Inhibitor ausgesät. Am

darauf folgenden Tag wurde der ROCK-Inhibitor dem Expansions-Medium nicht mehr beigemischt. Die Zellen wurden für drei Tage in Expansions-Medium expandiert bis sie nahezu konfluent waren. An Tag 4 wurden das Expansionsmedium durch HES-Differenzierungsmedium mit der entsprechenden Kombination von Inhibitoren und FGF-2 ersetzt. Ein Medium Wechsel fand täglich statt. Ab Tag 10 änderte sich Basisrezeptor des Mediums, die Inhibitoren und Faktor Kombinationen der Einzelnen Protokollvarianten blieb bestehen. Das HES-Differenzierungsmedium wurde schrittweise durch N2-Medium ersetzt. Nach wie vor wurde jeden Tag das Medium gewechselt. Allerdings wurde jeden zweiten Tag die finale Konzentration von N2-Medium um 25% erhöht, (Tab.: 2.1).

Expansions-Medium:

konditioniertes Medium
10 ng/ml bFGF

HES-Differenzierungsmedium:

hES-Medium ohne bFGF

finale Konzentrationen der Inhibitoren und des Faktors FGF-2:

[10 µM] Dorsomorphin
[10 ng/ml] FGF-2

[10 µM] SB432542
[10 µM] SU4502

2.5.4 DNA-Transfektion

2.5.4.1 Transiente Transfektion (Lipofektion)

Fibroblasten

Die transiente Transfektion wurde als Lipofektion unter Verwendung von Lipofectamine 2000 (Invitrogen) beziehungsweise Fugen HD (Roche) durchgeführt. Am Vortag wurden Fibroblasten in einer entsprechenden Dichte ausgesät, so dass am Folgetag die Zellen zu 80-90% konfluent waren. Für den Transfektionsansatz wurde Plasmid-DNA mit einer photometrisch bestimmten Reinheit von $OD_{260}/D_{280} > 1.8$ eingesetzt. Die Menge des verwendeten Lipofektionsreagenz und DNA richteten sich nach Herstellerangaben. Ein 10-20minütiger Inkubationsschritt zur Ausbildung des Komplexes zwischen kationischer Lipiden und anionischer DNA war bei allen verwendeten Lipofektionsreagenzien notwendig. Das Transfektionsgemisch wurde zum Wachstumsmedium der Fibroblasten hinzu gegeben. Nach einer Inkubation über Nacht wurde der Transfektionsansatz abgenommen und durch

MEF-Medium ersetzt. Im Falle einer anschließenden X-Gal-Färbung wurden die Zellen 72 Stunden nach Transfektion fixiert und gefärbt.

murine ES-Zellen

Für eine transiente Transfektion wurden murine ES-Zellen mit Trypsin vereinzelt und 1-4 Stunden vor der Zugabe des Transfektionsansatzes auf mitotisch inaktivierten *Feedern* oder Gelatine-beschichteten Schalen ausgesät. Alle anderen Schritte wurden analog zu der transienten Transfektion von Fibroblasten ausgeführt.

2.5.4.2 Stabile Transfektion (Elektroporation)

Fibroblasten

Zur stabilen Transfektion von Zellen wurden 30-40 µg linearisierte, Phenol-Chloroform gereinigte und in 50-100 µl sterilem Wasser resuspendierte DNA verwendet. 1×10^7 Fibroblasten wurden nach dem Ablösen und dem Vereinzeln mit Trypsin in 900 µl PBS resuspendiert, in eine 4mm Elektroporationsküvette (PeqLab) überführt, mit der DNA-Lösung vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Küvette in eine Elektroporationskammer eingesetzt und mit einem Strompuls von 230 V (Volt) und 500 µF (µFarad) für 9-13 ms ausgesetzt. Nach der Elektroporation wurden die Fibroblasten auf eine 15 cm Zellkulturschale in MEF-Medium ausgesät. 48 Stunden nach Elektroporation der Zellen wurde die Selektion auf Neomycinresistenz mit 300 µg/ml G418 gestartet. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die ohne DNA dem Strompuls ausgesetzt worden waren. Die Selektion galt als abgeschlossen sobald alle Zellen der Kontrollplatte durch die Applikation von G418 abgestorben waren. Ab diesem Zeitpunkt konnten für eine klonale Analyse einzelne Zellhaufen manuell herausgelöst werden oder aber der Ansatz wurde als polyklonale Zellpopulation weiter kultiviert.

murine ES-Zellen

Die Elektroporation wurden unter den gleichen Bedingungen wie für Fibroblasten durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die ES-Zellen auf 3 mit Gelatine-beschichtete 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Mit der Selektion von G418 wurde nach 24-36 Stunden begonnen.

humane ES-Zellen

Humanen ES-Zellen wurden 1 Stunde mit 10 μM ROCK-Inhibitor präinkubiert bevor sie mit Kollagenase abgelöst wurden. Die humanen ES-Kolonien wurden nicht manuell zerkleinert wie es beim Passagieren der Fall wäre, sondern als große intakte ES-Kolonien in HES-Medium mit 10 μM ROCK-Inhibitor auf Gelatine-beschichtete Schalen ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Stunden hatten sich verschleppte *Feeder* Zellen abgesetzt. Die humanen ES-Kolonien befanden sich noch in Suspension. Sie wurden in ein Falcon überführt, pelletiert, PBS gewaschen und anschließend im Falcon bei 37°C im Wasserbad mit 0,25% Trypsin/EDTA inkubiert. Nach 5 min wurde die proteolytische Reaktion durch die Zugabe von HES-Medium abgestoppt und die Zellsuspension durch auf- und abpipettieren homogenisiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und in PBS aufgenommen. Es wurden $3,5 \times 10^7$ humane ES-Zellen für die Elektroporation verwendet. Nachdem Vermischen der DNA-Lösung mit den Zellen, wurden die Elektroporationsküvette in die Elektroporationskammer eingesetzt und einem Strompuls von 250 V und 500 μF für 9-13 ms ausgesetzt. Hiernach wurden die Zellen in 5 ml vorgewärmtes HES-Medium überführt und bei 1500 rpm für 3 min zentrifugiert um die Zellen von Zelltrümmern abzutrennen. Erst danach wurden die Zellen erneut in frisches HES-Medium mit 10 μM ROCK-Inhibitor resuspendiert und auf zwei 6-Lochplatten mit *Feeder* Zellen ausgesät. Selektioniert wurden die humanen ES-Zellen mit 200 $\mu\text{g/ml}$ G418. Mit der Selektion wurde 36 Stunden nach dem Aussäen begonnen.

2.5.4.3 Virale Transduktion

Produktion rekombinanter Lentiviren

10 cm Schalen wurden für 30 min mit Poly-D-Lysin bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen der Schale mit PBS wurden 4×10^6 HEK 293FT ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte über Nacht im Inkubator bei 37°C. Zur Transfektion der Virus-Plasmide am darauf folgenden Tag sollten die Zellen zu 70-80% konfluent sein. 1 Stunde vor der Transfektion wurde das MEF-Medium gegen T-Medium ausgetauscht. Der Transfektions-Mix (lentiviraler Vektor, psPAX2, pMD2.G und CaCl_2) wurde in ein steriles Röhrchen pipettiert (CaCl_2 wurde als letztes zugegeben) und gemischt. Anschließend wurde die gleiche Menge 2x BBS tropfenweise zugegeben und durch 5maliges invertieren des Röhrchens gemischt. Nach 15minütiger Inkubation bei RT wurde der Mix auf die Platten tropfenweise verteilt und mit

dem Medium vermischt. Spätestens zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellkulturschalen in den S2-Bereich transferiert. Nach 5-6 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Calciumphosphattransfektion beendet, indem das plasmidhaltige Medium entfernt und frisches MEF-Medium hinzugegeben wurde. Am darauf folgenden Morgen wurde das MEF-Medium abgenommen und P-Medium zu den Zellen gegeben. Ungefähr 30 Stunden Später wurde das virushaltige Medium am nächsten Tag für die 1. Ernte abgenommen und durch frisches P-Medium ersetzt. Das Medium der 1. Ernte wurde zur Abtrennung von Zellen und Zelltrümmer mit einem Tensid freien Cellulose-Acetat Filter (SFCA, 0,45µm) filtriert (Nalgene). Die Zellen wurden mit frischem P-Medium versetzt und bis zur 2. Ernte wieder bei 37°C inkubiert. Das Filtrat wurde in Zentrifugenröhrchen (Beckman&Coulter) in einer Ultrazentrifuge Discovery 90SE (Rotor Saespin 630) bei 4°C und 19200 rpm für 90 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Viruspellet in 500 µl Wachstumsmedium der Zielzellen aufgenommen. Das Viruskonzentrat wurde in Cryovials (Nalgene) bei -80°C gelagert.

T-Medium:	Advanced D-MEM (Gibco) 2% FCS 1% nicht-essentielle Aminosäuren 1% Penicillin/ Streptomycin 25 µM Chloroquine
P-Medium:	Advanced D-MEM (Gibco) 5% FCS 1% nicht-essentielle Aminosäuren 1% Penicillin/ Streptomycin
Transfektionsansatz:	250 µM CaCl ₂ 10 µg psPAX2 10 µg pMD2.G 20 µg Lentivirus (pSico) ad 500 µl H ₂ O 500 µl 2x BBS
2x BBS:	50 mM BES (N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure) 280 mM NaCl Na ₂ HPO ₄ pH 6,95

lentivirale Infektion

Zur lentiviralen Transduktion von Fibroblasten wurden 1,5x 10⁵ NIH 3T3 Fibroblasten pro Vertiefung einer 6-Lochplatte einen Tag vor der Virustransduktion ausgesät. Für die

Virustransduktion sollten die Fibroblasten zu 70-80% konfluent sein. 50-200 μl des aufkonzentrierten Virus wurden jeweils zu 1 ml MEF-Medium pro Vertiefung einer 6-Lochplatte pipettiert. Zur Steigerung der Infektionseffizienz wurde zusätzlich Polybrene (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ hinzugegeben. Nach 14-16 Stunden wurde das virushaltige Medium abgenommen und zur weiteren Kultivierung der Fibroblasten durch MEF-Medium ersetzt. Für die lentivirale Transduktion von murinen ES-Zellen wurden diese zu erst mit Trypsin behandelt und danach als Einzelzellsuspension in MES-Medium resuspendiert. Pro Vertiefung einer mit Gelatine-beschichteten 12-Lochplatte wurden 5×10^5 ES-Zellen in 750 μl ausgesät. Noch in Suspension wurden die ES-Zellen mit 100-250 μl des aufkonzentrierten Virus und mit 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene (Sigma-Aldrich) vermischt. Die ES-Zellen wurden für 12 Stunden mit dem virushaltigen Medium inkubiert, mit PBS gewaschen und weiter 24 Stunden in MES-Medium kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die ES-Zellen auf eine 10 cm Schale replattiert bevor sie weitergehend analysiert wurden.

2.5.5 Cre-Transduktion

Für die Cre-Transduktion wurde die Vorratslösung erst kurz vor der eigentlichen Anwendung in das entsprechende Medium verdünnt und steril filtriert (0,22 μm). Erfahrungsgemäß wurde auch hierbei eine etwa 15 % höhere Konzentration als die finale Konzentration gewählt, da beim Verdünnen und folgender Sterilfiltration biologisch-aktives Protein verloren ging.

Fibroblasten

CV1-Zellen wurden 24 Stunden vor der Transduktion in MEF-Medium ausgesät. Die Zellen sollten zum Zeitpunkt der Cre-Transduktion zu 70-90% konfluent sein. Pro Vertiefung einer 24-Lochplatte wurden 9×10^4 Zellen ausgestreut. Vor der Transduktion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 16 Stunden mit 1-2 μM TAT-Cre in Cre-Transduktionsmedium inkubiert.

murine ES-Zellen

Die ES-Zellen wurden 4-6 Stunden vor der Transduktion in MES-Medium ausgesät. Pro Vertiefung in einer 24-Lochplatte wurden 1×10^4 Zellen ausgestreut. Vor der Transduktion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1-2 μM TAT-Cre in Cre-Transduktionsmedium inkubiert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in MES-Medium überführt. Wenn eine Cre-Transduktion in MES-Medium mit 10% FCS durchgeführt wurde, dann wurde eine Konzentration von 10-15 μM TAT-Cre verwendet. Die

unterschiedlichen Konzentrationen für die TAT-Cre Konzentration ergeben sich daraus, dass FCS die Proteintransduktion inhibiert und dieser inhibitorische Effekt über die höhere Konzentration kompensiert werden kann. Das ES-Zellmedium N2B27 ist Serum frei und erlaubt deswegen eine Cre-Transduktion mit 1-2 μM TAT-Cre durchzuführen.

humane ES-Zellen

Die humanen ES-Zellen wurden 24 Stunden vor der Transduktion als Einzelzellen in HES-Medium ausgesät. Pro Vertiefung einer 6-Lochplatte wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen ausgestreut. Am darauf folgenden Tag wurden die ES-Zellen für 6 Stunden mit 6 μM TAT-Cre in HES-Medium inkubiert. Danach wurden die humanen ES-Zellen in HES-Medium weiter kultiviert.

Cre-Transduktionsmedium für Fibroblasten:

[1-2 μM] TAT-Cre
in PBS / GlutaMAX D-MEM mit 4500mg/l Glucose (1:1)

Cre-Transduktionsmedium für ES-Zellen der Maus:

[1-2 μM] TAT-Cre
in N2B27
oder
[10-15 μM] TAT-Cre
in MES-Medium

Cre-Transduktionsmedium für humanes ES-Zellen:

[6 μM] TAT-Cre
in HES-Medium

2.5.6 Dre-Transduktion

Für die Dre-Transduktion wurde das Transduktionsmedium jeweils frisch angesetzt. Dem Dre-Transduktionsmedium wurde routinemäßig 5% Serum Replacement beigemischt, um die Löslichkeit von TAT-Dre im Medium zu verbessern. Nachdem das TAT-Dre ins Medium verdünnt wurde, wurde die Probe für 10 min bei 4000 rpm bei 4°C (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert und danach steril filtriert. Die Fraktion an nicht gelöstem rekombinantem Protein wurde dadurch abgetrennt. Zum Ausgleich des Verlustes an Protein wurde von vorneherein die doppelte Menge als der rechnerisch notwendigen hinzugegeben. Die CV1 Zellen wurden 24 Stunden vor der Dre-Transduktion in derselben Dicht wie bei der Cre-Transduktion beschrieben ausgesät. Für eine X-Gal-Färbung wurden die Zellen für weitere 48 Stunden unter Standardbedingung kultiviert und anschließend fixiert.

Dre-Transduktionsmedium für Fibroblasten:

[8 μ M]	TAT-Dre
[5% v/v]	Serum Replacement in PBS / GlutaMAX D-MEM mit 4500mg/l Glucose (1:1)

2.5.7 FLP-Transduktion

Vier bis Sechs Stunden vor einer FLP-Transduktion wurden die ES-Zellen vereinzelt und 20.000 Zellen pro Vertiefung einer 24-Lochplatte ausgesät. Nachdem die Zelle adhärent angewachsen waren, wurde MES-Medium abgenommen und durch FLP-Transduktionsmedium ersetzt. ES-Zellen wurden 72 Stunden nach Transduktion fixiert und mit X-Gal gefärbt oder für eine Southern Blot-Analyse verwendet. Zur Herstellung des FLP-Transduktionsansatzes wurde das FLP-Transduktionsmedium auf Eis gestellt und die TAT-HA und TAT-FLP Vorratslösung auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen der TAT-FLP Vorratslösung wurde diese entsprechenden der finalen Konzentration im Transduktionsmedium verdünnt. Die Konzentration sollte $x < 10 \mu\text{M}$ sein, um zu vermeiden, dass die Löslichkeit im physiologischen Puffer nicht überschritten wird. Die TAT-FLP Vorratslösung wurde in einem 15 ml Falcon vorgelegt und mit eiskaltem Transduktionsmedium aufgefüllt. Nach vorsichtigem Vermischen wurde das Falcon mit 4000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R), um evtl. ungelöste Bestandteile zu pelletieren. Zur Überprüfung der Proteinkonzentration wurden 25 μ l des Überstandes entnommen und eine Konzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt. Der Transduktionsansatz wurde bis zur Überschichtung der Zellen in Eiswasser aufbewahrt. Die Supplemente für eine optimierte FLP-Transduktion wurden in ein Kryoröhrchen vorgelegt. TAT-HA wurde in einer finalen Konzentration von 5 μ M eingesetzt. Die finale Konzentration von Serum Replacement in Volumenprozent war abhängig von der eingesetzten Konzentration an TAT-FLP (siehe Tabelle 2.2).

TAT-FLP [μ M]	1 μ M	2 μ M	3 μ M	4 μ M	6 μ M
SR [%]	1 %	2 %	6 %	8 %	12 %

Tabelle 2.2: Die Konzentration von Serum Replacement als Supplement im Transduktionsmedium korreliert mit der TAT-FLP Konzentration.

Nach vorsichtigem Vermischen wurde der Ansatz unverzüglich auf die Zellen gegeben. Die Inkubationszeit betrug routinemäßig drei Stunden. Nach der Inkubation wurde das Transduktionsmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit MEF-Medium überschichtet.

FLP-Transduktionsmedium für ES-Zellen:

[1-6 µM]	TAT-FLP
[5 µM]	TAT-HA
[1-12% v/v]	Serum Replacement in PBS / GlutaMAX D-MEM mit 4500mg/l Glucose (1:1)

2.5.8 RNA-Interferenz

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

2.5.8.1 Short interfering RNA (siRNA)

Die direkte Transfektion von dsRNA-Oligonukleotide wurde in der vorliegenden Arbeit als Methode ausgewählt, um den kompensatorischen Effekt (biologische Funktionalität) bei einem *knockdown* von endogenem Sox2 durch eine transgenes Sox2 zu untersuchen. Die RNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen. Die siRNA ist gegen endogenes Sox2 spezifisch, da die Zielsequenz im 5'UTR der mRNA liegt (Bosnali und Edenhofer, 2008) Für die Transfektion wurde das Reagenz Lipofectamine RNAiMax (4-6 µl) nach Hersteller Angaben benutzt. Zur Induktion des *knockdown* in murinen ES-Zellen wurden verschiedenen finale Konzentrationen (50, 100 und 200 nmol) der siRNA eingesetzt. Die siRNA und das Lipofectamine RNAiMax wurden jeweils in 250 µl Opti-MEM Medium (Invitrogen) verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden beide Ansätze gemischt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde die AllStars Negative Control siRNA (Qiagen) benutzt, die parallel zu jedem Ansatz unter den gleichen Bedingungen (100nmol) eingesetzt wurde. Während der Inkubationszeit wurden 2×10^5 ES-Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte in 1,5 ml N2B27-Medium ausgesät. Danach wurden die Transfektionsansätze in je eine Vertiefung überführt und bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden 100

nmol eines Fluoreszenz markierten Oligos, BLOCK-iT Alexa Fluor Red Fluorescent Oligo (Invitrogen) verwendet. Dabei handelt es sich um ein dsRNA Oligonukleotid ohne Homologie zu einem bekannten Gen. Ein an das dsOligo gekoppeltes Fluorophor ermöglicht es die zelluläre Aufnahme der dsRNA an einem Fluoreszenzmikroskop zu analysieren.

RNA-Oligonukleotid-Sequenzen:

Sox2 siRNA (Bosnali and Edenhofer, 2008): GGU UGA UAU CGU UGG UAA U

2.5.8.2 short hairpin RNA (shRNA)

Die Methode eines zur Erzeugung eines konditionalen stabilen *knockdown* wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Funktion von Sox2 in murinen ES-Zellen zu analysieren. Zur Identifikation der shRNA Transkripte und zur Generierung der DNA-Oligos, die für eine Haarnadelstruktur der shRNA kodierend sind, wurde die Software psico-oligomaker (<http://web.mit.edu/jacks-lab/protocols/pSico.html>) verwendet. Der Algorithmus für die Auswahlkriterien spezifischer shRNA-Sequenzen basiert auf der Publikation von Reynolds et al. (2004). Aus den gewichteten Vorschlägen wurden die zwei Sequenzen ausgewählt. Als dritte Sequenz wurde eine bereits publizierte und validierte Zielsequenz verwendet (Ivanova et al., 2006). Die Sequenzen waren 19 Nukleotiden lang und mussten mit einem Thymidin am 5'Ende des Sensestranges beginnen, damit das -1 Nukleotid des U6 Promoters im pSico Vektors rekonstituiert werden konnte. Der Sense Oligo war folgendermaßen aufgebaut: T-(N19)-(TTCAAGAGA)-(19N)-TTTTTTC der Antisense Oligo hat die komplementäre Sequenz mit zusätzlichen Nukleotiden am 5'Ende, um einen *Xho* I Überhang zu generieren. Die Sequenz des Haarnadelöhres lautet TTCAAGAGA und basiert auf der Publikation von Brummelkamp et al. (2002). Im nächsten Schritt wurden die einzelsträngigen Oligonukleotide hybridisiert, um über die so entstandenen *Xho* I-*Hpa* I Enden in das mit *Xho* I-*Hpa* I linearisierte pSico Plasmid eingefügt zu werden. Für die Hybridisierung wurden beide Einzelstränge in einer finalen Konzentration von 2 μ M in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1x Oligo-Hybridisierungs-Puffer überführt. Die Suspension wurde in einem 95°C heißen Heizblock für 5 min inkubiert. Dann wurde der Heizblock mit der Probe ausgeschaltet und auf RT abkühlen gelassen. Die dsOligos wurden nochmals mit H₂O zu einer finalen Konzentration von 100 nM verdünnt, um als Insert verwendet werden zu können. 10-15 μ g des pSico-Vektor wurde sequentiell erst mit *Hpa* I (über Nacht mit 5 u/ μ g DNA) und mit *Xho* I (6 h mit 5 u/ μ g DNA) verdaut, aufgereinigt und anschließend

2.6 Immunzytochemie und Immunfluoreszenzfärbung

Fixieren von Zellen

Beim Fixieren bleibt die Zellmorphologie durch Quervernetzung der Strukturproteine erhalten und der intrazelluläre Bestandteil der Zellen wird für Substanzen, wie beispielsweise Antikörper oder X-Gal-Färbelösung zugänglich. Zur Fixierung der Zellen wurden diese in einer 4%igen PFA-Lösung bei RT für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Immunfluoreszenzfärbung

Nach der Fixierung mit PFA wurden die Zellen für 45 Minuten mit Blockierungslösung (10 % FCS und 0,1 % Triton in PBS) bei RT inkubiert. Der Erstantikörper wurde über Nacht verdünnt in Detektionslösung (5 % FCS und 0,1 % Triton in PBS) bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 2 Stunden mit dem entsprechenden zweiten Antikörper in Detektionslösung inkubiert. Es wurde einmal mit PBS gewaschen. Die DNA in den Zellkernen wurden dann für 5 Minuten mit DAPI (1:1000 in HEPES-Puffer) gegengefärbt. Nach drei weiteren PBS-Waschschritten wurden die Präparate mit Mowiol eingedeckelt. Bei Doppel-Färbungen von Membran ständigen und intrazellulären Proteinen wurde stets zuerst das Zellmembran assoziierte Protein angefärbt. Die verwendete Blockierlösung für den ersten Antikörper enthielt kein Triton. Danach wurde erneut für 5 Minuten fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine neue Blockierung und Nachweis des intrazellulären Proteins.

β -Galaktosidasefärbung von Zellen

Die β -Galaktosidase wird wegen ihrer unkomplizierten Handhabung und ihrem eindeutigen Nachweis in vielen Systemen als Reporterprotein genutzt. Das Enzym setzt ein synthetisches Substrat (X-Gal; 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galaktosid) zu einem blauen Farbstoff um, der ausfällt und in den Zellen leicht zu erkennen ist. Die fixierten und zweimal mit PBS gewaschenen Zellen wurden mit X-Gal-Färbelösung überschichtet und für 24 h bei 37°C inkubiert.

X-Gal-Färbelösung:

5 mM $K_3(Fe^{III}(CN)_6)$
5 mM $K_4(Fe^{II}(CN)_6)$
2 mM $MgCl_2$
1 mg/ml X-Gal
in PBS

3 Ergebnisteil

3.1 Etablierung genetischer Werkzeuge

3.1.1 Optimierung der FLP-Transduktion in ES-Zellen der Maus

In der vorliegenden Dissertation sollte die Proteintransduktion der FLP-Rekombinase für die Anwendung in murinen ES-Zellen der Maus optimiert werden. In Vorarbeit generierte Frau Dipl. Biol. Daniela Kessler eine FLP-Reporterzelllinie in ES-Zellen (FC-lacZ). Sie konnte zeigen, dass eine FLP-Transduktion in FC-lacZ ES-Zellen *per se* möglich ist (Kessler, 2010).

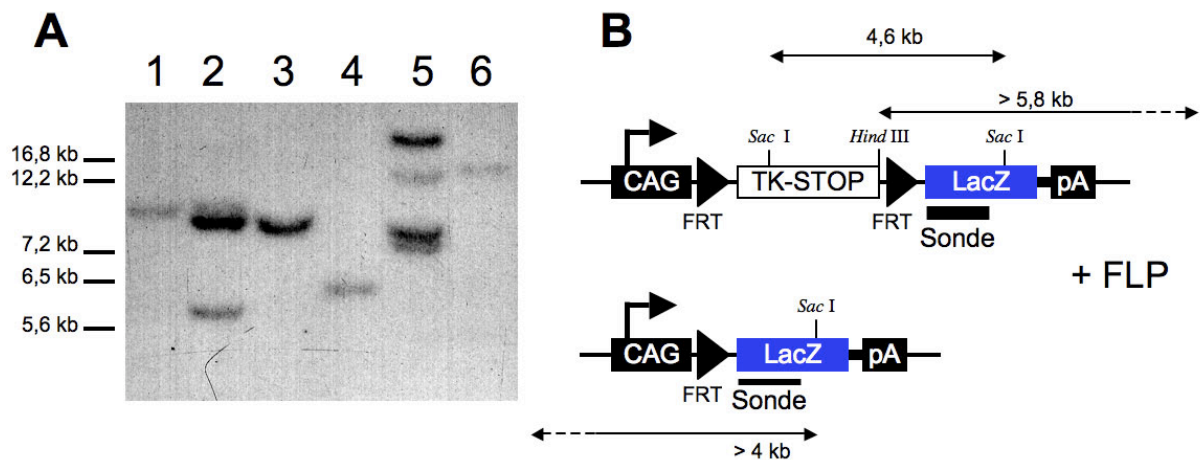


Abb. 3.1: Southern Blot-Analyse zur Bestimmung der Anzahl an integrierten Kopien der FC-lacZ-Expressionskassette in ES Zellen der Maus. (A) Der Röntgenfilm zeigt genomische DNA der stabilen FC-lacZ Klone 1-6, die zuerst mit *Hind* III hydrolysiert, geblottet und danach mit einer LacZ-Sonde detektiert wurden. Klon Nr. 4 wurde als *single copy* Klon identifiziert und für alle folgenden Experimente, unter der Bezeichnung FC-lacZ verwendet. (B) Schematische Darstellung der FC-lacZ-Expressionskassette vor und nach FLP-vermittelter Rekombination und der verwendeten Southern Blot-Strategie. kb: Kilobasen, FRT: FLP *Recognition Target*, pA: Polyadenylierungssignal, TK: HSV-Thymidinkinase, STOP: Transkriptionstop, CAG: CMV *early enhancer/chicken β-actin* Promotor.

Mein Ziel war es die Inkubationsbedingungen für die FLP-Transduktion so zu optimieren, dass einerseits die maximale Rekombinationseffizienz erreicht wird und andererseits die Zellvitalität und Pluripotenz der ES-Zellen erhalten bleibt. Zur Bestimmung einer erfolgreichen TAT-FLP vermittelten Rekombination wurden FC-lacZ ES-Zellen als Reporterzellen verwendet. Die FC-lacZ Reporterzellen ermöglichen eine einfache und schnelle Auswertung der Transduktionsversuche. Reporterzellen, die nach Inkubation mit der zell-permeablen FLP-Rekombinase (TAT-FLP) eine β -Gal Aktivität zeigen (Abb. 3.1.B), haben biologisch aktives TAT-FLP Protein aufgenommen. Zur Quantifizierung einer DNA-Rekombination wäre eine Zelllinie von Vorteil, die nur eine Kopie der Reporter-kassette integriert hat. Bei polyklonalen Linien oder mehrfach insertierten Transgenen kann die

Rekombinationseffizienz nicht eindeutig bestimmt werden. Zur Klärung, ob die FC-lacZ-Expressionskassette stabil in das Genom der murinen ES-Zellen integriert ist und um Aufschluss über die Anzahl der integrierten Kopien des Transgens zu erhalten, wurde eine Southern Blot-Analyse durchgeführt. Detektiert wurde der Blot mit einer LacZ-Sonde (Abb. 3.1.A) Für den Fall, dass ein Klon mit einer einfachen Integration des Transgenes vorliegt, ist eine spezifische Bande von $>5,8$ kb zu erwarten. Klone die an verschiedenen genomischen Loci Integrationen vorliegen haben, würden ein Bandenmuster aufweisen, bei dem jede einzelne Bande größer als $>5,8$ kb wäre. Bei zwei oder mehr direkt hintereinander integrierten FC-lacZ Konstrukten in einer *head-to-tail* Orientierung würde zusätzlich eine 10,3 kb große Bande detektiert werden. Demnach liegt das Transgen im FC-lacZ-Klon-4 in einfacher Kopienzahl und in einem spezifischen Genlocus integriert vor. Die Klone FC-lacZ-2 und -5 weisen mehrere Banden auf und haben somit die FC-lacZ-Expressionskassette an mehreren Genloci integriert. Die einzelne Bande der Klone FC-lacZ-1 und -3 könnten von einer Mehrfachintegration der FC-lacZ-Expressionskassette an einem Genlocus in *head-to-tail* Orientierung herrühren (Abb. 3.1.A). Der Klon FC-lacZ-6 wurde ausgeschlossen, da die lacZ-Reportergenaktivität gering war (Daten nicht gezeigt). Nachfolgende Experimente wurden ausnahmslos mit dem FC-lacZ-Klon-4 durchgeführt. Im Folgenden wird der FC-lacZ-Klon-4 zur Vereinfachung nur als FC-lacZ bezeichnet.

3.1.1.1 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der FLP-Transduktion

Zur Optimierung der FLP-Transduktion in murinen ES-Zellen wurde zunächst die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit analysiert. Hierfür wurden die FC-lacZ Zellen mit FLP-Transduktionsmedium unterschiedlich lange inkubiert (Abb. 3.2.A). Das Transduktionsmedium enthielt $4 \mu\text{M}$ TAT-FLP, 8% Serum Replacement* (Gibco) und $5 \mu\text{M}$ dTAT-HA (Wadia et al. 2004) auf einer Dulbecos Modified Eagle Medium (DMEM) Basis. In den meisten ES-Zellkolonien wurde eine β -Gal-Aktivität induziert (Abb. 2.A). Die Auswertung der Inkubationszeiten zwischen einer und drei Stunden ergab, dass bereits nach einer Stunde Inkubationszeit mehr als 70% der ES-Zellkolonien einen positiven β -Gal-Phänotyp aufwiesen. Die größte Anzahl an blau gefärbten Kolonien mit 77% wurde nach drei Stunden ermittelt (Abb. 3.2.B).

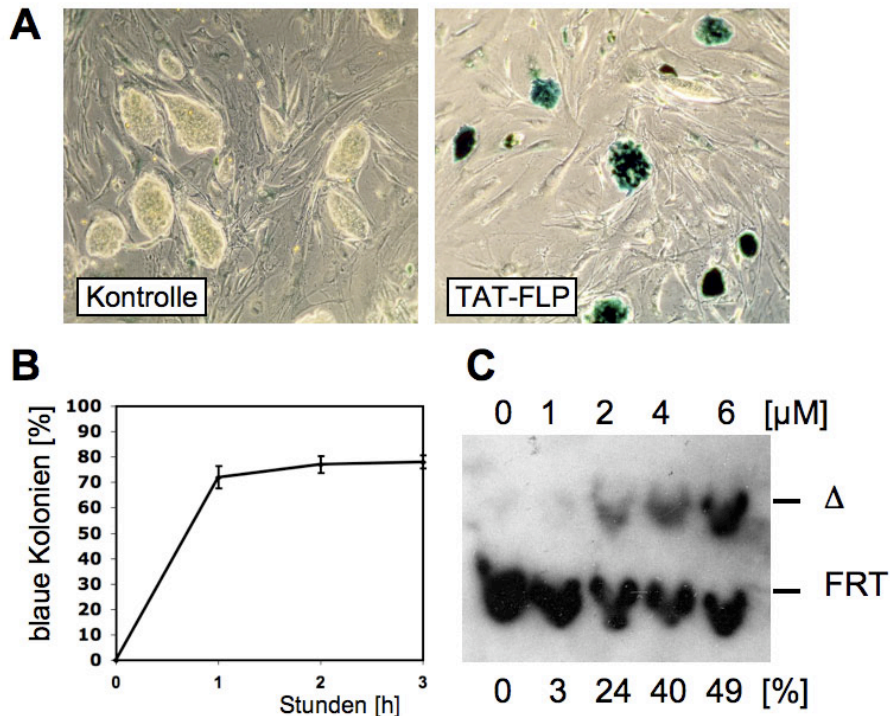


Abb. 3.2: Analyse der TAT-FLP Transduktion in murinen ES-Zellen mittels Reporterogenaktivität und Southern Blot. (A) FC-lacZ Reporterzellen wurden für drei Stunden mit 4 μM TAT-FLP inkubiert. Die Zellen wurden weitere drei Tage unter Standardbedingungen kultiviert, um anschließend fixiert und mit X-Gal-Lösung gefärbt zu werden. Unbehandelte Reporterzellen dienten als Kontrolle. (B) Quantifizierung der Zeitabhängigkeit. Der relative Anteil an blauen ES-Zellkolonien wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Reporterzellen wurden entsprechend wie in A beschrieben behandelt. ES-Zellkolonien mit mehr als 5 blauen Zellen wurden als positiv gezählt. (C) Southern Blot-Analyse der genomischen DNA der TAT-FLP behandelten ES-Zellen. Die Zellen wurden für 3 h in den aufgeführten TAT-FLP Konzentration inkubiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 48 Stunden in Normal-Medium wurde die DNA präpariert, mit *Sca I* hydrolysiert, geblottet und hiernach mit einer LacZ-Sonde detektiert (Abb. 1.B). Die unten angegebenen Werte geben die berechneten Effizienzen einer densitometrischen Analyse wider. FRT: FRT-flankiertes Allel; Δ : deletiertes Allel.

In einem Konzentrationsabhängigkeitstest wurden die FC-lacZ Zellen für 3 Stunden mit FLP-Transduktionsmedium mit Konzentrationen zwischen 1 bis 6 μM TAT-FLP Protein inkubiert. Die Rekombinationseffizienz wurde direkt auf DNA-Ebene mittels Southern Blot-Analyse untersucht (Abb. 3.2.C). Nicht rekombinierte DNA resultierte in einer 4,6 kb großen Bande, wohingegen FLP-rekombinierte DNA mit einer Bandengröße von >4 kb korrespondiert. Eine anschließende densitometrische Auswertung ergab eine konzentrationsabhängige Deletion der FRT-flankierten DNA-Sequenz. Eine Konzentration von 6 μM TAT-FLP im Transduktionsmedium hatte in der Southern Blot-Analyse eine Rekombinationseffizienz von ca. 50 % zur Folge.

3.1.1.2 TAT-FLP behandelte ES-Zellen behalten ihr Potenzial zur Keimbahngängigkeit

Die *in vivo* Keimbahngängigkeit von ES-Zellen gilt als Nachweis der Pluripotenz. Dieses Merkmal von pluripotenten ES-Zellen ermöglicht die Weitergabe der genetischen Veränderung über die Keimbahn zur nächsten Generation. Somit ist die Keimbahngängigkeit gleichzeitig auch die Grundvoraussetzung zur Generierung transgener Mauslinien. Es galt daher zu klären, ob murine ES-Zellen nach Behandlung mit FLP-Protein aus bakterieller Quelle ihr vollständiges Differenzierungspotential, bzw. ihre Pluripotenz, beibehalten und weiterhin zu allen Zellen des Embryos differenzieren können. Dieser Fragestellung wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Andreas Zimmer (Molekulare Psychiatrie, Uniklinikum Bonn) bearbeitet. Hierfür wurde eine ES-Zelllinie verwendet, die einen transgenen Serin-Racemase Locus beinhaltet (Zimmer et al. nicht veröffentlicht). In diesem Allel sind zwei FRT-Stellen, die eine Neomycin-Selektionskassette im Intron 6 flankieren. Die ES-Zellen wurden für 3h in Transduktionsmedium mit 4 μ M TAT-FLP inkubiert. Anschließend wurden klonale ES-Zellkolonien isoliert, expandiert und analysiert. 5 von 40 der isolierten Klone wiesen in der Southern Blot-Analyse den rekombinierten Locus auf. Einer der ES-Zell-Klone mit deletierter Neomycin-Selektionskassette wurde in Balb/c Blastozysten injiziert. In der F1-Generation gab es unter den Nachkommen fünf chimäre Tiere. Nur Tiere mit erfolgter Keimbahntransmission können die genetische Information an Nachkommen weitergeben. Aus diesem Grund wurden alle fünf männlichen Chimären mit C57BL/6 Mäusen verpaart. In einem Nachkommen aus der F2-Generation konnte der transgene Locus nachgewiesen werden.

3.1.2 Etablierung der Dre-Rekombinase als neues genetisches Werkzeug

Die Cre-Rekombinase ist unter den ortsspezifischen Rekombinasen (SSRs) der prominenteste Vertreter. Die bemerkenswerten Eigenschaften des Cre-loxP-Systems in Bezug auf Effizienz und Thermostabilität wurden bis heute *in vitro* als auch *in vivo* mit keinem zweiten Rekombinasesystem erreicht. Die Suche nach einem alternativen System schien mit der Publikation von Sauer und McDermott aus dem Jahr 2004 ein vorläufiges Ende gefunden zu haben. In ihrer Publikation beschrieben die Autoren das Dre-rox-System als vielversprechendes Kandidatensystem. Die Dre-Rekombinase ist ein heterospezifisches Cre-Homolog, welches ähnlich effizient wie Cre, statt der loxP-Stellen, rox-Stellen erkennt und diese miteinander rekombiniert. Das Dre-rox-System wurde in der Studie von Sauer und

McDermott (2004) zum einen in *Escherichia coli* (*E. coli*) und zum anderen über transiente Expression in *Chinese hamster ovary* (CHO) Zellen getestet. Leider waren die ursprünglich verwendeten Dre-rox Materialien nicht mehr verfügbar. Wir entschlossen uns daher in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Francis Stewart (Genomics, Technische Universität Dresden) das beschriebene Dre-rox-System selbst zu generieren und für die Anwendung in Säugerzellen *in vitro* und *in vivo* zu adaptieren.

3.1.2.1 Herstellung einer transduzierbaren Dre-Rekombinase

Die Arbeitsgruppe um Prof. Stewart generierte die Dre-induzierbare Reporterengenkassette rox-neo-stop-rox-LacZ (Abb. 3.3.B). Das in unserer Arbeitsgruppe hergestellte pSESAME-HTNDre Plasmid ermöglichte die Expression Dre-Rekombinase in Prokaryoten und Eukaryoten. Darüber hinaus besitzt das pSESAME Plasmid eine Expressionskassette, die für alle funktionalen Peptideinheiten kodiert, die notwendig sind, um eine zell-permeable Version des Proteins herzustellen. Die Funktionalität einer putativen zell-permeablen Dre-Rekombinase war bislang nicht untersucht worden.

Dre-vermittelte Rekombination in NIH 3T3 Fibroblasten

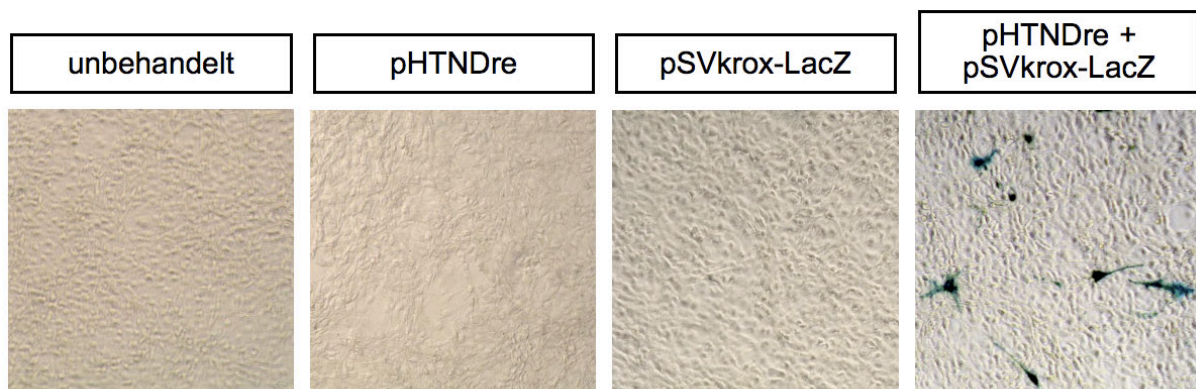


Abb. 3.3: Co-Transfektion eines Dre-Reporter- und eines Dre-Expressionsplasmids in NIH 3T3 Zellen. Pro 24-Loch-Vertiefung wurden 1×10^5 Fibroblasten 18-24 Stunden vor der Transfektion ausgesät. Zur Analyse der biologische Aktivität des Fusionsproteins His-TAT-NLS-Dre (HTNDre) und um die Funktionalität des Dre-induzierbare Expressionskassette des pSVkrox-LacZ Konstrukts zu testen, wurden die Zellen mit den aufgeführten Expressionsplasmiden transfiziert, nach 48 Stunden fixiert und mit X-Gal-Lösung gefärbt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nur in den co-transfizierten Ansätzen konnten blaue Zellen detektiert werden.

Eine transiente Co-Transfektion von Dre-Reporter- und Dre-Expressionsplasmid in NIH 3T3 Zellen sollte die biologische Funktionalität des rekombinanten Dre-Fusionsproteins klären und darüber hinaus die Dre-induzierbare Expressionskassette des pSVkrox-LacZ Konstrukts testen. 72 Stunden nach der Co-Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit X-Gal gefärbt.

Eine Dre-vermittelte Rekombination des pSVkrox-LacZ Konstrukts hätte zur Folge, dass eine Expression von β -Galaktosidase induziert würde (Abb. 3.4.B). Tatsächlich wiesen blau gefärbte Zellen in den co-transfizierten Ansätzen darauf hin, dass die His-TAT-NLS-Dre-Rekombinase (Abb. 3.4.D) mit ihren zusätzlichen Domänen biologisch aktiv ist und die Rekombination vermitteln kann.

Generierung einer stabilen Dre-induzierbaren Reporterzelllinie

Zur weiteren Analyse des Dre-rox-Systems war eine stabile Reporterzelllinie notwendig. Hierfür wurde das bereits für die transiente Expression genutzte pSVkrox-LacZ Plasmid linearisiert und durch Elektroporation in CV1-Zellen eingebracht. Die CV1-Zellen bilden in der Zellkulturschale einen Fibroblasten-artigen Zellrasen und sind daher gut für Transfektions- und Proteintransduktionszwecke geeignet. 24 Stunden nach Elektroporation wurden die Zellen für 14 Tage mit dem Neomycin Analogon G418 selektioniert. Danach wurden 20 unterschiedliche Zellcluster isoliert und expandiert. Zur Überprüfung, ob die einzelnen CV1-krox-LacZ Klone die Dre-induzierbare LacZ-Expressionskassette (Abb. 3.4.B) stabil integriert haben, wurden die 20 Klone auf eine 24-Lochplatte ausgesät und mit pHTNDre transfiziert. Auch für das Dre-rox-System gilt, dass für eine verlässliche Quantifizierung der Dre-vermittelten DNA-Rekombination eine Zelllinie erforderlich ist, die nur eine Kopie des Transgens integriert hat. Eine Reporterzelllinie mit mehrfach integrierter Dre-induzierbarer LacZ-Expressionskassette kann nicht für eine genaue Bestimmung der Rekombinationseffizienz verwendet werden. Die stabilen CV1-krox-LacZ Klone 4, 5, 11, 18 und 20 wurden aufgrund des hohen Anteils β -Gal-positiver Zellen (Abb. 3.4.A und Tab. 3.1) ausgewählt. Um Aufschluss über die integrierte Kopienanzahl des Transgens zu erhalten, wurde eine Southern Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 3.4.B-C).

Klon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
β -Gal	+	+	-	++	+++	++	+	+	+	+
Klon	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
β -Gal	++++	-	-	-	+	+	-	++++	-	+++

Tabelle 3.1: Halbquantitative Analyse des β -Gal-Phänotyps der stabiler CV1-krox-LacZ Klone nach Transfektion mit pHTNDre. β -Gal: relativer Anteil an β -Gal positiven Zellen: +++++: $\geq 20\%$, +++: 10-20%, ++: 10%, +: 1-5%, -: 0%.

Für die Southern Blot-Analyse wurde die genomische DNA der CV1-krox-LacZ Klone 4, 5, 11, 18 und 20 verwendet. Zur Detektion des Transgens wurde der Blot mit einer LacZ-Sonde

inkubiert (Abb. 3.4.B). Eine CV1-*krox-LacZ* Linie mit einer einzelnen und vollständig integrierten Expressionskassette liegt vor, wenn eine spezifische Bande bei ≥ 7178 bp zu erkennen ist. Ein Bandenmuster von mehreren Banden (≥ 7178 bp) würde auf eine mehrfache Integration der Expressionskassette in unterschiedliche genomische Loci hinweisen. Bei zwei oder mehr direkt hintereinander integrierten Konstrukten (*head-to-tail*) würde zusätzlich zu einer ≥ 7178 bp großen noch eine exakt 7684 bp große Bande detektiert werden. Demnach liegt der CV1-*krox-LacZ* Klon 18 mit einer Integration des Transgens an einem Genlocus vor (Abb. 3.4.C). Für alle Folgeuntersuchungen wurde die CV1-*krox-LacZ* Linie 18 verwendet und des Weiteren nur noch als CV1-*krox-LacZ* bezeichnet.

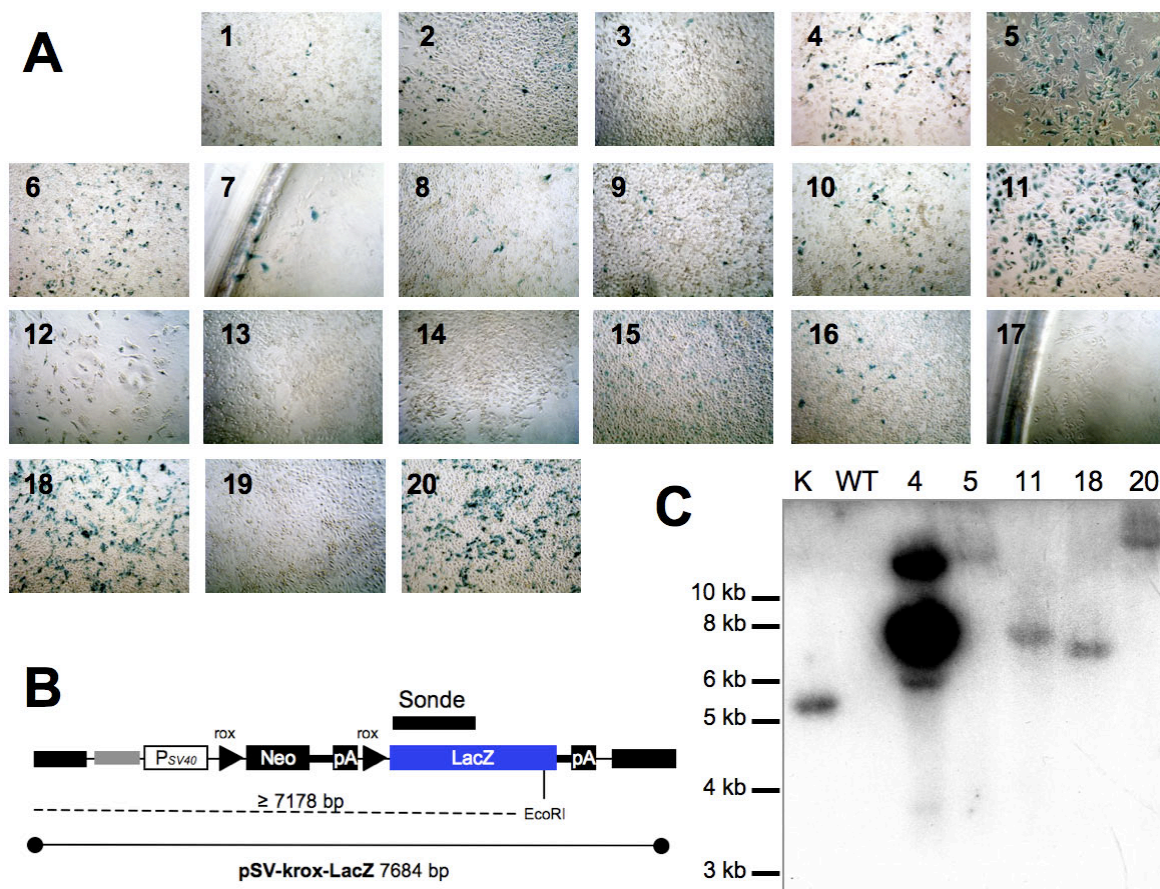


Abb. 3.4: Analyse der CV1-*krox-LacZ* Klone 1-20. Mit *Not I* linearisiertes pSV-*krox-LacZ* Plasmid wurde durch Elektroporation in CV1-Zellen eingebracht. 24 Stunden nach Elektroporation wurden die Zellen für 14 Tage mit [250µg/ml] G418 selektioniert. Danach wurden 20 Klone isoliert und expandiert. (A) Transiente Transfektion der stabilen CV1-*krox-LacZ* Klone mit 0,8 µg pHTNDre. 48 Stunden nach Transfektion mit pHTNDre wurden die Klone 1-20 fixiert und auf β -Galaktosidase-Aktivität untersucht. (C) Die genomische DNA, der Klone 4,5,11,18 und 20 wurden mit *Eco RI* hydrolysiert, geblottet und mit einer *LacZ*-Sonde detektiert. Die Southern Blot-Analyse gab Aufschluss über die Integrationshäufigkeit der *krox-LacZ*-Kassette ins Genom. Für die nachfolgenden Experimente wurde der *single copy* Klon Nr. 18, unter der Nomenklatur CV1-*krox-LacZ* verwendet. (B) Schematische Darstellung der Southern Blot-Strategie und der zu erwartenden Bandengröße.

Nachweis der Heterospezifität von Dre und Cre

In ihrer Publikation aus dem Jahr 2004 beschrieben Sauer und McDermott die Heterospezifität von Dre und Cre. Das bedeutet, dass Dre keine loxP-Stellen und Cre keine rox-Stellen rekombiniert. Somit sind das Dre-rox- und Cre-loxP-System zwei unabhängige Rekombinasesysteme. Die, in dieser Publikation (Sauer und McDermott, 2004) verwendeten Materialien, waren leider nicht mehr verfügbar, dienen aber als Grundlage zur Generierung neuer Materialien. Wäre das Dre-rox-System nicht heterospezifisch könnte es das Cre-loxP-System nicht komplimentieren und wäre damit weitaus weniger interessant. Die Heterospezifität sollte in den folgenden Experimenten adressiert werden. Es wurden die Cre-Reporter-Zelllinien CV1-5B (Kellendonk et al., 1996) und die in dieser Arbeit generierte Dre-Reporter-Zelllinie CV1-krox-LacZ verwendet, die beide nach Rekombinase-vermittelter Deletion das leicht nachweisbare Reporterprotein β -Galaktosidase exprimieren (Abb. 3.5.B).

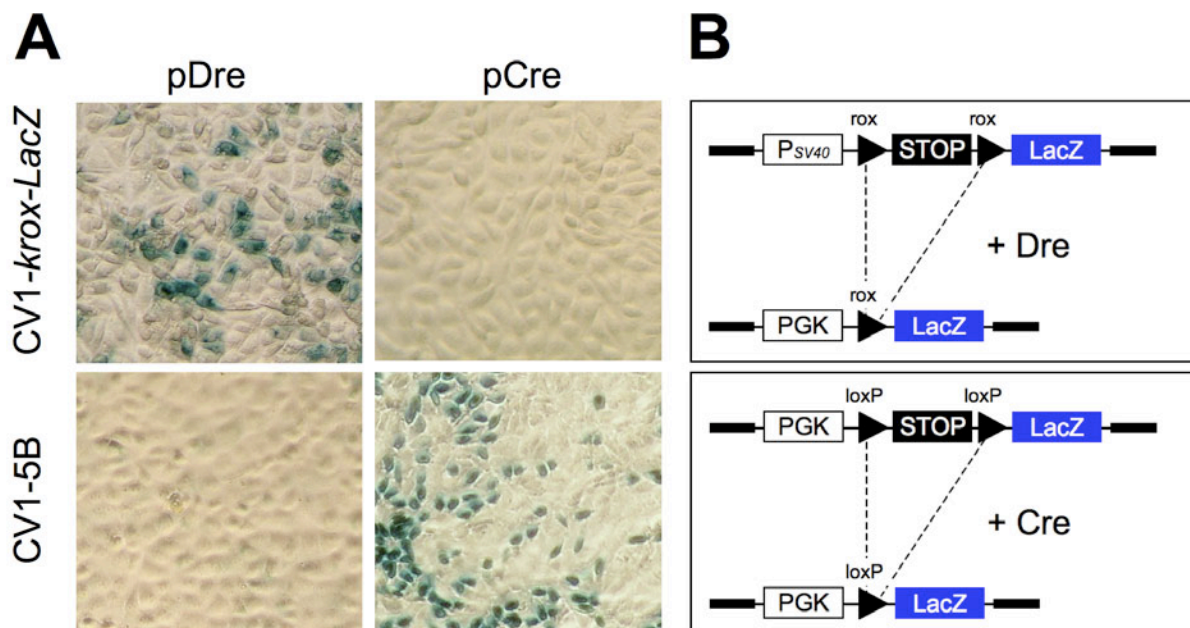


Abb. 3.5: Nachweis der Heterospezifität von Dre und Cre. (A) Reporterzellen wurden jeweils mit Dre- und Cre- Expressionsplasmiden transfiziert, fixiert und mittels Färbung auf β -Galaktosidase-Aktivität getestet. Dre rekombiniert nur rox-Erkennungsstellen und keine loxP-Erkennungsstellen miteinander. Cre hingegen rekombiniert nur eine loxP flankierte DNA-Sequenz und keine mit rox flankierte DNA-Sequenz. (B) Schematische Darstellung der Expressionskassetten der Reporterzellen, vor und nach SSR-vermittelter Rekombination.

Für die Durchführung wurden beide Reporter-Zelllinien jeweils mit pSESAME-HTNDre (pDre) und pTriExHTNCre (pCre) transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit X-Gal gefärbt. CV1-5B Reporterzellen zeigten nur im Transfektionsansatz mit pCre eine Blaufärbung, wohingegen CV1-krox-LacZ Reporterzellen

nur im Ansatz mit pDre positiv für LacZ waren (Abb. 3.5.A). Demnach vermittelte die Cre-Rekombinase Rekombination ausschließlich zwischen loxP-Erkennungsstellen und die Dre-Rekombinase induzierte eine Rekombination ausschließlich zwischen rox-Erkennungsstellen.

Expressions- und Aufreinigungsstudie des rekombinanten Dre-Fusionsproteins

Die zell-permeablen Versionen der Cre und FLP Rekombinasen haben sich als sehr effiziente Werkzeuge für konditionale Expressionsanalysen *in vitro* erwiesen (Haupt et al., 2007; Klotz et al., 2007; Nolden et al., 2006; Patsch et al., 2010; Peitz et al., 2007; Wörsdörfer et al., 2008). Aus bereits genannten Gründen stellt die Dre-Rekombinase einen vielversprechenden Kandidaten für die Erweiterung des Repertoires an Rekombinasewerkzeugen dar und sollte deshalb als zell-permeables Fusionsproteins (TAT-Dre) generiert werden. Zumal nach wie vor ein Bedarf für eine Rekombinase mit vergleichbaren Eigenschaften wie die von Cre besteht, da die Effizienz und Stabilität von TAT-FLP deutlich schlechter als die von TAT-Cre ist. Darüber hinaus würden drei zell-permeable Rekombinasen noch komplexere konditionale Strategien *in vitro* ermöglichen.

Das pSESAME-HTNDre Plasmid kodiert für ein 384 AS langes Dre-Fusionsprotein (Abb. 3.6.D). Das TAT-Dre Protein ließ sich im Bakterienstamm *BL21-Gold(D3)* exprimieren und aufreinigen (Abb. 3.6.A-C). Die densitometrische Auswertung der Eluatfraktion des SDS-Gels ergab für TAT-Dre eine Reinheit von 92% (Abb. 3.6.B). Die Proteinkonzentration der Eluatfraktion einer Standardaufreinigung betrug 34 μM . Durch die Dialyse des Eluats gegen DCB (*Dre Concentration Buffer*), einem 50% glycerinhaltigen Puffer, konnte das Volumen weiter eingeeengt und Protein bis zu einer Konzentration von 90 μM aufkonzentriert werden. Eine nachfolgende Ultrafiltration des Dialysats ermöglichte eine weitere Aufkonzentrierung auf eine Endkonzentration von $\geq 150 \mu\text{M}$ (Tab. 3.2). In einer auf diese Weise hergestellten und bei -20°C gelagerten Vorratslösung, konnte TAT-Dre für mehrere Monate ohne funktionellen Verlust aufbewahrt werden. Eine detaillierte Beschreibung der Expression und Aufreinigung sind dem Material und Methoden Teil (Kap. 2.4.2) zu entnehmen.

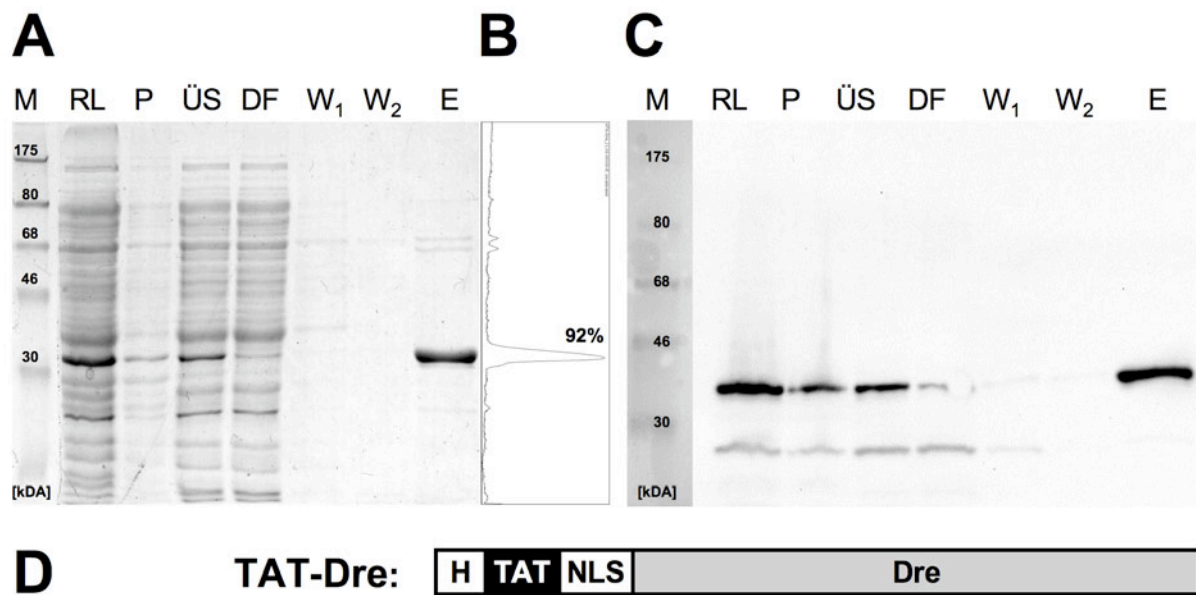


Abb. 3.6: Biochemische Analyse der Reinigung des rekombinanten Dre-Fusionsproteins aus *E. coli*. (A) Coomassie SDS-PAGE Analyse einer TAT-Dre-Aufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie. Das TAT-Dre hat eine errechnete molekulare Masse von 43,4 kDa. Die Proben der einzelnen Fraktionen wurden in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und davon jeweils 5 μ l aufgetragen. M: Marker; RL: Rohlysate; P: Pellet; ÜS: Überstand; DF: Durchfluss; W₁ und W₂: Waschpuffer; E: Eluat. (B) Die densitometrische Auswertung der Eluatfraktion mit der Software *ImageJ* ergab eine Reinheit von ~92%. (C) Western Blot Analyse der TAT-Dre-Aufreinigung. Zur Detektion wurde ein α -His-Antikörper verwendet. (D) Schematischer Aufbau des rekombinanten Dre-Fusionsproteins. Die Fusionsdomänen vom N-Terminus zum C-Terminus sind: H: His-tag bestehend aus sechs Histidinen, über die das Protein mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie angereichert werden kann; TAT: basische Peptidsequenz (GRKKRRQRRR) aus dem *HIV Tat Transaktivator* (Frankel und Pabo, 1988; Green und Loewenstein, 1988) wird als Proteintransduktionsdomäne (PTD) bezeichnet, an ein Protein fusioniert wirkt sich dies positiv auf dessen Zellpermeabilität aus (Schwarze et al., 1999); NLS: Kernlokalisierungssequenz (*nuclear location signal*) des *Simian Virus 40 (S40) large T-antigen*; Dre: Dre-Rekombinase (Sauer und McDermott, 2004).

	Eluat	Dialysat	Vorratslösung
Volumen	25 ml	7 ml	3,5 ml
Konzentration	34 μ M	90 μ M	160 μ M
Gesamtprotein	34 mg	25 mg	22,4 mg

Tabelle 3.2: Proteinausbeute einer TAT-Dre Aufreinigung aus 6 Liter Expressionsvolumen.

Untersuchungen zur biologischen Funktionalität von TAT-Dre

Die Transfektionsstudien mit pSESAME-HTNDre zeigten, dass das Fusionsprotein trotz seiner zusätzlichen Peptidsequenzen biologisch aktiv ist (Abb. 3.5). Die proteinbiochemischen Validierungsmethoden Western Blot und SDS-PAGE lassen noch keine Aussage zu, ob das rekombinante Dre Fusionsprotein biologisch aktiv ist. Eine

aberrante Konformation und Faltung könnten die biologische Aktivität des Proteins inhibieren. Es sollte geklärt werden, ob das rekombinante TAT-Dre Protein von Säugetierzellen aufgenommen werden kann und in der Lage ist, eine Dre-vermittelte Rekombination in diesen Reporterzellen zu induzieren. Aufgrund der bereits gemachten Erfahrung in der Nutzung der PTD-Technik war bekannt, dass die Proteintransduktion ein zeit- und konzentrationsabhängiger Prozess ist. Zur Ermittlung der optimalen Inkubationsbedingungen wurden die Parameter Zeit und Konzentration analytisch untersucht.

Zeitabhängigkeit der Dre-Proteintransduktion

Um die optimalen Inkubationszeit zu ermitteln, wurden verschiedene Inkubationszeiten zwischen einer Stunde und 16 Stunden getestet (Abb. 3.7). Das hierfür eingesetzte Transduktionsmedium hatte als Basis DMEM/PBS, das mit $4 \mu\text{M}$ TAT-Dre und 5% Serum Replacement® (SR) ergänzt wurde.

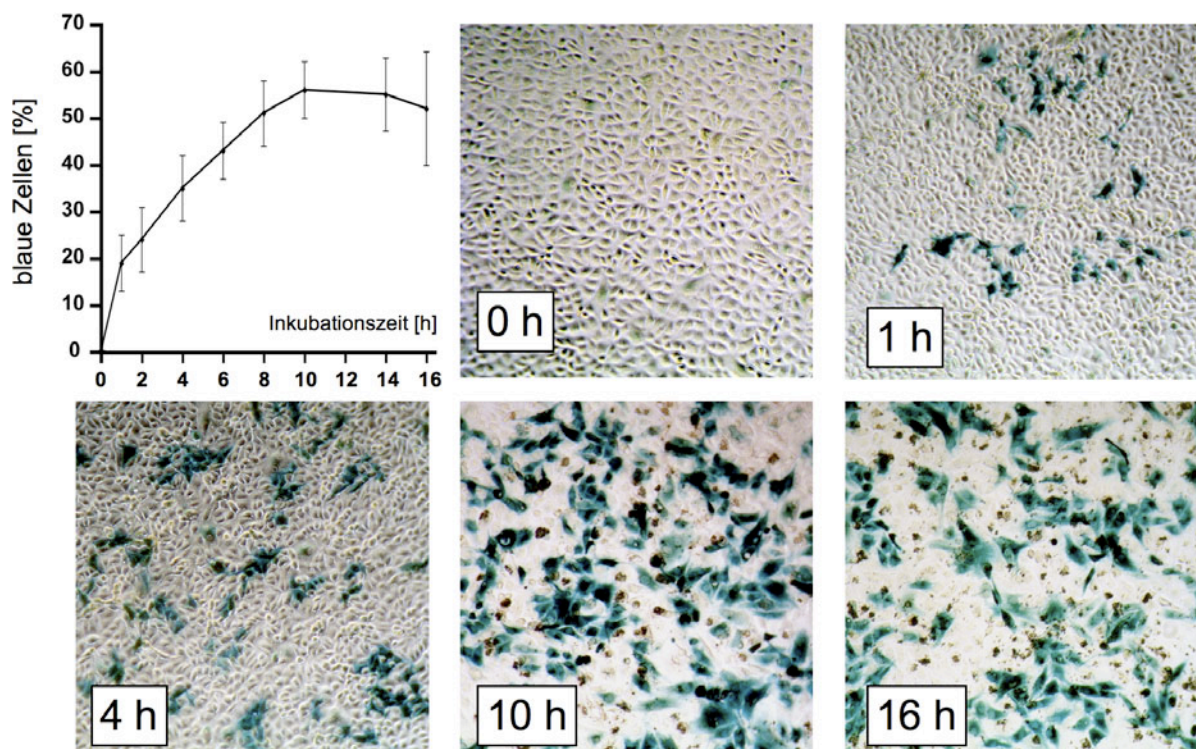


Abb. 3.7: Zeitabhängigkeit der TAT-Dre-Transduktion in CV1-krox-LacZ Zellen. 18-24 Stunden vor Transduktion wurden 2×10^6 Zellen auf eine 24-Lochplatte ausgesät. Die Zellen wurden bei unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit einer konstanten TAT-Dre Konzentration von $4 \mu\text{M}$ inkubiert. Quantifizierung der β -Galaktosidase Färbungen und deren graphische Darstellung, zeigt den Anteil an blauen Zellen als Funktion der Zeit. Für jede Inkubationszeit wurden jeweils ~ 1200 Zellen im Triplikat in drei unabhängigen Experimenten ($n=3$) ausgezählt.

Das Serumreplacement hat einen stabilisierenden Effekt auf rekombinante Proteine und verhindert deren Präzipitation unter Zellkulturbedingungen (Patsch 2005). Die jeweilige Effizienz der unterschiedlichen Inkubationszeiten wurde über die relative Anzahl der blau gefärbten Zellen bestimmt. Wird die Effizienz der TAT-Dre-Transduktion als eine Funktion der Zeit betrachtet, so ergibt sich ein asymptotischer Verlauf (Abb. 3.7). Die Funktion erreicht eine Sättigung nach 8 Stunden, bei einer maximalen Rekombinationseffizienz von ca. 55%. Eine halbmaximale Rekombinationseffizienz ist nach zwei Stunden erreicht. Als optimale Inkubationszeit lassen sich 8-16 Stunden ablesen (Abb. 3.7). Dies ermöglicht eine TAT-Dre-Transduktion der Reporterzellen über Nacht.

Konzentrationsabhängigkeit der Dre-Proteintransduktion

Zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit wurden bei einer gleich bleibenden Inkubationszeit von 14 Stunden (über Nacht) verschiedene Konzentrationen zwischen 2 μM und 8 μM eingesetzt (Abb. 3.8).

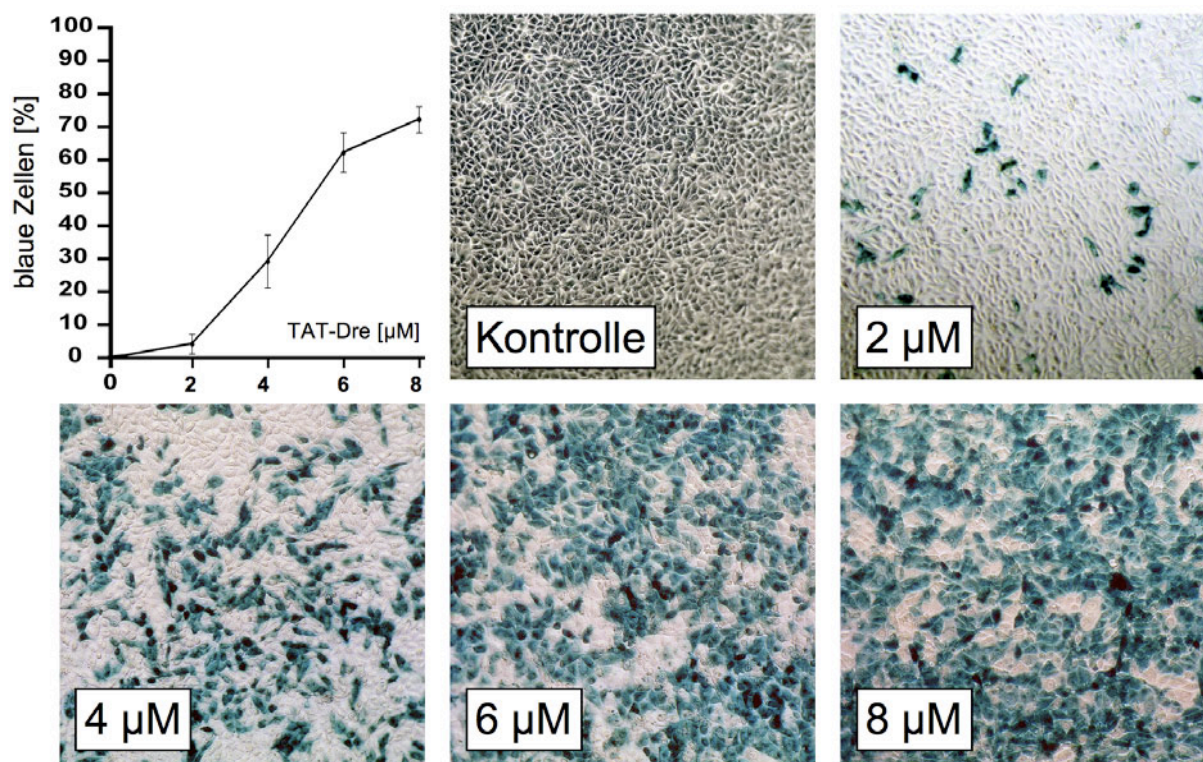


Abb. 3.8: Konzentrationsabhängigkeit der TAT-Dre-Transduktion in CV1-krox-LacZ Zellen. 18-24 Stunden vor Transduktion wurden 2×10^6 Zellen auf eine 24-Lochplatte ausgesät. Die Zellen wurden 14 Stunden mit unterschiedlichen TAT-Dre Konzentration inkubiert. Die β -Galaktosidase Färbungen wurden quantifiziert und als Anteil an blauen Zellen in Abhängigkeit zur Konzentration in einer Graphik dargestellt. Für jede Bedingung wurden jeweils ~ 1200 Zellen im Triplikat in drei unabhängigen Experimenten ($n=3$) ausgezählt.

Wird der Anteil an blauen Zellen gegen die Konzentration aufgetragen, lässt sich aus der graphischen Darstellung eine sich in etwa proportional zur Konzentration verhaltende Rekombinationseffizienz ablesen. Der größte Anteil an blauen Zellen, von über 70%, wurde bei einer Konzentration von 8 μM TAT-Dre erreicht (Abb. 3.8). TAT-Dre Konzentrationen höher als 8 μM konnten im Transduktionsmedium nicht erreicht werden. Bereits beim Verdünnungsvorgang des glycerinhaltigen Vorratspuffers in DMEM/PBS präzipitierte eine entsprechende Menge des löslichen Proteins in der Verdünnungslösung. Dies führte dazu, dass nach dem Sterilfiltrieren die maximale Konzentration des Transduktionsmediums stets 8 μM betrug.

3.1.2.1.1 Untersuchungen zur Transduzierbarkeit von TAT-Dre in murine ES-Zellen

Die genetische Manipulation von murinen ES-Zellen ist die Schlüsseltechnik zur Herstellung von transgenen Mauslinien. Manipulierte ES-Zellen können sich, wenn sie in eine Blastozyste injiziert werden zu jeder Zelle einer adulten Maus entwickeln. Hat ein Transfer der genetisch manipulierten Information in Keimbahnzellen stattgefunden, ermöglicht dies die Weitergabe der genetischen Information an nachfolgende Generationen und somit die Etablierung einer transgenen Zuchtlinie. Induzierte Pluripotente Stammzellen (iPS Zellen) haben viele Charaktereigenschaften mit ES-Zellen gemeinsam (Takahashi and Yamanaka, 2006). Für eine Anwendung des Dre-rox-Systems sind murine ES-Zellen als auch iPS Zellen interessante potenzielle Zielzellen. In Zusammenarbeit mit Kadari Asifiqbal sollte die zell-permeable Dre-Rekombinase genutzt werden, um virale Reprogrammierungsfaktoren aus dem Genom der iPS Zellen zu entfernen.

Nachdem die biologische Funktionalität von TAT-Dre in Fibroblastenzellen gezeigt werden konnte, sollte TAT-Dre zur genetischen Manipulation von ES-Zellen der Maus benutzt werden. Für die initialen Experimente der Dre-Transduktion wurden E14TG2a ES-Zellen, die eine Kopie des pSV-krox-LacZ Konstrukts in sich tragen (Anastassiadis und Stewart unveröffentlicht), als Reporterzellen verwendet. Nach einer Dre-vermittelte Rekombination exprimieren diese Zellen das Reportergen LacZ. Diese *proof-of-concept* Studie zeigt, dass eine Dre-Transduktion in murinen ES-Zellen erfolgreich angewendet werden kann (Abb. 3.9). Zur Optimierung der Dre-Transduktion in murinen ES-Zellen verwendete Matthias Brandt in den Folgeexperimenten Rosa-rox-LacZ ES-Zellen (Anastassiadis et al., 2009) als Reporterzellen. Unter Verwendung der Rosa-rox-LacZ ES-Zellen und unter leicht

modifizierten Transduktionsbedingungen zeigte er, dass eine Rekombinationseffizienz von über 50 % in murinen ES-Zellen erreichbar ist (Brandt 2008).

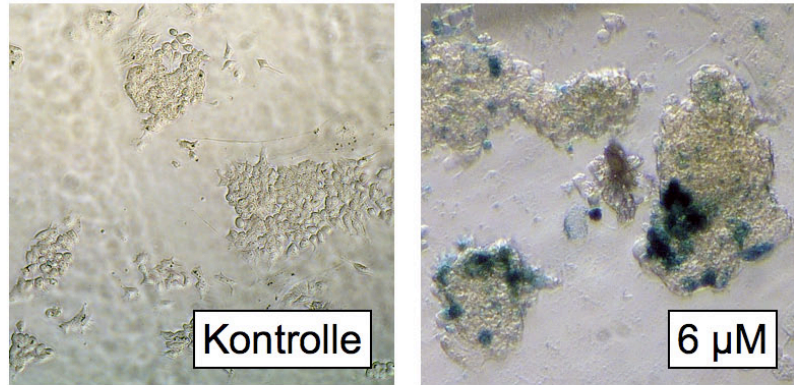


Abb. 3.9: TAT-Dre-Transduktion in murinen ES-Zellen. 3-4 Stunden vor Transduktion wurden 5×10^5 Zellen auf eine 24-Lochplatte ausgesät. Die Zellen wurden 12 Stunden mit $6 \mu\text{M}$ TAT-Dre inkubiert. Nach weiteren 3 Tagen in Norm-ES-Medium erfolgte die β -Galaktosidase Färbungen.

3.1.2.2 Herstellung eines liganden-induzierbaren Dre-Fusionsproteins

Um die Anwendungsmöglichkeiten des Dre-rox-Systems zu erweitern, wurde ein Expressionskonstrukt für ein DrePBD Fusionsprotein (*progesterone ligand binding domain*) generiert. Das Expressionskonstrukt ermöglicht eine posttranslational regulierbare Dre-Aktivität. Statt der Östrogen induzierbaren Domäne ERT2 (*mutant estrogen binding domain*), die bereits vielfach als CreERT2 Fusionsprotein Anwendung findet (Feil et al., 1996), fiel die Wahl auf eine verbesserte Version der Progesteron induzierbaren Domäne (PBD*) (Wunderlich et al., 2001) aus. Diese Strategie ermöglicht eine kombinierte Anwendung von DrePBD* und CreERT2. Die PBD-Domäne des DrePBD* Fusionproteins hat einen trunkierten C-Terminus. Dadurch ist die PBD* gegenüber endogenem Progesteron inert, kann aber durch die Zugabe von synthetischem Progesteron RU486 (Kellendonk et al., 1996; Vegeto et al., 1992; Wunderlich et al., 2001) induziert werden. Die codon-optimierte Dre-Sequenz wurde in das Expressionsplasmids pNN_PR650-914 (Wunderlich et al., 2001) inseriert.

3.1.2.2.1 Induktion von DrePBD* in Fibroblasten

Um die biologische Aktivität, Induzierbarkeit und Hintergrundaktivität des DrePBD* Fusionsproteins *in vitro* zu analysieren, wurden CV1-*krox-LacZ* Fibroblasten und ES-Zellen

der Maus Rosa-rox-LacZ (Anastassiadis et al., 2009) verwendet. Die Rosa-rox-LacZ ES-Zellen tragen die *krox-LacZ*-Expressionskassette als *kock-in* im genomischen Rosa26 Locus. Für die transiente Transfektion von CV1-*krox-LacZ* Zellen wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen auf einer 6-Lochplatte ausgesät, um 18-24 Stunden darauf mit pNN_DrePBD* oder pHTNDre (pDre) transfiziert zu werden (Details siehe Kapitel 2.5.4.1). Nach der Transfektion wurden die Fibroblasten in An- und Abwesenheit von [100 nM] des synthetischen Induktors RU486 kultiviert (Abb. 3.10.A).

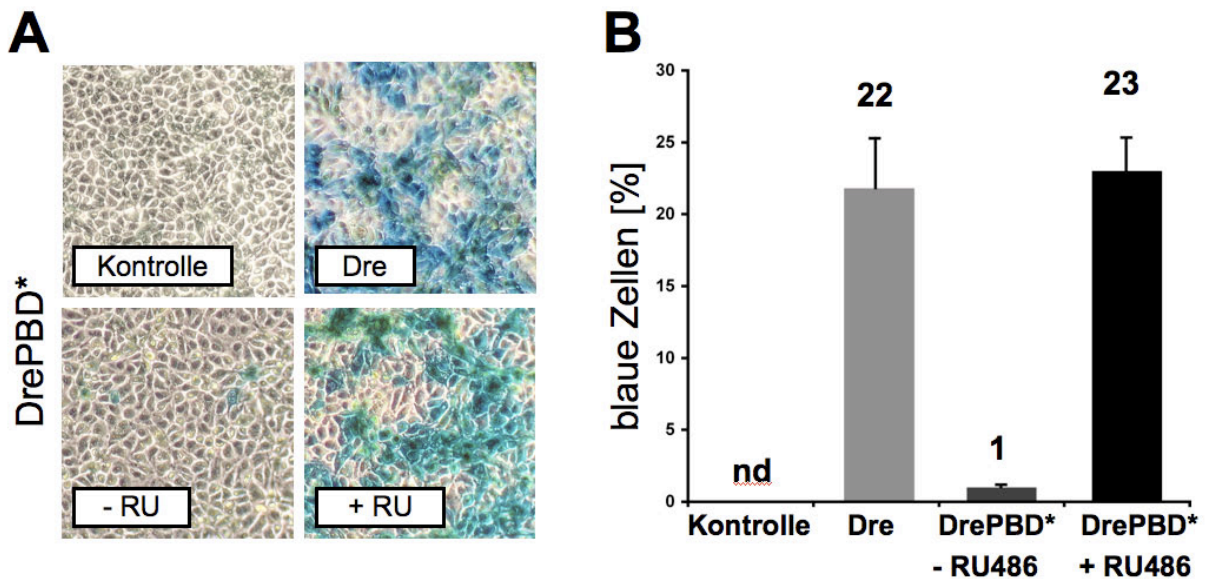


Abb. 3.10: Induktion von DrePBD* durch RU486 in CV1-*krox-LacZ* Zellen. (A) β -Galaktosidase Färbungen von CV1-*krox-LacZ* Zellen, die mit einem Dre oder DrePBD* Expressionsplasmid transfiziert wurden. DrePBD* transfizierten Zellen wurden in An- (+RU) bzw. Abwesenheit (-RU) von 100 nM RU486 kultiviert. (B) Quantifizierung der wie in A gezeigten β -Galaktosidase Färbungen. Die Experimente wurden im Triplikат angefertigt (n=3) und pro Zellkulturbedingung wurden jeweils ~5000 Zellen ausgezählt.

Die jeweilige Effizienz der Kulturbedingungen wurde über die relative Anzahl der blau gefärbten Zellen bestimmt (Abb. 3.10.B). Die Quantifizierung ergab, dass unter Standardkulturbedingungen fast keine Aktivität des Reporterproteins β -Galaktosidase zu beobachten ist, wohingegen die Applikation von RU486 zu einer hohen Aktivität von β -Galaktosidase führt. Bemerkenswerter Weise ist die induzierte β -Gal-Aktivität im Ansatz mit pNNDrePBD* (22%) ähnlich hoch wie im Ansatz mit dem konstitutiv-aktiven pDre-Expressionsplasmid (23%) (Abb. 3.10.B). In den Transfektionsansätzen mit pNNDrePBD* ohne der Zugabe von RU486 wurde in weniger als einem Prozent der Zellen β -Gal-Aktivität festgestellt (Abb. 3.10.B).

3.1.2.2.2 Induktion von DrePBD* in ES-Zellen

Die Untersuchung der Funktionalität von DrePBD* in murinen ES-Zellen führte zu ähnlichen Ergebnissen wie bei den Fibroblasten.

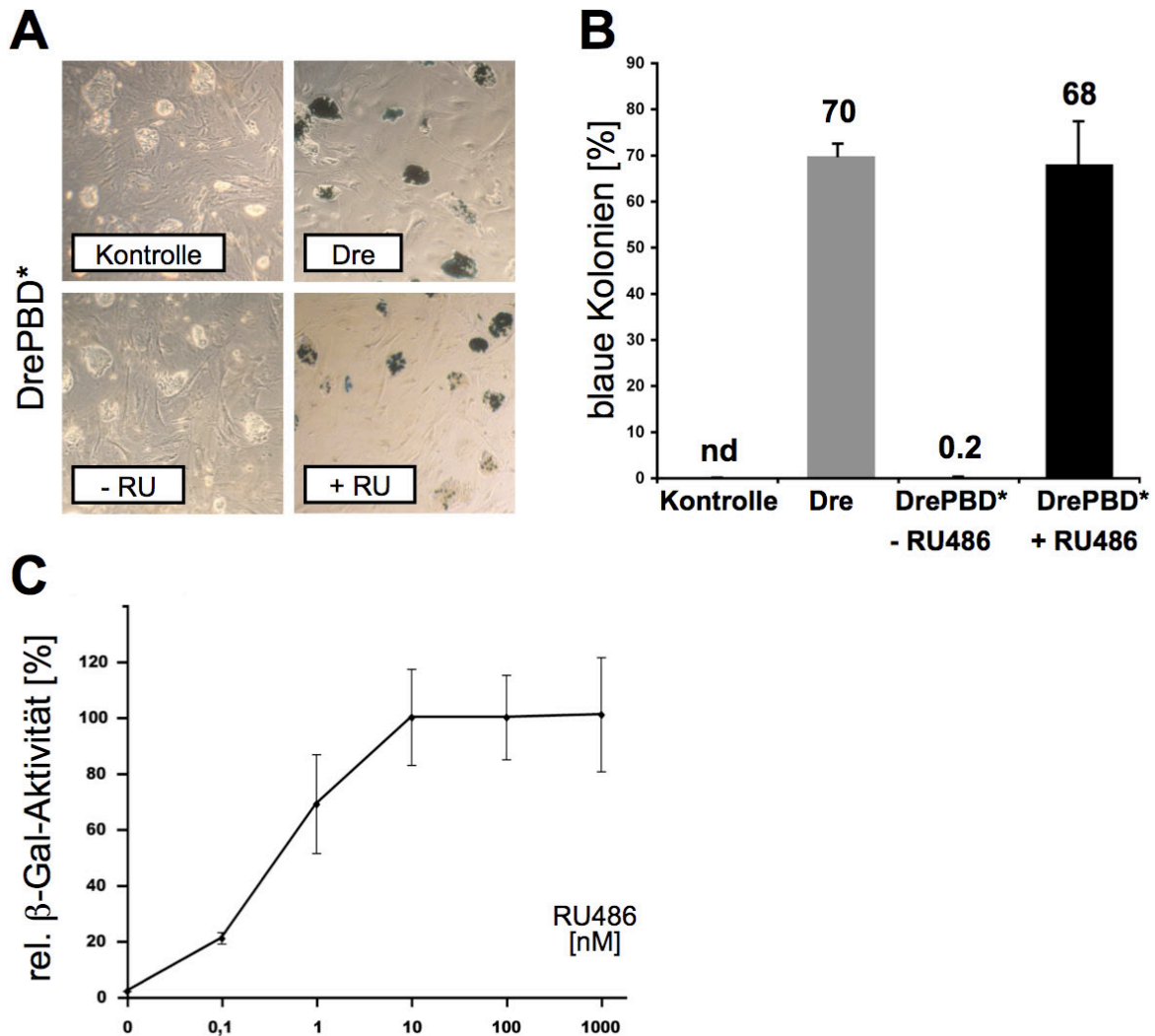


Abb. 3.11: Induktion von DrePBD* durch RU486 in Rosa-rox-LacZ ES-Zellen. (A) β -Galaktosidase Färbungen von Rosa-rox-LacZ ES-Zellen, die mit einem Dre oder DrePBD* Expressionsplasmid transfiziert wurden. DrePBD* transfizierten ES-Zellen wurden in An- (+RU) bzw. Abwesenheit (-RU) von [100 nM] RU486 kultiviert. (B) Quantifizierung der wie in A gezeigten Färbungen. Es wurden pro Zellkulturbedingung jeweils ~450 ES-Zellkolonien in n=4 Experimenten ausgezählt. (C) Graphische Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit, die relative β -Galaktosidase-Aktivität wurde gegen die Konzentration von RU486 aufgetragen. Der Wert von 68% aus der Quantifizierung in B wurde als maximal erreichbare β -Galaktosidase-Aktivität (100%) gesetzt. In B und C wurden alle ES-Zellkolonien mit mosaikartigem β -Gal-Phänotyp und mehr als 5 blauen Zellen als positiv gezählt. nd: nicht detektiert.

In den Transfektionsansätzen mit DrePBD*, ohne anschließende Applikation von RU486, konnten fast keine (0.2%) β -Gal positive ES-Zellen detektiert werden (Abb. 3.11.A). Dem gegenüber führte eine Applikation von RU486 zu einer β -Gal-Aktivität in 70% der ES-Zellkolonien (Abb. 3.10.A-B). Wie zuvor bei den Fibroblasten wurde bei den ES-Zellen

festgestellt, dass die RU-induzierte β -Gal-Aktivität in pNN_DrePBD* transfizierten Ansätzen (70%) mit der β -Gal-Aktivität in pDre transfizierten Ansätzen (68%) im Rahmen der Fehlergrenzen übereinstimmt (Abb. 3.11.B). Die Rekombinationseffizienz der einzelnen Kulturbedingungen wurde über die relative Anzahl der blau gefärbten Kolonien bestimmt, wobei ES-Zellkolonien mit mosaikartigem β -Gal-Phänotyp als positiv bewertet wurden, wenn sie mehr als 5 positive Zellen aufwiesen (Abb. 3.11.B). Darüber hinaus wurde eine Analyse zur DrePBD* vermittelten Rekombination in Rosa-rox-LacZ ES-Zellen in Abhängigkeit zur Konzentrationsabhängigkeit von RU486 durchgeführt. Wird die relative β -Gal-Aktivität gegen die Konzentration von RU486 aufgetragen, nimmt der Verlauf der Funktionsgeraden eine sigmoidale Form an (Abb. 3.11.C.) Die Funktionsgerade erreicht bei einer RU486 Konzentration von 1-10 nM bereits ein Plateau.

Die beschriebenen Untersuchungen belegen, dass neben der zell-permeablen Cre-Rekombinase sich auch FLP und Dre als weitere zell-permeable Rekombinasen zur konditionalen Mutagenese von ES-Zellen eignen.

3.2 Funktionale Analyse des Transkriptionsfaktors Sox2 in murinen ES-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle von Sox2 in der Pluripotenzerhaltung und die Rolle während der frühen neuralen Differenzierung untersucht werden. Zur Modulation der Genfunktion von Sox2 wurde eine konditionale Expressionskassette verwendet werden, die durch eine duale Rekombinasen-Strategie reguliert werden kann.

Während der Präimplantationsphase der frühen Säugetierentwicklung steuert Sox2 gemeinsam mit Oct4 und Nanog die Selbsterneuerung der pluripotenten Zellen in der Inneren Zellmasse. Die Expression von Sox2 ist während der Embryogenese essentiell. Sox2 wird unter anderem in der Inneren Zellmasse, im primitiven Endoderm, extraembryonales Ektoderm und während der Neurogenese exprimiert (Avillion et al., 2003; Ferri et al., 2004; Fraidenraich et al., 1998; Kamachi et al., 1998; Zappone et al., 2000). Homozygote Sox2 *knock-out* Embryonen der Maus sterben kurz nach Implantation. Diese Sox2^{-/-} Embryonen sind weder in der Lage den Epiblasten noch extraembryonales Ektoderm auszubilden (Avillion et al., 2003). In Anbetracht der essentiellen Bedeutung von Sox2 in der Präimplantationsphase bieten ES-Zellen ein ideales *in vitro* Modell, um dessen genaue molekulare Funktion zu untersuchen. Insbesondere humane ES-Zellen ermöglichen es, Genfunktionen *in vitro*, in einer

modellierten menschlichen Präimplantationsphase zu untersuchen, die *in vivo* unter ethischen Gesichtspunkten nicht durchführbar wären.

3.2.1 *Loss-of-function* Studie mittels Cre-induzierte Sox2 RNAi

RNA Interferenz (RNAi) stellt eine potente Methode dar, um die Expression eines Gens stark zu verringern (*knockdown*) und kann daher für *loss-of-function* Studien in ES-Zellen verwendet werden. Experimentell kann dies durch die Generierung einer transgenen Zelllinie, die eine induzierbare RNAi-Expressionskassette integriert hat, umgesetzt werden. Um einen *knockdown* des Zielgens zu erreichen, werden hierbei shRNA-Transkripte (*short hairpin* RNA), die einer Teilsequenz des Zielgens entsprechen, verwendet. Die shRNA-Transkripte bilden haarnadelförmige, doppelsträngige RNA-Strukturen, welche über die endogenen Enzyme *Drosha* und *Dicer* erkannt und weiter prozessiert werden, um letztendlich als Teil des RISCs (*RNA-induced silencing complex*) die Expression des Zielgens zu unterbinden. Zur Umsetzung der konditionalen shRNA-Induktion wurde der Cre-loxP-regulierte RNAi-Vektor pSico (Ventura et al. 2004) verwendet werden. Dieser Vektor ermöglicht eine konditionale Aktivierung von shRNA-Transkripten (Abb. 3.12.A), wobei eine Cre-vermittelte Rekombination die Transkription der shRNA vermittelt. Das pSico-System basiert auf einem lentiviralen Vektor, der es ermöglicht Zielzellen sehr effizient zu transduzieren (Ventura et al., 2004). Die Lentiviren wurden in HEK 293T Zellen produziert und für die Infektion über Ultrazentrifugation aufkonzentriert (für Details siehe Kapitel 2.5.4.3).

Zur Validierung eines Cre-induzierbaren *knockdowns* wurden zunächst NIH 3T3 Fibroblasten mit pSico Lentiviren transduziert. Die Expressionskassette ermöglicht es, die Infektionseffizienz über die Anzahl der GFP-positiven Zellen zu bestimmen (Abb. 3.12.A) Bei den 3T3 Zellen lag sie nach zwei Infektionsrunden zwischen 70-80% (Abb. 3.12.B). Die Bandlung der infizierten Fibroblasten mit TAT-Cre sollte klären, ob das rekombinante Cre-Fusionsprotein in der Lage ist, die modifizierten loxP-Stellen (TATA-lox) zu erkennen und zu rekombinieren. Die TATA-lox-Sequenz wurde durch den Austausch von zwei Nukleotiden in der *Spacer Region* generiert (Ventura et al., 2004), um eine bifunktionale loxP-Stelle zu erhalten. Die Sequenz erfüllt zum einen weiterhin die Funktion als Erkennungsstellen für die Cre-Rekombinase und zum anderen dient sie mit ihrer TATA-Box-Sequenz als cis-regulatorisches Element.

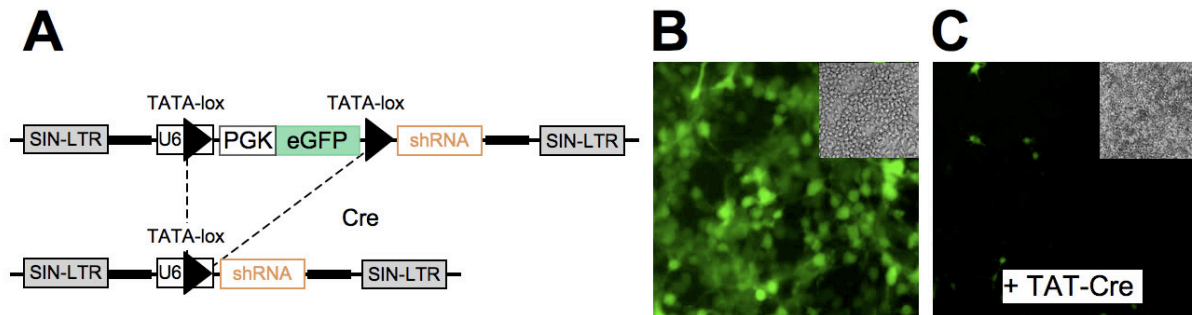


Abb. 3.12: TAT-Cre vermittelte Deletion einer TATA-lox flankierten PGK-GFP Sequenz. (A) Schematische Darstellung der pSico Expressionskassette vor und nach Cre-vermittelter Rekombination. (B-C) 3T3 NIH Fibroblasten wurden in einer 12-Lochplatte ausgesät und bei einer 80-90% Konfluenz mit pSico Lentivirus jeweils an zwei aufeinander folgenden Tagen mit Virus infiziert. (B) Lentiviral transduzierte Fibroblasten 2 Tagen nach Infektion, die Infektion wurde über GFP-Fluoreszenz verfolgt. (C) Der Ausschnitt zeigt die GFP-Fluoreszenz von infizierten Fibroblasten, 4 Tage nachdem die Zellen für 16 h mit 1 μ M TAT-Cre inkubiert wurden. SIN-LTR: Self-inactivating long terminal repeats, U6: Polymerase-III Promotor, TATA-lox: bifunktionale loxP-Stelle, Cre-Erkennungsstelle und TAT-Box in Einem, PGK: Phosphoglyceratkinase Promotersequenz, eGFP: *enhanced Green Fluorescent Protein*.

Findet eine Rekombination zwischen den beiden TATA-lox-Stellen statt, kommt es zu einer Deletion der GFP-STOP-Kassette, was wiederum die Transkription der shRNA einleitet (Abb. 3.12.A). Die TAT-Cre Behandlung von infizierten Fibroblasten diente als Vorversuch, um abzuklären, ob die GFP-Fluoreszenz einer polyklonalen Linie, deren Zellen wahrscheinlich mehrere integrierte Transgenkopien aufweisen, als Marker für das Rekombinationsereignis dienen kann. Die Fibroblasten wurden 48 Stunden nach Infektion mit TAT-Cre inkubiert. Fünf Tage nach der TAT-Cre Applikation war in fast allen Zellen die GFP-Fluoreszenz deutlich herunterreguliert (Abb. 3.12.C). In manchen Zellen konnte ein Verlust an GFP-Fluoreszenz bereits 36 Stunden nach der Proteintransduktion beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), wohingegen in den meisten Zellen der Fluoreszenzverlust erst nach 4 Tagen erfasst werden konnte (Abb. 3.12.C). Diese Untersuchungen zeigen, dass die TAT-Cre vermittelte Deletion von TATA-lox Sequenzen in Fibroblasten mit hoher Effizienz durchgeführt werden kann.

Im nächsten Schritt sollte das pSico-Expressionssystem für einen RNAi-Ansatz gegen Sox2 in ES-Zellen der Maus genutzt werden. Hierfür wurden drei unterschiedliche Sox2-spezifische shRNA Sequenzen ausgewählt. Zur Identifikation der Sox2 spezifischen shRNA Transkripte wurde die Software psico-oligomaker verwendet, deren Algorithmen auf den Auswahlkriterien der Publikation von Reynolds et al. (2004) basieren. Es wurden zwei Sequenzen ausgewählt, die im folgenden Sequenz I (GAGCACCCGGATTATAAAA) und Sequenz II (GCTCGCAGACCTACATGAA) genannt werden. Sequenz III

(GGTTGATATCGTTGGTAAT) ist eine validierte und bereits publizierte Sequenz (Ivanova et al., 2006). Die drei Sequenzen I-III wurden ins pSico-Expressionssystem eingefügt. Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden hybridisiert und über die so entstandenen kohesiven Enden der doppelsträngigen Oligonukleotide in das pSico Plasmid eingefügt (ausführliche Beschreibung Kapitel. 2.5.8.2). Murine ES-Zellen (E14T Zellen; Kehler et al., 2004) wurden mit den für die shRNA Sequenzen I-III kodierenden pSico Lentiviren infiziert. Anschließend wurden die E14T Zellen per Durchflusszytometrie nach GFP Expression sortiert. Durch das Sortieren der Zellen konnten die GFP-positiven Zellen von initial ~27% auf letztendlich $\geq 95\%$ angereichert werden (Abb. 3.13.A-B).

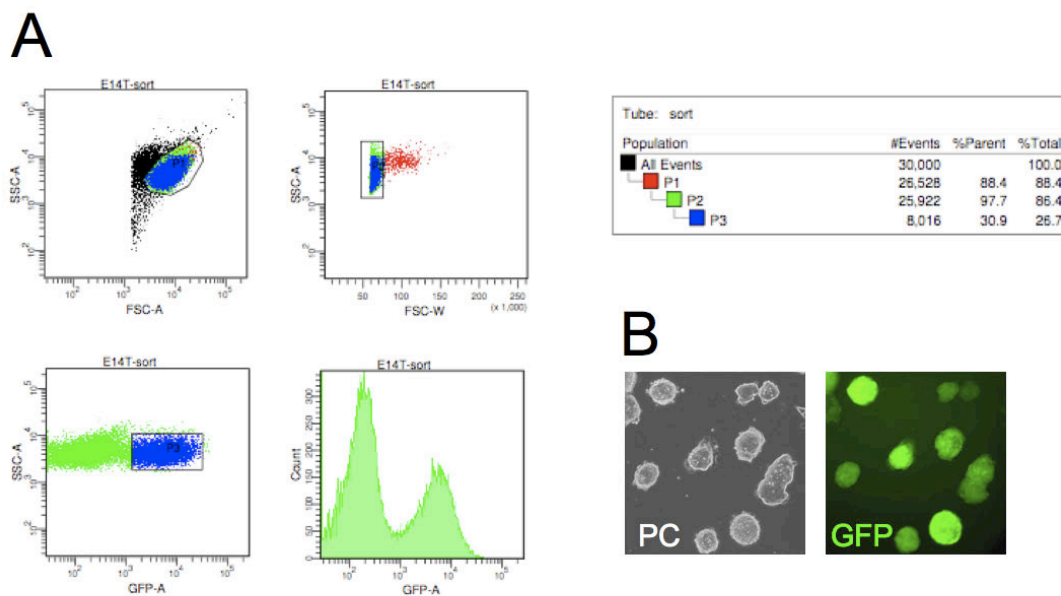


Abb. 3.13: Durchflusszytometrische Sortierung von pSico-GFP infizierten ES-Zellen. (A) Durchflusszytometrische Analyse der Sortierung nach GFP-Signal. P1: Das berechnete Flächenintegral des Vorwärtsstreulichts (FSC-A) um Zelltrümmer und tote Zellen auszuschließen. P2: Das berechnete Flächenintegral des Vorwärtsstreulichts (FSC-W), um Dubletten aus der Zellpopulation auszuschließen. P3: Zellsortierung anhand der GFP-Fluoreszenz (B) Phasenkontrast (PC) und Fluoreszenzaufnahme im FITC-Kanal von pSico-shRNAIII E14T Zellen 5 Tage nach der FACS-Sortierung.

Die angereicherte GFP-positiven Zellen wurde vereinzelt und ausgesät. Anschließend wurden die adhärennten Zellen mit TAT-Cre behandelt und vier Tage später morphologisch sowie immunzytochemisch analysiert. Die TAT-Cre Behandlung induzierte einen Verlust der grünen Fluoreszenz in allen drei Ansätzen, allerdings konnte nur im Ansatz mit der shRNA Sequenz III eine erhöhte Anzahl an morphologisch veränderten ES-Zellen beobachtet werden (Abb. 3.14.A). Der GFP-Verlust korrespondierte in diesen Zellen mit einer differenzierten Morphologie der ES-Zellen (siehe Pfeil, bzw. Pfeilspitze in Abb. 3.14.A). Um den Effekt der

TAT-Cre Behandlung zu quantifizieren und zu spezifizieren, wurde bei den transgenen pSico-shRNA-III Zellen der Prozentsatz an „nicht-differenzierten“, „differenzierten“ und „gemischten“ Kolonien bestimmt (Abb. 3.14.C). Die Einteilung in die drei Kategorien erfolgte nach morphologischen Gesichtspunkten, wobei eine „gemischte“ Kolonie sich sowohl aus differenzierten als auch nicht-differenzierten Zellen zusammensetzt.

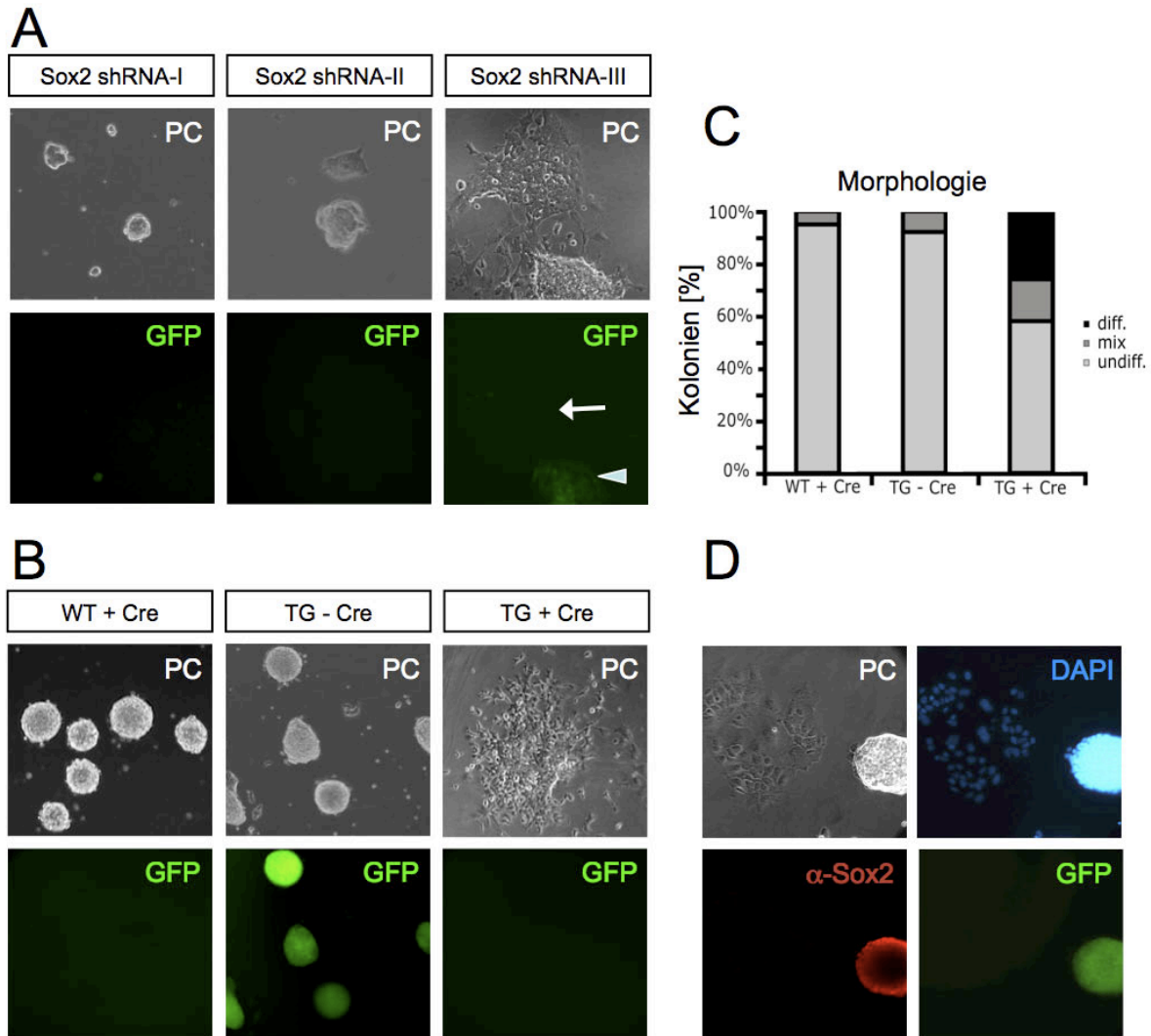


Abb. 3.14: Analyse einer Cre-induzierten Sox2 RNAi in murine ES-Zellen. (A-B) Mikroskopaufnahmen von lebenden, mit TAT-Cre behandelten transgenen pSico-shRNA ES-Zellen (parental E14T). 2000 Zellen wurden pro Vertiefung einer 12-Lochplatte ausgesät und nach 4 Stunden mit 15 μ M TAT-Cre behandelt. Mikroskopische Aufnahmen wurden 4 Tage nach der Proteintransduktion gemacht. (A) Die transgenen E14T Zellen besitzen eine Cre-induzierbare shRNA Expressionskassette mit unterschiedlichen Sox2 Zielsequenzen, die entsprechend als shRNA-I-III aufgeführt sind. Der Pfeil weist auf eine differenziert GFP-negative und die Pfeilspitze auf eine nicht-differenzierte GFP-positive Kolonie hin. (B) Unbehandelte (TG -Cre) und mit TAT-Cre behandelte pSico-shRNA-III E14T Zellen (TG + Cre). Die TAT-Cre behandelten parentalen Wildtypzellen (WT + Cre) dienen als Kontrolle. (C) Das Diagramm zeigt die Quantifizierung der prozentualen Anteile von nicht-differenzierten (hellgrau), differenzierten (schwarz) und gemischten Kolonien (dunkelgrau), aus dem in B beschriebenen Versuchsansatz. (D) Mikroskopische Aufnahmen von fixierten mit TAT-Cre behandelten pSico-shRNA-III ES-Zellen. Hier gezeigt Phasenkontrast, Immunfärbung gegen Sox2, GFP-Fluoreszenz und DAPI.

Die Prozentwerte wurden mit den Werten von unbehandelten transgenen E14T Zellen sowie mit TAT-Cre behandelten wildtypischen E14T Zellen in einem Diagramm aufgetragen und verglichen (Abb. 3.14.C). Nur aus TAT-Cre behandelten ES-Zellen, die zuvor mit pSico-shRNA-III Virus infiziert worden waren, entstanden bis zu 30% Kolonien der Kategorie „differenzierte Kolonien“ vor. Eine Immunfärbung gegen Sox2 bestätigte, dass die GFP-positiven Zellen nach wie vor Sox2 exprimieren, wohingegen in Cre rekombinierten und GFP-negativen Zellen kein Sox2 mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.14.D). Somit konnte gezeigt werden, dass das konditionalen Expressionssystem für eine Cre-induzierbare RNAi, in Kombination mit der Cre-Proteintransduktion, sehr effizient für den *knockdown* von Sox2 in murinen ES Zellen etabliert werden konnte. Die für den Sox2 *knockdown* verwendete RNAi-Sequenz erlaubt, aufgrund der Sequenzhomologie der Sox2 Gene von Maus und Mensch, ebenfalls die Nutzung des Systems in humanen ES-Zellen. Diese Arbeiten werden momentan innerhalb der Arbeitsgruppe fortgeführt.

3.2.2 Gain-of-function Studie mittels Cre-induzierbarer Überexpression von Sox2

3.2.2.1 Herstellung einer reversibel induzierbaren Expressionskassette

Eine Ziel dieser Arbeit war es, mit einer *gain-of-function* Studie die Genfunktion von Sox2 in ES-Zellen und in Zellen der frühen neuralen Differenzierung zu untersuchen. Die Überexpressionsollte über eine Cre-induzierbare ektopische Expression von Sox2 erreicht werden. Hierfür wurde die Expressionskassette des pBO1-IH (Hesse, 2007) modifiziert und anschließend verwendet, um murines (Sox2) und humanes Sox2 (SOX2) entsprechend in murinen und humanen Zellen zu exprimieren. Die Expressionskassette von pBO1-IH wird von FRT-Stellen flankiert und von einem CAG-Promotor (*CMV early enhancer/chicken β -actin promotor*) kontrolliert. Der CAG-Promotor in Kombination mit der Polyoma Enhancer-Sequenz erlaubt eine stabile Langzeitexpression in murinen sowie humanen ES-Zellen und in davon abgeleiteten Zellen. (Alexopoulou et. al., 2008; Chambers et al., 2003 und Liew et al., 2007) Die IRES-Hygromycin-Kassette des pBO1-IH Vektors wurde durch eine IRES-Puromycin-Selektionskassette aus dem pPyCAGIP Vektor ersetzt. Ein *EcoR V* und *Sma I* flankiertes PCR-Fragment, welches entweder für das offenen Leserasters von murinem Sox2 oder humanem SOX2 kodierte, wurde in pBO1-IP über die Restriktionsschnittstellen von *Not I-Sma I* eingefügt. Das Sox2 wurde aus dem Vektor pSESAME-HTNSox2 (Bosnali und Edenhofer, 2008) und das SOX2 aus dem Vektor pDONR223 (clone ID 5818, Open

Biosystems) amplifiziert. Beide Sox2 Varianten wurden dabei durch verlängerte PCR-Primer mit einer zusätzlichen FLAG-tag Sequenz am 5'-Ende versehen. Die genetische Fusion des FLAG-tags an die cDNA ermöglicht eine Unterscheidung zwischen endogenem und transgenem Protein. Die Expressionskassetten des pBO1-Sox2-IP und pBO1-SOX2-IP sind exakt gleich aufgebaut und unterscheiden sich nur in der Spezies-spezifischen cDNA. Vor einer Cre-vermittelten Rekombination wird unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CAG-Promotors das Neomycin Resistenzgen (Neo^R) exprimiert. Ein Transkriptionsstop stromabwärts vom Neo^R unterbindet die Expression der nachfolgenden Transgene.

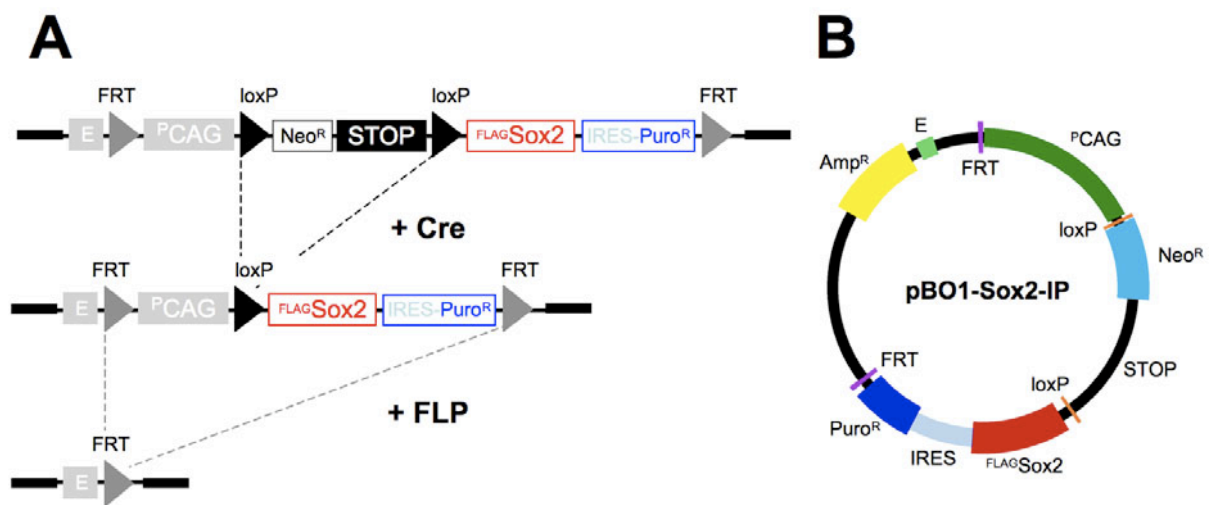


Abb. 3.15: Reversibel induzierbare Expressionskassette des pBO1-Sox2-IP Vektors. (A) Schematische Darstellung der konditionalen Expressionskassette. Der ubiquitäre CAG-Promotor ermöglicht nach Transfektion in Zielzellen eine positive Selektion auf das Neomycin Resistenzgen. Die nachgeschaltete Sequenz eines Transkriptionsstops blockiert die Expression des Zielgens. Erst nach einer Cre-vermittelten Rekombination und der Exzision der Neo-Stop-Sequenz wird das Zielgen Sox2 exprimiert. Das Rekombinationsereignis kann über das Puromycin Resistenzgen, welches über eine IRES-Sequenz an Sox2 gekoppelt ist, selektioniert werden. Über eine anschließende FLP-vermittelte Rekombination könnte die Expressionskassette ausgeschnitten und inaktiviert werden. (B) Plasmidkarte des pBO1-Sox2-IP Plasmids. P CAG: CAG-Promotor, NeoR: Neomycin Resistenzgen, STOP: Transkriptionsstop (Lakso et al., 1992), $^{\text{FLAG}}$ Sox2: FLAG-tag markierte Sox2 cDNA, IRES: *internal ribosomal entry side*, Puro R : Puromycin Resistenzgen, Amp R : Ampicillin Resistenzgen, E: Polyoma Enhancer-Sequenz PyF101 (Thomas and Capecchi 1987).

Eine Cre-vermittelte Rekombination deletiert die Neo^R -Stop-Kassette, wodurch die Expression von Sox2 über den CAG-Promotor aktiviert wird (Abb. 3.15.A). Eine an das Sox2 fusionierte IRES (*internal ribosomal entry side*) Sequenz ermöglicht eine polycistronische Regulation, so dass das stromabwärts gelegene promotorlose Puromycin Resistenzgen ebenfalls exprimiert wird. Dies hat den entscheidenden Vorteil, dass mit der Applikation des Antibiotikums Puromycin positiv auf das Rekombinationsereignis selektioniert werden kann. Eine nachfolgende FLP-vermittelte Rekombination sollte die Expressionskassette deletieren und die Transgenexpression beenden (Abb. 3.15.A).

Zur Analyse, ob die konditionale Expressionskassette des BO1-Sox2-IP Konstruktes durch Cre in den transgenen ES-Zellen aktiviert werden kann, wurden die ES-Zellen über Nacht mit TAT-Cre inkubiert. 24 Stunden nach der Cre-Proteintransduktion wurde das Wachstumsmedium durch das Antibiotikum Puromycin ergänzt. Nach 3 Tagen waren alle transgenen ES-Zellen der Kontrollschale, die nicht mit TAT-Cre behandelt wurden, abgestorben. In der Zellkulturschale mit den TAT-Cre behandelten Zellen hingegen, befanden sich vitale ES-Zellkolonien (Abb. 3.16.A).

Für eine immunzytologische Färbung wurden ebenfalls transgene E14T Zellen ausgesät und mit TAT-Cre transduziert, aber bereits nach 48 Stunden fixiert. Die Immundetektion erfolgte mittels eines α -FLAG-tag Antikörpers, der spezifisch die kurze Peptidsequenz des FLAG-tags (DYKDDDDK) als Antigen erkennt. Zur Vereinfachung wird im weiteren Verlauf der Arbeit die Kennung „CIS/-Cre“ (*Cre-inducible-Sox2/-Cre*) für transgene E14T Zellen, die nicht mit TAT-Cre behandelt wurden und die Kennung „CIS/+Cre“ (*Cre-inducible-Sox2/+Cre*) für transgene E14T Zellen, die mit TAT-Cre behandelt wurden, verwendet werden. Die unbehandelten Zellen weisen keine spezifische Färbung für den FLAG-tag auf. Wohingegen bei den TAT-Cre behandelten Zellen eine homogene und spezifische Immunfärbung auftritt (Abb. 3.16.B). In der Überlagerung mit der korrespondierenden DAPI-Färbung ist eine Kolo-kalisierung erkennbar, die auf eine kernständige Lokalisation des transgenen Sox2 Transkriptionsfaktors schließen lässt. Des Weiteren wurde Proteinlysate aus transgenen Zellen vor (CIS/-Cre) und nach Cre-Transduktion (CIS/+Cre) gewonnen. Proteinlysate wildtypischer E14T Zellen diente als zusätzliche Kontrolle. Die Proteinlysate der Zellen wurden für eine Western Blot-Analyse mittels α -Sox2 spezifischen Antikörper verwendet (Abb. 3.16.C). Zur Analyse wurden auch zwei unterschiedlich lange Zeitpunkte nach TAT-Cre Inkubation ausgewählt. Der erste Zeitpunkt wurde bei 24 Stunden nach TAT-Cre Inkubation gewählt und der zweite nach 3 Tagen. Das transgene Sox2 (tgSox2) lässt sich aufgrund seines veränderten Laufverhaltens vom endogenen Sox2 (endoSox2) unterscheiden. Das tgSox2 läuft, aufgrund der Peptidsequenz des FLAG-tags langsamer durch die SDS-PAGE und wird deswegen von einem α -Sox2-Antikörper, als zusätzliche Bande oberhalb des endoSox2 detektiert. Diese zusätzliche Bande ist nur bei TAT-Cre behandelten Zellen, die zwei Tage mit Puromycin selektioniert wurden, zu erkennen (Abb. 3.16.C).

3.2.2.3 Nachweis der biologischen Funktionalität von transgenem Sox2

Im vorhergehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Cre-induzierbare Expressionskassette BO1-Sox2-IP zur effizienten Überexpression verwendet werden kann (Abb. 3.16). Allerdings lassen diese Untersuchungen keine Aussage über die biologische Aktivität des Transgens zu. Diese Frage sollte in einem Kompensationsexperiment adressiert werden.

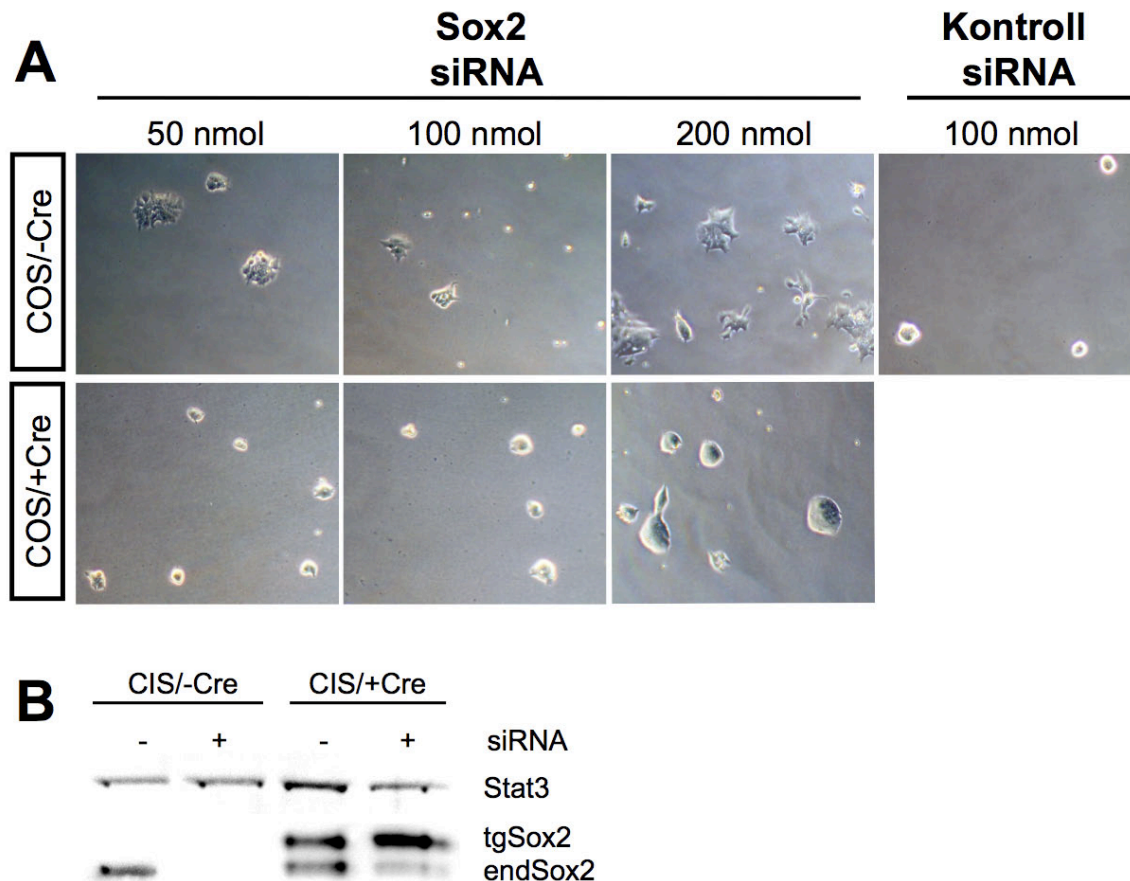


Abb. 3.17: Nachweis der Kompensation eines Sox2 knockdown durch Cre-induzierte Überexpression. (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen von CIS/+Cre und CIS/-Cre ES-Zellen, 60 Stunden nach der Transfektion mit siRNA gegen endogenes Sox2. Der ES-Zell Phänotyp konnte bei Zellen bewahrt werden, die transgenes Sox2 (tgSox2) exprimieren. Bei den CIS/-Cre Zellen wurden morphologische Veränderungen (Differenzierung) induziert. Bei CIS/-Cre Zellen, die mit einer Kontroll siRNA (*Allstar Negative Control*, Qiagen) transfiziert wurden, wurde keine morphologische Veränderung beobachtet. (B) Western Blot-Analyse der Proteinlysate von ES-Zellen, die entweder unbehandelt blieben oder mit [200 nmol] siRNA transfiziert wurden. Zur Detektion des Immunoblots wurde ein α -sox2-Antikörper eingesetzt. Die endSox2 spezifische Bande konnte in den mit siRNA transfizierten CIS/-Cre Zellen fast nicht mehr detektiert werden und war in den transfizierten CIS/+Cre Zellen stark reduziert. Die Verwendung des α -Stat3-Antikörpers diente als Ladekontrolle. Abkürzungen: endSox2: endogenes Sox2; tgSox2: transgenes Sox2

Falls das transgene Fusionsprotein FLAG-Sox2 biologisch aktiv wäre, sollte die Überexpression des Transgens den RNAi induzierten Phänotyp der Zellen kompensieren. Der endogene Funktionsverlust von Sox2 in murinen ES-Zellen sollte durch das Transfizieren

einer siRNA (*short interfering RNA*), die gegen den untranslatierten Bereich (UTR) des endogenen Sox2-Transkripts gerichtet ist, herbeigeführt werden. Für die Durchführung des Versuchs wurden zum einen transgene ES-Zellen (CIS/+Cre), deren konditionale Expressionskassette bereits durch Cre-vermittelte Rekombination aktiviert war und transgenes Sox2 unter Kontrolle des CAG-Promotors exprimierten und zum anderen nicht-induzierte ES-Zellen (CIS/-Cre) als Kontrollzellen verwendet. Die synthetische Sox2 siRNA wurde in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (Abb. 3.17.A). Die Sequenz der siRNA ist bereits als funktional beschrieben worden (Bosnali und Edenhofer, 2008). Als weitere Kontrolle wurden CIS/-Cre Zellen mit einer siRNA Sequenz (siKontrolle) transfiziert (Abb. 3.17.A). Die siRNA Sequenz *Allstar Negative Control* ist vom Hersteller (Quiagen) verifiziert, keinen Effekt zu induzieren. Die mit Sox2 siRNA (siSox2) transfizierten CIS/+Cre Zellen zeigten keine morphologische Veränderung im Vergleich zu den mit Kontroll siRNA (siKontrolle) transfizierten Zellen. Der ES-Zell ähnliche Phänotyp wurde bis zu 60 Stunden nach siSox2 Transfektion bewahrt (Abb. 3.17.A). Bei den mit siSox2 transfizierten CIS/-Cre Zellen wurde hingegen eine morphologische Veränderungen (Differenzierung) beobachtet. Bei CIS/-Cre Zellen, die mit siKontrolle transfiziert worden waren, war keine morphologische Veränderung ersichtlich. Zur Validierung des *knockdowns* auf Proteinebene wurde ein Western Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 3.17.B), für diese wurden die ES-Zellen direkt nach dem Überführen mit 200 nmol siRNA transfiziert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. 60 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mittels Immunoblot analysiert. Neben einem α -Sox2-spezifischen wurde ein α -Stat3-Antikörper (Ladekontrolle) verwendet. Zur Ermittlung der Expressionsstärke von endogenem und transgenem Sox2 wurde der α -Sox2-AK eingesetzt. In den siSox2 transfizierten CIS/-Cre Zellen zeigte sich ein fast vollständiger *knockdown* von endogenem Sox2 Protein (Abb. 3.17.B). Auch in den CIS/+Cre Zellen war ein siRNA-induzierte *knockdown* von endogenem Sox2 Protein zu beobachten. Allerdings wurde das endogene Sox2 Protein im Western Blot noch immundetektiert. Die Expression des transgenem Sox2-Proteins wurde durch die siSox2 Transfektion nicht herunterreguliert. Ein gegenteiliger Effekt stellte sich ein, Sox2 lag in deutlich erhöhter Konzentration vor (Abb. 3.17.B).

3.2.2.4 In ES-Zellen induziert eine Cre-vermittelte Sox2 Überexpression Apoptose

Mitsui und Kollegen beschrieben, dass die transgene Expression von Sox2 in ES-Zellen der Maus massiven Zelltod auslöst. Um die cDNA des Transkriptionsfaktors Sox2 in das Genom der ES-Zellen einzubringen, verwendeten die Autoren ein Supertransfektionssystem (Aubert et al., 2002; Niwa et al., 2002). Die Expressionsstärke des Transgens wurde in der Studie nicht näher bestimmt. Auf Grundlage der beschriebenen Beobachtung von Mitsui et al. (2003) und dem relativ niedrigen Expressionsniveau von tgSox2, stellte sich die Frage, ob ES-Zellen, die ein hohes Expressionsniveau an tgSox2 aufweisen, selektiv absterben. Somit würden nur ES-Zellen mit einem moderaten Expressionsniveau an tgSox2 weiter kultiviert werden können. Sox2-überexprimierende ES-Zellen, die zunächst mehrere Tage mit Puromycin auf das Rekombinationsereignis selektioniert und danach passagiert wurden, verhielten sich morphologisch nicht anders als die WT oder CIS/-Cre Zellen. Falls Sox2 ab einer gewissen Expressionsstärke Apoptose induzieren würde, sollte dieser Effekt kurz nach der Cre-Induktion zu beobachten sein, bevor die Adaptation der Zellpopulation abgeschlossen wäre. Um dies näher zu untersuchen, wurden CIS ES-Zellen nach der Inkubation mit TAT-Cre auf Apoptose untersucht. Hierfür wurden die Zellen 72 Stunden nach TAT-Cre Applikation mit einem α -Caspase-3 spezifischen Antikörper gefärbt. Der α -Caspase-3 Antikörper detektiert das die proteolytisch gespaltene Caspase-3. Diese wird als aktivierte Caspase-3 bezeichnet und ist ein Mediator des programmierten Zelltod. Als positive Kontrolle dienten WT Zellen, die mit Camptothecin behandelt wurden, welches Apoptose induziert. Für das Experiment wurden enzymatisch vereinzelte ES-Zellen ausgesät und danach mit TAT-Cre inkubiert. Nach der Cre-Transduktion wurden die Zellen bis zum Fixieren in N2B27 Medium kultiviert. TAT-Cre behandelte WT Zellen dienten als Kontrolle. Die fixierten ES-Zellen wurden für eine Immunfluoreszenzfärbung mit α -Oct3/4-Antikörper und α -Caspase-3-Antikörper detektiert. Die Caspase-3-Färbung kolokalisierte mit fragmentierten Zellkernen in der DAPI-Färbung und Oct3/4 kolokalisierte mit intakten Zellkernen, die durch eine DAPI-Färbung sichtbar gemacht wurden (Abb. 3.18.B). Die Behandlung mit TAT-Cre induzierte in WT Zellen keine Apoptose. Das Antibiotikum Puromycin löste in vielen WT Zellen Apoptose aus. Camptothecin behandelte WT Zellen sind, wie erwartet, überwiegend positiv für den Apoptosemarker Caspase-3. Werden transgenen CIS/-Cre ES-Zellen mit TAT-Cre inkubiert, resultiert dies in einer deutlich erhöhten Anzahl an Caspase-3 positiven Zellen (Abb. 3.18.A).

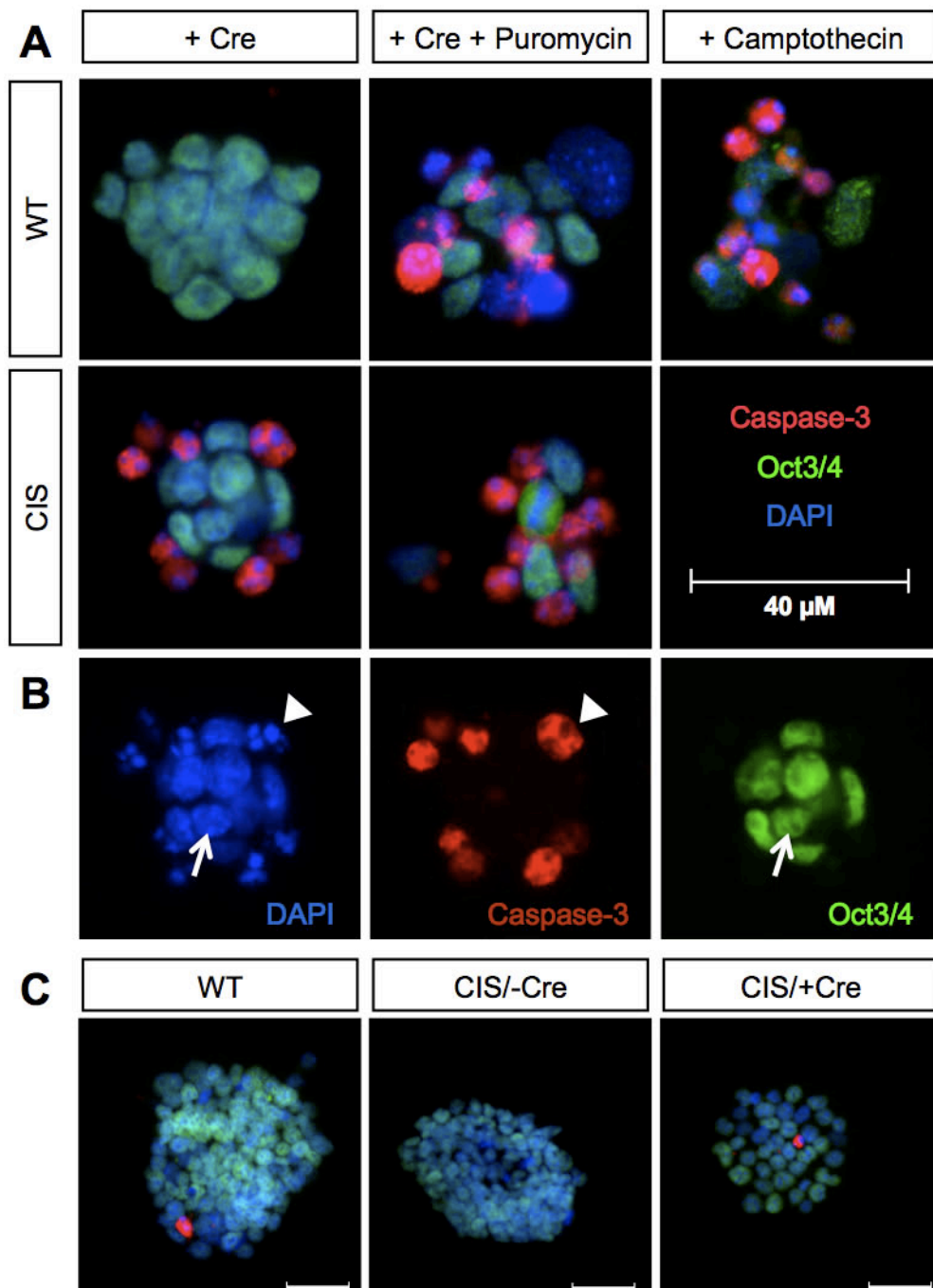


Abb. 3.18: Analyse der Cre-induzierten BO1-Sox2-IP ES-Zellen auf Apoptose. Eine Caspase-3 Immunfärbung diente dem Nachweis von apoptotischen Zellen. Oct3/4 wurde als Pluripotenzmarker mittels einem α -Oct3/4-spezifischen Antikörper nachgewiesen. (A) Fluoreszenzaufnahmen von BO1-Sox2-IP ES-Zellen und WT ES-Zellen, die entweder nur mit 1 μ M TAT-Cre oder die zusätzlich für 48 Stunden mit [1 μ g/ml] Puromycin inkubiert wurden. WT ES-Zellen kultiviert in Anwesenheit des Apoptose-Induktors Camptothecin, dienen als positive Kontrolle. (B) Fluoreszenzaufnahmen der einzelnen Kanäle der Cre-induzierten BO1-Sox2-IP ES-Zellen aus A. Die Pfeilspitzen weisen auf eine Zelle mit fragmentierten Zellkern (DAPI), die Caspase-3-positiv ist und die Pfeile zeigen auf eine Zelle mit intaktem Zellkern (DAPI), die Oct-3/4-positiv ist. (C) Stabile transgene CIS/-Cre und CIS/+Cre Zellen, die seit 5 Passagen in Anwesenheit von Puromycin kultiviert wurde. Die Zellen wurden 4 Tage nach Aussaat fixiert und mit α -Caspase-3- und α -Oct3/4-Ak detektiert. WT Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Ein Unterschied in der Anzahl an apoptotischen Zellen ist nicht erkennbar. Skalierung 40 μ m.

Eine Quantifizierung der Caspase-3 Färbungen ergab, dass $\geq 95\%$ der Kolonien von den TAT-Cre behandelten CIS ES-Zellen Caspase-3 positive Zellen aufweisen. Im Gegensatz dazu haben weniger als 25% der TAT-Cre behandelten WT ES-Zellkolonien Caspase-3 positive Zellen. Es waren nicht nur weniger WT Kolonien Caspase-3 positiv, sondern darüber hinaus war auch der Prozentsatz an Caspase-3 positiven ES-Zellen innerhalb einer Kolonie geringerer (5-10%). Im Gegensatz dazu waren 34-65% der CIS ES-Zellen einer Kolonie Caspase-3 positiv. Bei CIS/+Cre ES-Zellen, die bereits für 5 Passagen kultiviert wurden, ergibt sich in der Immunfärbung gegen Caspase-3 ein konträres Bild (Abb. 3.18.C). Diese CIS/+Cre Zellen weisen im Vergleich zu CIS/-Cre und WT Zellen keine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen auf.

Diese Untersuchungen zeigen, dass eine Cre-vermittelte Sox2-Überexpression initial in sechsmal mehr Zellen Apoptose induziert als in Kontrollzellen. Allerdings weisen die Sox2-überexprimierenden Zellen in späteren Passagen keine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen mehr auf.

	Caspase-3-positive ES-Kolonien	Caspase-3-positive ES-Zellen pro Kolonie
WT ES-Zellen + TAT-Cre	$\leq 25\%$	5-10%
BOI-Sox2-IP + TAT-Cre	$\geq 95\%$	34-65%

Tab. 3.3: Auswertung der Caspase-3 Immunfärbung von TAT-Cre behandelten WT und BOI-Sox2-IP ES-Zellen

3.2.2.1 Entzug der extrinsischen Pluripotenzhaltungsfaktoren LIF und BMP4

Zur Untersuchung der spontanen Differenzierung von murinen ES Zellen wurden die beiden extrinsischen Pluripotenzhaltungsfaktoren LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) und BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein*) dem Minimalmedium N2B27 entzogen. Die kombinatorische Gabe des Zytokins (LIF) und des Morphogens (BMP4) sind essentiell, um den embryonalen Stammzellcharakter von murinen ES-Zellen aufrecht zu erhalten (Ying et al., 2003). Für die Durchführung der Analyse wurden vereinzelte CIS/-Cre und CIS/+Cre ES-Zellen in N2B27 Medium ohne die Faktoren LIF und BMP4 auf Gelatine-beschichtete Zellkulturschalen ausgesät. Nach drei Tagen wurden die Zellen erneut enzymatisch vereinzelte und auf eine neue Zellkulturschale transferiert. Nach weiteren vier Tagen wurden die Zellen morphologisch analysiert (Abb. 3.19.B) und anschließend für eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem α -

Oct3/4-Antikörper verwendet (Abb. 3.19.B). Auffällig ist, dass die CIS/-Cre Zellen weniger kompakte, dreidimensionale Zellhaufen bildeten und sich auf dem Zellschalenboden großflächig ausbreiteten. Die CIS/+Cre Zellen bildeten weiterhin Kolonie-artige Zellhaufen (Abb. 3.19.A). Eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper spezifisch gegen den Pluripotenzmarker Oct3/4 zeigte, dass die CIS/-Cre Zellen Oct3/4 negativ waren. Im Gegensatz dazu zeigten die kompakten Zellhaufen der CIS/+Cre Zellen eine nachweisbare Oct3/4 Expression (Abb. 3.19.B). Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern spezifisch gegen die neuronalen Marker Nestin und Pax6 ergaben keine detektierbare Fluoreszenzsignal (Daten nicht gezeigt).

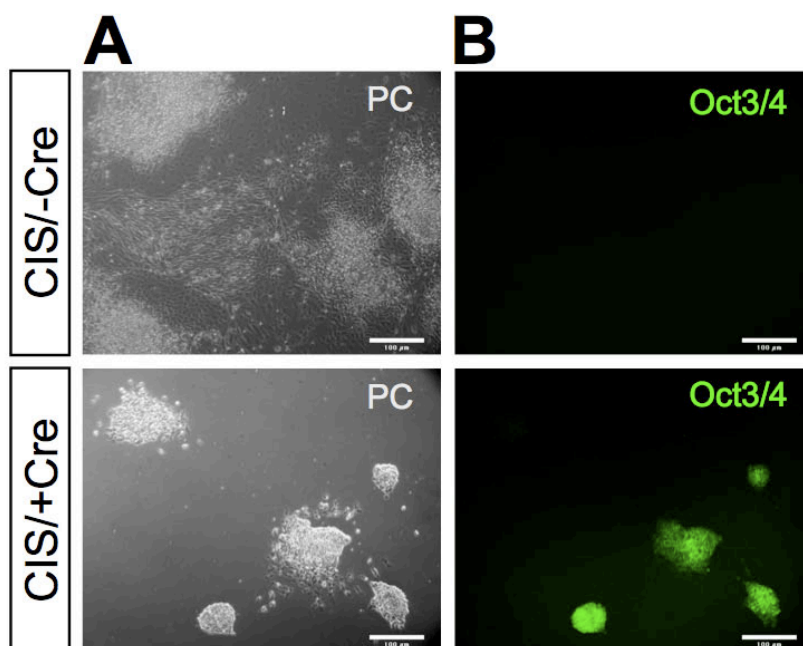


Abb. 3.19: Kultivierung von BO1-Sox2-IP ES-Zellen unter Entzug von LIF und BMP4. CIS/-Cre und CIS/+Cre Zellen wurden vereinzelt und in N2B27 Medium ohne die Faktoren LIF und BMP4 ausgesät. Nach drei Tagen wurden die Zellen erneut vereinzelt und auf eine neue Gelatine-beschichtete Zellschale passagiert auf der sie nach weiteren 4 Tagen fixiert und anschließend immunzytochemisch analysiert wurden. CIS/+Cre Zellen bilden im Gegensatz zu CIS/-Cre Zellen dreidimensionale kompakte Zellhaufen (A), die darüber hinaus noch positiv für den Pluripotenzmarker Oct3/4 sind (B). Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 100 µm.

3.2.2.2 Einfluss der ektopischen Sox2 Expression auf das spontane Differenzierungsverhalten von murinen ES-Zellen

Die stabile ektopische Sox2 Expression zeigte in der proliferativen Phase von ES-Zellen langfristig (>30 Passagen) keinen Einfluss auf deren Morphologie und deren Phänotyp unterschied sich nicht von wiltypischen ES-Zellen. Aber wie wirkt sich eine stabile ektopische Sox2 Expression auf das spontane Differenzierungsverhalten aus? Über den

Transkriptionsfaktor Sox2 ist bekannt, dass er eine entscheidende Rolle in der Initiation und Progression der neuroektodermalen Differenzierung hat (Avilion et al., 2003; Collignon et al., 1996; Wood et al., 1999). Um den Einfluss der Sox2-Überexpression in der spontanen Differenzierung zu untersuchen, sollte zunächst geklärt werden, ob die Transgenexpression während der Differenzierung und der damit verbundenen Neuorganisation des Epigenoms, aufrechterhalten bleibt oder ob ein *silencing* des Transgens eintritt.

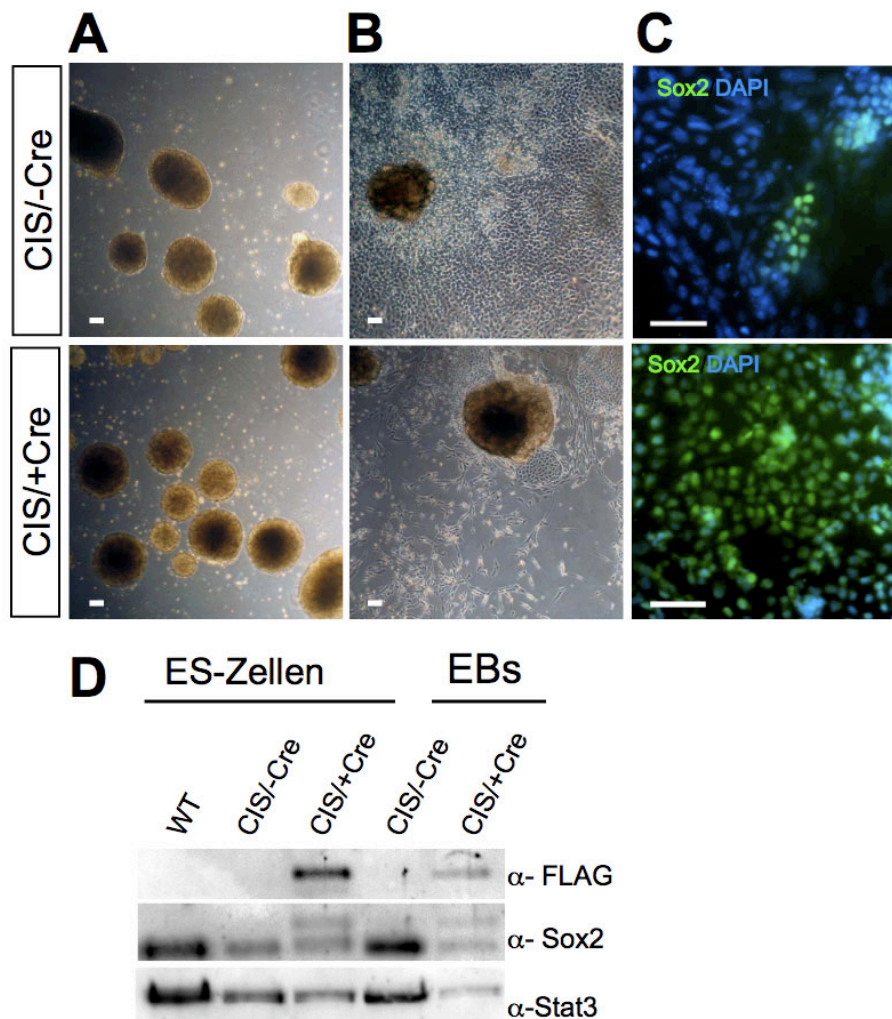


Abb. 3.20: Spontane Differenzierung von CIS ES-Zellen über *embryoid bodies* (EBs) in einer Serumfreien Suspensionskultur. (A) 4 Tage alte murine Suspensionsaggregate. (B) EBs 7 Tage nach dem Ausplattieren auf Gelatine-beschichtete Schalen. (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer α -Sox2-Antikörperfärbung in plattierten EBs. In allen CIS/+Cre Zellen wurde eine Sox2 Expression beobachtet. Skalierung 25 μ m. (D) Western Blot-Analyse von Proteinlysaten aus ES-Zellen und EBs. Der Immunoblot wurde mit α -Sox2-, α -FLAG- und α -Stat3-Antikörper detektiert. CIS/+Cre EBs zeigen dasselbe Bandenmuster wie CIS/+Cre ES-Zellen, dies spricht dafür, dass das transgene Sox2 auch während der spontanen Differenzierung exprimiert wird.

Für eine kontrollierte und definierte Kulturbedingung wurden die Differenzierungen in serumfreiem N2B27 Medium (Ying et al., 2003) ausgeführt. Die spontane Differenzierung wurde über den Entzug von LIF sowie BMP4 und der Bildung von Embryoid-Körperchen (*embryoid bodies*, EBs) eingeleitet. Bereits in diesen Aggregaten werden Zellen der drei

Keimblätter ausgebildet (Brüstle et al., 1997; Keller et al. 1993; Desbaillets et al., 2000). Nach 5 Tagen in Suspensionskultur wurden die Aggregate auf Gelatine-beschichtete Zellkulturschalen überführt und nach 7 Tagen wurden von den plattierten EBs mikroskopische Aufnahmen gemacht (Abb. 3.20.B). Während des Zeitraums von 7 Tagen wurde beobachtet, dass weniger Zellen aus den Cre-induzierten Sox2-überexprimierenden EBs herauswanderten und sich die Zellen langsamer auf der Zellkulturschale ausbreiteten als es bei den CIS/-Cre Zellen der Fall war. Die CIS/+Cre EBs nahmen ein größeres Volumen ein, dafür besiedelten weniger adhärente Zellen den Zellschalenboden. Die Größe und Form der plattierten EBs deuten auf eine anhaltende proliferative Aktivität der Sox2-überexprimierenden Zellen hin. Allerdings haben die Sox2-überexprimierenden Zellen eine verminderte Neigung aus dem Zellverband zu migrieren und adhärent auf dem Schalenboden zu wachsen. Zur Analyse der Transgenexpression wurden plattierte EBs nach 7 Tagen fixiert und mit einem α -Sox2-Antikörper immungefärbt. Bei den CIS/-Cre Zellen sind einzelne Areale mit meist kompakter angeordneten Zellen Sox2 positiv. Bei den CIS/+Cre Zellen ist eine homogene Sox2 Expression zu erkennen (Abb. 3.20.C). Für eine Western Blot-Analyse wurde Proteinlysate von WT und transgenen ES-Zellen als auch von transgenen EBs mittels α -Sox2-, α -FLAG- und α -Stat3-Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde der α -Stat3-Antikörper eingesetzt. Der α -FLAG-Antikörper erkennt spezifisch das FLAG-tag markiert transgene Sox2 in den CIS/+Cre ES-Zellen und EBs (Abb. 3.20.D). Der α -Sox2-Ak erkennt, wie bei den vorhergehenden Versuchen beschrieben endogenes als auch transgenes Sox2, was in einer Doppelbande bei CIS/+Cre Zellen resultiert. Die Western Blot-Analyse zeigt, dass das transgene Sox2 stabil in ES-Zellen sowie in deren differenzierter Derivaten exprimiert wird (Abb. 3.20.D).

3.3 Funktionale Analyse von SOX2 in humanen ES-Zellen

3.3.1 *Gain-of-function* Studie mittels Cre-induzierbarer Überexpression von SOX2

3.3.1.1 Validierung einer Cre-induzierbaren SOX2-Überexpression

Für die vorliegende Dissertation war die Funktionalitätsstudie von SOX2 in humanen ES-Zellen von besonderem Interesse. Zu Beginn der Arbeiten lagen noch keine Daten genetischer *loss-of-function* oder *gain-of-function* Studien über die Rolle des humanen Transkriptionsfaktors SOX2 in ES-Zellen vor. Nachdem in Vortests gezeigt werden konnte, dass das induzierbare Sox2-Transgen in murinen ES-Zellen biologisch-funktional ist und auch

während der Differenzierung exprimiert bleibt, sollte eine analoge transgene humane ES-Zelllinie hergestellt werden. Hierfür wurde dieselbe Expressionskassette, wie bei der Herstellung der murinen ES-Zelllinie verwendet. Mit der in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Klonierungsstrategie wurde die cDNA des humanen Transkriptionsfaktors SOX2 in die Expressionskassette des pBO1-IP Vektors eingefügt. Als Zielzellen wurden humane H9.2 ES-Zellen (Amit et al., 2000) verwendet. Die pBO1-SOX2-IP Plasmid-DNA wurde linearisiert und durch Elektroporation in H9.2 Zellen eingebracht.

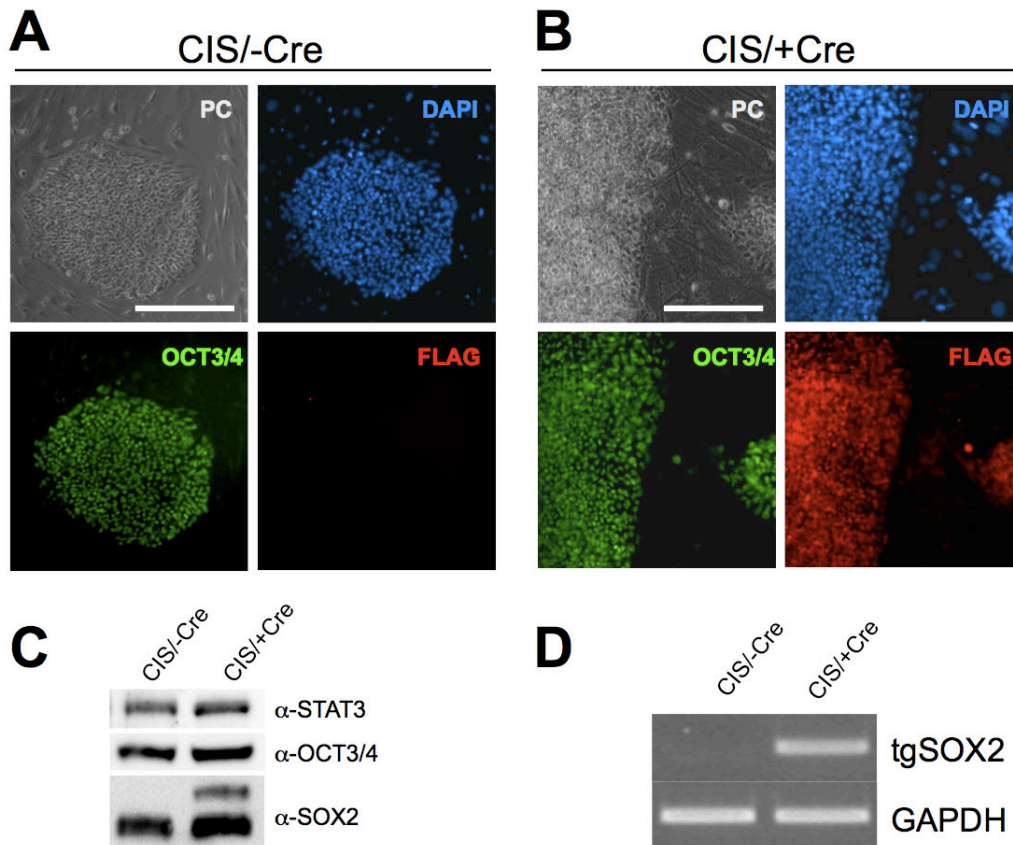


Abb. 3.21: Analyse der SOX2-Überexpression in humanen ES-Zellen. (A) Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen von unbehandelten CIS/-Cre Zellen und in (B) Aufnahmen von TAT-Cre behandelten CIS/+Cre Zellen. CIS/-Cre und CIS/+Cre wurden mit α -FLAG- und α -OCT3/4-Antikörper immunodetektiert. Der spezifische α -FLAG-Antikörper erkennt das transgene FLAG-tag markierte SOX2-Protein. Die Oct3/4-Färbung diente als Marker pluripotenter Zellen. Nur in CIS/+Cre Zellen ist eine Immunfärbung mit dem α -FLAG-Ak erkennbar. Skalierung 100 μ M. (C) Western Blot-Analyse von Proteinlysaten humaner ES-Zellen. Zur Analyse wurde ein α -OCT3/4-Antikörper und ein α -Sox2-Antikörper verwendet. Die Bande des transgenen SOX2s wird erst nach TAT-Cre Behandlung und einer anschließenden Puromycin Selektion nachweisbar. Zur Ladekontrolle wurde ein α -Stat3-Ak eingesetzt. (D) RT-PCR-Analyse der Transgenexpression von SOX2 in CIS/-Cre und CIS/+Cre Zellen.

Die transfizierten humanen ES-Zellen wurden auf Neomycin-resistente Feederzellen ausgesät und mit G418 auf das Neomycinresistenzgen selektioniert, bis die wildtypischen Kontrollzellen abgestorben waren. Erst dann wurden die transfizierten ES-Zellen erneut passagiert und als polyklonale Zelllinie weitergeführt. Zur Analyse der konditionalen

Expressions-kassette wurden transgene ES-Zellen in einer Einzelzellsuspension ausgesät. Nach 18-24 Stunden wurden die humanen ES-Zellen für 6 Stunden mit 6 μ M TAT-Cre inkubiert. Nach einem weiteren Tag wurde die Selektion mit Puromycin begonnen. TAT-Cre behandelte und unbehandelte ES-Zellen wurden auf eine transgene Expression von SOX2 untersucht. Zur Vereinfachung wird bis auf weiteres die Kennung „CIS/-Cre“ für transgene H9.2 Zellen, die nicht mit TAT-Cre behandelt und die Kennung „CIS/+Cre“ für transgene H9.2 Zellen, die mit TAT-Cre behandelt wurden, im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet werden. Die transgene SOX2-Expression wurde mittels eines α -FLAG-Antikörpers überprüft (Abb. 3.21.A-B). Wie erwartet ließ sich eine α -FLAG-spezifische Immunfärbung nur bei CIS/+Cre Zellen nachweisen. Frühe neurale Marker wie PAX6 und NESTIN werden in CIS/+Cre ES-Zellen nicht exprimiert (Daten der Immunfärbung nicht gezeigt). Ein α -Oct3/4-Antikörper diente der Identifizierung von humanen ES-Zellen und zur Diskriminierung dieser von den Feederzellen. Für einen Western Blot wurde Proteinlysate aus CIS/-Cre und CIS/+Cre ES-Zellen gewonnen. Proteinlysate wildtypischer H9.2 Zellen diente als Kontrolle. Zur Immundetektion wurde ein α -Sox2 und der für die Immunofärbung bereits eingesetzte α -Oct3/4 spezifischer Antikörper verwendet (Abb. 3.21.C). Auch das humane SOX2-Transgen lässt sich vom endogenen Sox2 durch dessen verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE unterscheiden. Aufgrund des FLAG-tags weist das transgene SOX2 Protein eine höhere Molmasse auf, die es langsamer als das endogene SOX2 durch die SDS-PAGE wandern lässt. Aus diesem Grund wird es von einem α -Sox2-Antikörper, als zusätzliche Bande oberhalb des endogenen SOX2 detektiert. Diese zusätzliche Bande ist nur bei TAT-Cre behandelten Zellen zu erkennen (Abb. 3.21.C). Als weiterer Nachweis für eine Cre-kontrollierbare Transgenexpression wurde eine RT-PCR-Analyse mittels Transgen-spezifischer Primer durchgeführt (Abb. 3.21.D). Ausschließlich nach Cre-vermittelter Induktion ließ sich das SOX2-spezifische PCR-Produkt in CIS/+Cre ES-Zellen nachweisen.

3.3.1.2 Entzug des extrinsischen Pluripotenzerhaltungsfaktors FGF-2 in humanen Cre-Induzierbaren-SOX2 ES-Zellen

SOX2-überexprimierende Zellen unterscheiden sich morphologisch nicht wesentlich von wildtypischen H9.2 Zellen. Allerdings konnte unter den Zellkulturbedingungen für humane ES-Zellen der Eindruck gewonnen werden, dass CIS/+Cre Zellen kompaktere Kolonien mit weniger ausgefransten Randbereichen bildeten (Abb. 3.22.A). Um eine verstärkte Pluripotenzerhaltung zu analysieren, wurden CIS/+Cre Zellen auf Matrigel™ beschichtete

Schalen transferiert und in hES-Zellmedium ohne bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*) kultiviert (Abb. 3.22.B). Der Zusatz von bFGF im Medium ist zum Pluripotenzerhalt von humanen ES-Zellen notwendig (Levenstein et al., 2006; Wang G et al., 2005; Xu Ren-He et al., 2008). Im Jahr 2006 berichteten Darr und Kollegen, dass eine ektopische Expression von NANOG eine bFGF- und Feederzell-unabhängige Proliferation und Pluripotenzerhaltung ermöglicht. Dies ist bei der Cre-induzierten SOX2-Expression nicht der Fall, CIS/+Cre Zellen konnten den Verlust an bFGF und Feederzellen nicht kompensieren und starben ab (Abb. 3.22.C).

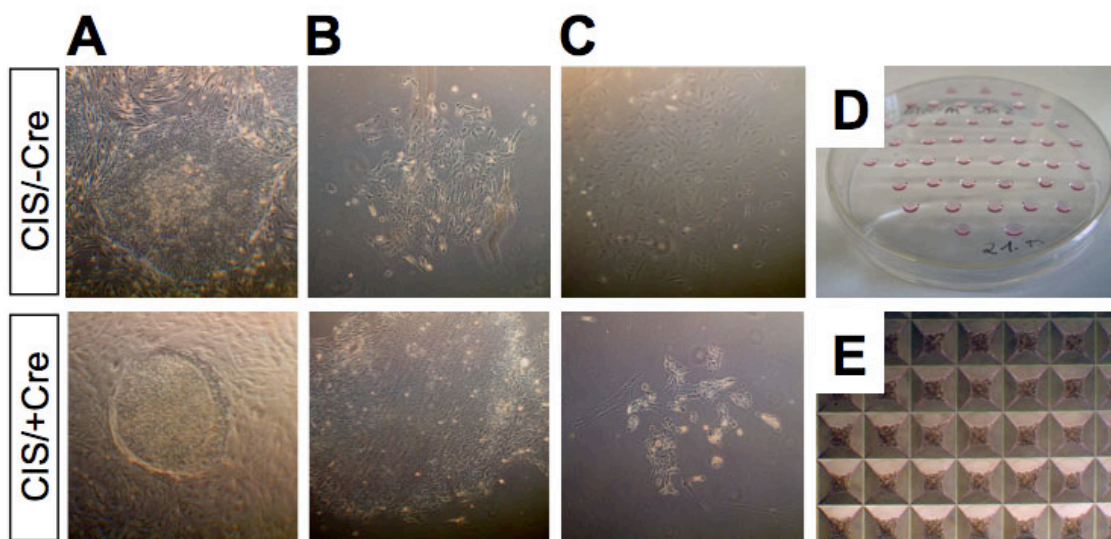


Abb. 3.22: SOX2-überexprimierende ES-Zellen in verschiedenen Kulturbedingungen. (A) CIS/-Cre Zellen der Passage p15 und CIS/+Cre Zellen der Passage p11 plus 4 Passagen nach TAT-Cre Inkubation mit Feederzellen und bFGF. (B-C) CIS/-Cre Zellen der p16 und CIS/+Cre Zellen der p11+5. In (B) auf Matrigel in Konditionierten Medium und in (C) Zellen derselben Passage kultiviert in hES-Medium ohne bFGF. (D) *Hanging drops* in einer 10 cm Zellkulturschale. (E) Mikroskopische Aufnahme von hES Zellen in einem AggreWell nach dem Zentrifugationsschritt

3.3.1.3 Einfluss der ektopische SOX2 Expression auf die spontane Differenzierung von humanen ES-Zellen

Zur Eigenschaft einer *bona fide* embryonalen Stammzelle zählt das Potential, in alle drei Keimblätter (Endo-, Meso- und Ektoderm) differenzieren zu können. Dieses Kriterium sollte in einem spontanen Differenzierungsansatz überprüft werden. Wie würde sich eine stabile, ektopische Sox2 Expression auf das Differenzierungspotential auswirken?

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Größe eines *embryoid body* und die Position einer Zelle in diesem die entwicklungsbiologische Zelldetermination beeinflussen (ten Berge et al., 2008). Zur Reduzierung der Inter- und Intravariabilität der Versuche sollte deswegen eine

uniforme und reproduzierbare Größe der Zellaggregate eingestellt werden. Zur Umsetzung wurden für die initiale Ausbildung der Aggregate 1000 Zellen pro Vertiefung eines AggreWells (Stem Cell Technology) oder 1000 Zellen pro hängenden Tropfen (*hanging drop*) verwendet (Abb. 3.22.D-E).

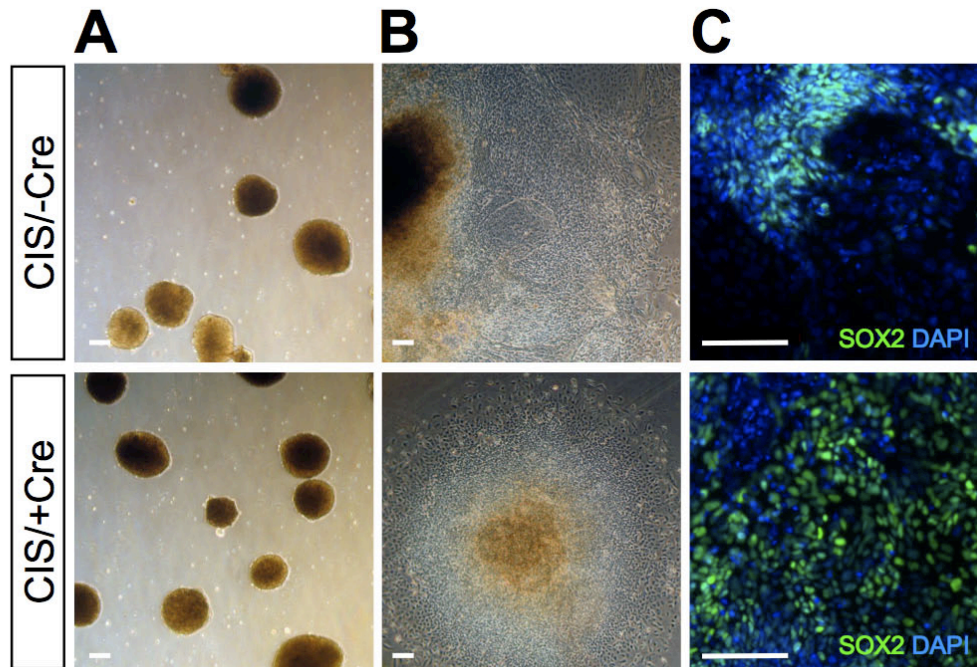


Abb. 3.23: Spontane Differenzierung von humanen BO1-SOX2-IP ES-Zellen über die Bildung von Aggregaten in einer serumfreien Suspensionskultur. (A) 4 Tage alte in Suspension gehaltene Zellaggregate (EBs). (B) EBs 4 Tage nach dem Ausplattieren auf Gelatine-beschichtete Schalen. (C) Die plattierten EBs aus B wurden mit einem α -Sox2-Antikörper immungefärbt. In der CIS/+Cre Zellschale ist eine homogene Sox2 Expression zu beobachten, in der CIS/-Cre Zellkulturschale sind hingegen nur einzelne Areale angefärbt. Skalierung 100 μ m.

Die Aggregate aus den AggreWells waren für die Analyse besser geeignet, da sie stabiler waren und nicht wie die *hanging drops* nach dem Überführen in Suspension in Einzelzellen zerfielen. Nachdem die vereinzelt humanen ES-Zellen in die AggreWells überführt worden waren, wurde dem Medium ab diesem Zeitpunkt kein bFGF mehr zugesetzt. Wie bei murinen ES-Zellen bilden sich bereits in diesen Embryoid-Körperchen die drei Keimblätter aus (Itskovitz-Eldor et al., 2000). Nach 5 Tagen in Suspensionskultur wurden die Aggregate auf Gelatine-beschichtete Zellkulturschalen überführt. Nach 4 Tagen wurden mikroskopische Aufnahmen der plattierten EBs gemacht (Abb. 3.23.B). Dabei wurde beobachtet, dass CIS/+Cre Zellen etwas langsamer aus dem EB herauswuchsen und unter morphologischen Gesichtspunkten eine homogenere Zellpopulation bildeten (Abb. 3.23.B). Die Immunfärbung mit einem α -Sox2-Ak, der sowohl endogenes als auch transgenes SOX2 erkennt, ergab das gleiche Bild wie bei den murinen ES-Zellen. Die CIS/+Cre Zellpopulation wies eine

homogene SOX2 Expression auf (Abb. 3.23.C). Bei der CIS/-Cre Zellpopulation hingegen wurden nur SOX2-positive Zellareale detektiert.

Zur Analyse des Einfluss der SOX2-Überexpression auf ES-Zell-spezifische und Differenzierungs-spezifische Markergene wurden deren Genexpressionsstärke mittels quantitativen-real-time-PCR (qRT-PCR) bestimmt. Die Analyse der Markerexpression sollte den Differenzierungsstatus der Zellen beleuchten. Die RNA für die qRT-PCR-Analyse wurde aus Feeder-freien humanen ES-Zellkulturen und aus EBs, die 6 Tage zuvor plattiert worden waren, präpariert. Die Differenz der Expressionsstärke von Cre-induzierten Zellen zu nicht-induzierten Zellen wurde in einem Diagramm dargestellt (Abb. 3.24).

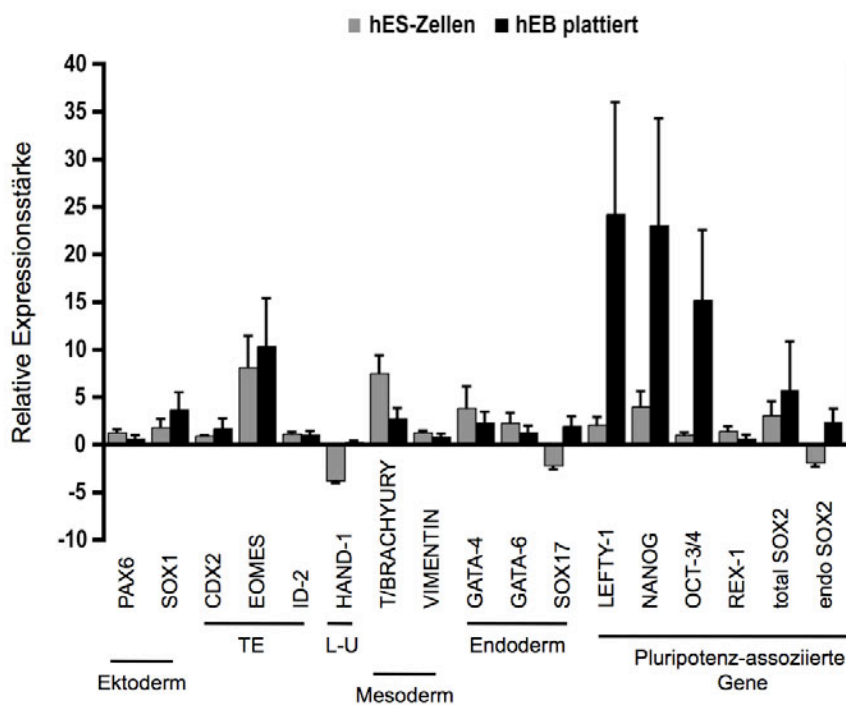


Abb. 3.24: Expressionsanalyse von Pluripotenzen- und Differenzierungs-assoziierten Markern in SOX2-überexprimierenden Zellen. Die cDNA für die qRT-PCR-Analyse wurde aus RNA von CIS/+Cre ES-Zellen als auch von plattierten EBs präpariert. Die relative Expressionsstärke stellt das Verhältnis der ct-Werte von CIS/+Cre zu CIS/-Cre Zellen (=1,0) des jeweiligen Gens dar. Für die Auswertung wurden 3 unabhängige RNA-Proben jeweils im Triplikat analysiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Die Versuche wurden auf die Expression von GAPDH und 18S rRNA normiert. Graue Balken repräsentieren ES-Zellen und schwarze Balken EBs, die 6 Tage zuvor plattiert worden waren; TE: Trophektoderm; L-U: Linien-unspezifischer extraembryonaler Marke; ct: *cycle threshold*.

Die Cre-induzierte ektopische Expression von SOX2 in humanen ES-Zellen (Abb. 3.24; graue Balken) resultierte in der Hochregulation des trophektodermalen Markers EOMES (achtfach), des mesodermalen Markers BRACHYURY (siebenfach) und des Pluripotenzen-assoziierten Markers NANOG (vierfach). Wohingegen die Expression des endodermalen Markers SOX17

(zweifach) und des Linien-unspezifischen Markers HAND1 (vierfach) herunterreguliert wurde. Interessanterweise wurde das endogene SOX2 um die Hälfte reduziert. Allerdings resultierte die ektopische SOX2-Expression in einer dreifach erhöhten Gesamtexpression, bestehend aus transgenem und endogenem SOX2-Transkripten. In der qRT-PCR-Analyse führte die SOX2-Überexpression in der Differenzierung (Abb. 3.24; schwarze Balken) zur Hochregulation des ektodermalen Markers SOX1 (vierfach), des trophektodermalen Markers EOMES (zehnfach) und des mesodermalen Markers BRACHYURY (dreifach). Besonders auffällig ist die starke Hochregulation aller hier analysierter Pluripotenz-assoziiierter Marker, wie LEFTY (24-fach), NANOG (23-fach) und OCT-3/4 (15-fach) außer REX-1. Das endogene SOX2 liegt in den plattierten EBs im Gegensatz zu den ES-Zellen dreifach hochreguliert vor. Die Gesamtexpression von SOX2 war fünffach erhöht. Vergleicht man den Einfluss der SOX2-Expression in ES-Zellen mit dem in plattierten EBs, lässt sich in spontan-differenzierenden Zellen eine insgesamt höhere Abweichung vom normalisierten Expressionsniveau der Markergene erkennen.

Für eine Markeranalyse auf Proteinebene wurden die plattierten EBs mittels Immunfluoreszenzfärbungen auf die Expression der ektodermalen Marker TUJ1 (*β -III-Tubulin*), NESTIN (*Intermediärfilament Typ VI*) und PAX6 (*Paired Box 6*) sowie auf den endodermalen Marker AFP (*α -Fetoprotein*) und den mesodermalen Marker SMA (*Smooth Muscle Actin*) untersucht (Abb. 3.25). Die Immunfärbung der nicht-induzierten EBs spiegelt das volle Differenzierungspotential von ES Zellen wider (Abb. 3.25.A). Die CIS/-Cre EBs sind für alle untersuchten Marker positiv, das heißt sie weisen Zellen aus allen drei Keimblättern auf. Auch die SOX2-überexprimierenden Zellen sind für alle untersuchten Marker der drei Keimblätter positiv (Abb. 3.25.B). Auffällig ist allerdings eine in Bezug auf Intensität und Anzahl deutlich stärker ausgeprägte Expression des frühen neuralen Markers NESTIN. Im Gegensatz dazu ist der späte neurale Marker TUJ1 im Vergleich weniger ausgeprägt (Abb. 3.25.B). Darüber hinaus wurde bei SOX2-überexprimierenden Zellen eine auffällige morphologische Änderung beobachtet, alle PAX6-positive Zellen nehmen eine kreisförmige Anordnung um ein Lumen ein. Bei den Kontrollzellen nehmen PAX-6-positive Zellen weniger häufig diese strukturelle Anordnung an. Diese Anordnung ähnelt der in der Literatur als neurale Rosette beschriebenen Anordnung (Elkabetz et al., 2008; Koch et al., 2009; Perrier et al., 2004; Zhang et al., 2001). Neurale Rosetten werden auch als ein invertiertes *in vitro* Analogon zum Neuralrohr angesehen. Interessanterweise verhindert in CIS/+Cre Zellen die transgene SOX2 Expression (nukleäre Lokalisation) nicht die

Koexpression von AFP (zytoplasmatische Lokalisation) (Abb. 3.25.B). In CIS/-Cre Zellen werden AFP und SOX2 nicht koexprimiert (Abb. 3.25.A).

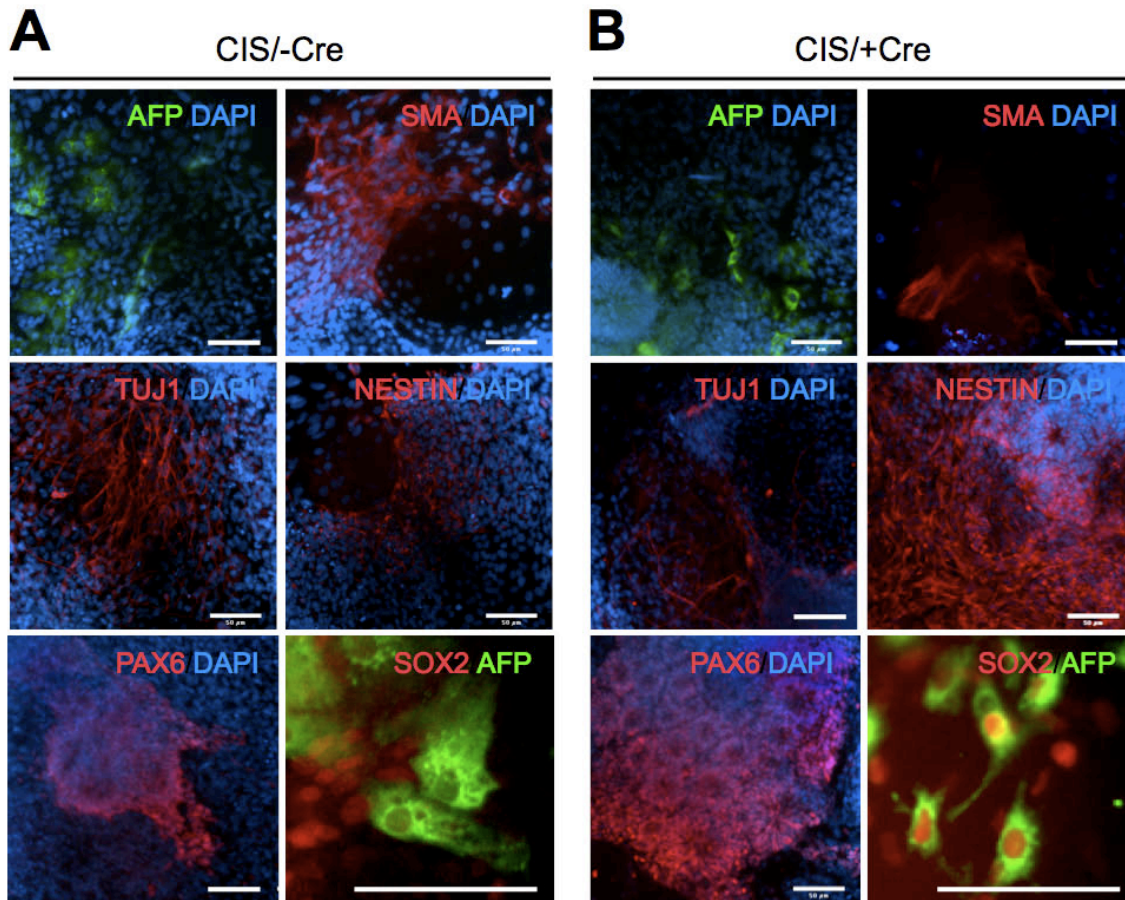


Abb. 3.25: Immunfärbung humaner SOX2-überexprimierender EBs vier Tage nach dem Plattieren. Um EBs einer reproduzierbaren und standardisierten Größe herzustellen, wurden jeweils 1000 vereinzelte humane ES Zellen in einem AggreWell™ aggregiert. (A-B) Die plattierten EBs wurden auf die Markerexpression der drei Keimblätter untersucht: als ektodermale Marker dienten TUJ1 (β -III-Tubulin), NESTIN, SOX2 und PAX6, als endodermaler Marker AFP (α -Fetoprotein) und als mesodermaler Marker diente SMA (*Smooth Muscle Actin*). Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 50 μ m.

Um die Progression der Differenzierung zu analysieren, wurden in einem weiteren Ansatz die plattierten EBs erst an Tag 9 statt an Tag 4 immundetektiert (Abb. 3.26.A). Die Zellen konnten dadurch über einen längeren Zeitraum differenzieren. Entwicklungsbiologisch betrachtet, würde man dadurch eine vermehrte Expression von späten Markern erwarten. TUJ1 ist ein neuronaler Marker, der in der Neurogenese erst nach einer erfolgten Expression von PAX6 exprimiert wird. PAX6 wird in der Literatur häufig als Marker für Neurale Stammzellen (NSZ) beschrieben (Chambers et al., 2009). CIS/-Cre Zellen hatten im Durchschnitt mehr als doppelt so lange TUJ1-positive Zellfortsätze (Abb. 3.26.B). Wohingegen die CIS/+Cre Zellen größere und kompaktere Zellhaufen mit mehr PAX6-

positiven neuronalen Rosetten aufweisen (Abb. 3.26.A). Diese Beobachtungen könnten für einen unreiferen Differenzierungsstatus der CIS/+Cre Zellen sprechen.

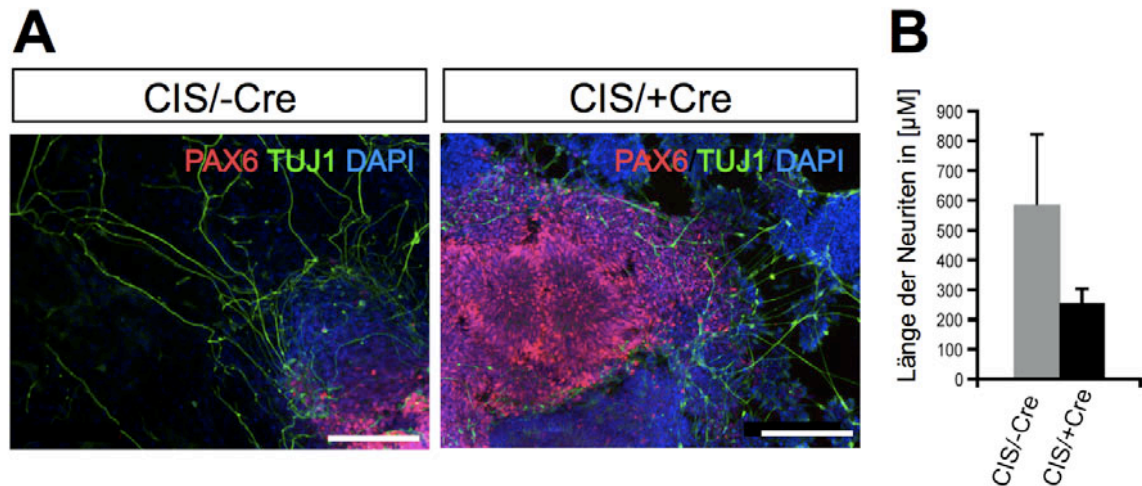


Abb. 3.26: Immunfluoreszenzfärbung humaner SOX2-überexprimierender EBs neun Tage nach dem Plattieren. (A) Spontan differenzierte CIS/-Cre und CIS/+Cre EBs wurden 9 Tage nachdem Plattieren mit einem α -TUJ1-Ak (pan-neuronaler Marker) und α -PAX6-Ak (Marker für neurale Stammzellen) immunodetektiert. Skalierung 200 μ m. (B) Die Auswuchslänge der Neuriten (n=50) wurde mit der Software *ImageJ* bestimmt.

3.3.1.4 Einfluss der ektopischen SOX2 Expression bei der direkten Konversion von humanen ES-Zellen in neurale Vorläuferzellen

Bisherige Protokolle zur neuronalen Induktion von humanen ES-Zellen beruhen entweder auf der Ausbildung von *embryoid bodies* mit nachfolgender Linienselektion (Okabe et al., 1996; Zhang et al., 2001) oder auf einer Kokultur mit Stromazellen (Kawasaki et al., 2000; Lee et al., 2007). Die Nachteile der aufgeführten Protokolle sind, einerseits die heterogene Erscheinungsform der EB Differenzierung, sowie die geringe Ausbeute bei der Linienselektion und andererseits die undefinierten Faktoren einer Kozellkultur. Eine kürzlich erschienene Publikation aus der Arbeitsgruppe um Lorenz Studer beschrieb ein Protokoll zur Umgehung dieser Limitationen (Chambers et al., 2009). Hierbei findet eine direkte Konversion von adhärennten humanen ES-Zellen in neurale Vorläuferzellen durch die gezielte Inhibition des TGF- β /SMAD Signalwegs statt. Für die kombinierte Blockade des SMAD Signalweges werden hierfür der BMP (*bone morphogene protein*)-Inhibitor Noggin (Smith und Harland, 1992) und das Pharmakon SB431542 (Smith et al., 2008) verwendet. Dadurch gelingt es den Autoren dieser Studie >80% der humanen ES-Zellen in PAX6 positive neurale Zellen zu konvertieren. Zur Analyse der CIS/+Cre Zellen während der *in vitro* Neurogenese war das

von Chambers et al. (2009) entwickelte Protokoll vorteilhaft. Das Protokoll hat den entscheidenden Vorteil, dass adhärenzte Zellen unter annähernd gleichen Bedingungen kultiviert werden. Durch die Anwendung des Protokolls sollte der heterogene und komplexe Einfluss der exogenen Faktoren vermindert werden, wie beispielsweise die positionsabhängige Exposition von Morphogenen der Zellen innerhalb eines *embryoid body* (ten Berge et al., 2008). Für die nachfolgenden Experimente wurde das Protein Noggin durch das Pharmakon Dorsomorphin (Yu et al., 2008) ersetzt. Eine Konzentration von 10 μM Dorsomorphin hat denselben Effekt wie 500 ng/ml Noggin (persönliche Kommunikation mit Stuart Chambers).

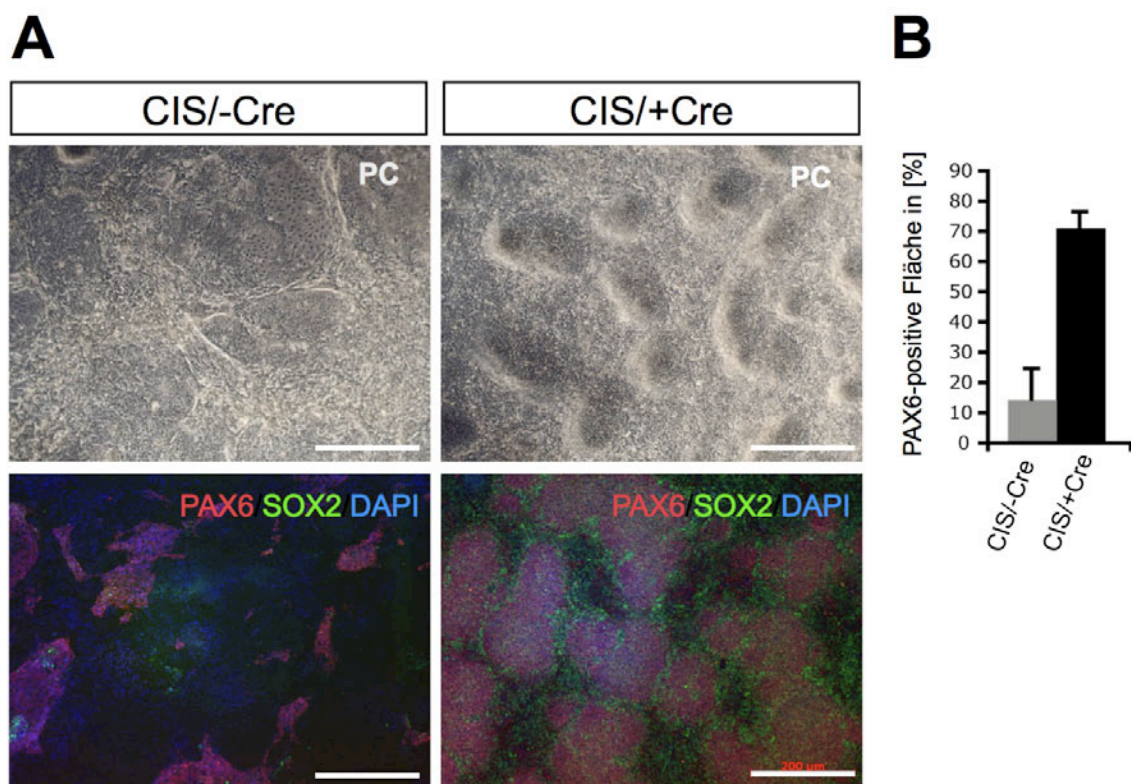


Abb. 3.27: Immunfluoreszenzfärbung der direkten Konversion von humanen ES-Zellen in neurale Vorläuferzellen. (A) Mikroskopische Aufnahmen von CIS/-Cre und CIS/+Cre Zellen, die entsprechend dem Protokoll von Chambers et al. (2009) behandelt wurden. Hierfür wurden humane ES-Zellen auf Matrigel beschichtete Schalen ausgesät und adhärenz durch die kombinierte Anwendung zweier SMAD-Inhibitoren (SB431542 und Dorsomorphin) über einen Zeitraum von 15 Tagen in neurale Vorläuferzellen konvertiert. Bildausschnitt einer durchlichtmikroskopischen Aufnahme von Zellen am letzten Tag (Tag 15) des Protokolls. Immunfärbung der Zellen an Tag 15 mit einem α -PAX6-Ak (Neuraler Stammzellmarker) und α -SOX2-Ak (Neuraler Stammzellmarker). Skalierung 200 μm . (B) Die densitometrische Auswertung (Software: *ImageJ*) der PAX6 spezifischen Immunfluoreszenzfärbungen ergab für CIS/+Cre Zellen eine fünfmal größere Fluoreszenz-Fläche. Bei der PAX6-positiven Fläche handelt es sich um die relative Fläche bezogen zur Gesamtfläche der Aufnahmen (n=3).

Der TGF- β -Inhibitor SB431542 leitet die Differenzierung der humanen ES-Zellen durch die Inhibition der Selbsterneuerung ein. Während der Differenzierung hat Noggin einen

inhibierenden Effekt auf die Ausbildung von Trophektoderm sowie Ektoderm. Das Pharmakon SB431542 blockiert während des Differenzierungsprozesses die Ausbildung von mesendodermalen Zellen. Die Ergänzung des Mediums mit FGF-2 (bFGF) induziert eine ektodermale Ausprägung und überschreibt dadurch den inhibitorischen Effekt von Noggin. Im folgenden Experiment wurde dem Medium kein FGF-2 und wie bereits erwähnt Dorsomorphin statt Noggin zugesetzt. Ein detailliertes Protokoll ist dem Kap. 2.5.3.2 zu entnehmen. Zur Expansion wurden vereinzelte humane ES-Zellen auf einer mit Matrigel beschichteten Zellkulturschale ausgesät, so dass die Zellen am vierten Tag nahezu konfluent waren. Ab Tag 4 wurde das ES-Zellmedium durch die SMAD-Inhibitoren ergänzt und der Anteil an N2-Medium wurde kontinuierlich bis Tag 15 erhöht. Das Pharmakon SB431542 wurde ab Tag 6 nicht mehr dem Medium beigegeben. Eine durchlichtmikroskopische Analyse an Tag 15 zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen SOX2-überexprimierenden Zellen und den nicht-induzierten Kontrollzellen hinsichtlich der Morphologie der interzellulären Anordnung (Abb. 3.27.A). CIS/+Cre Zellen haben sich zum großen Teil zu neuronalen Rosetten angeordnet, wohingegen bei den CIS/-Cre Zellen diese dreidimensionalen runden Zellformation nicht ausgeprägt wurden (Abb. 3.27.A). Eine immunzytologische Analyse der konvertierten Zellen auf die Expression der neuronalen Transkriptionsfaktoren PAX6 und SOX2 ergab folgendes Bild (Abb. 3.27.A): Alle CIS/+Cre Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor SOX2. Bei den CIS/-Cre Zellen sind nur vereinzelte Anhäufungen von SOX2 positiven Zellen detektierbar. Bei der SOX2-überexprimierenden Zelllinie ergibt sich ein auffälliges Bild in der Immunfärbung gegen PAX6, PAX6-positive Zellen zeigen die Tendenz, sich in neuronalen Rosetten zu organisieren. Bei den PAX6-positiven Kontrollzellen sind keine übergeordneten Zellformationen zu erkennen, vielmehr verbleiben sie in einer zweidimensionalen epithelartigen Anordnung. In der CIS/-Cre Zellpopulation wurden vereinzelt „Insel-Areale“ mit dichter angeordneten Zellen vorgefunden, die PAX6-positive Neuronale Rosetten ausbilden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt betrachtet sind wesentlich mehr CIS/+Cre Zellen PAX6 positiv als bei den CIS/-Cre Zellen. Die densitometrische Auswertung des Fluoreszenzsignals der PAX6-spezifischen Immunfärbung (n=3) ergibt, eine fünfmal größere Fläche für CIS/+Cre Zellen (Abb. 3.27.B). Demnach weisen die CIS/+Cre Zellen deutlich mehr PAX6-positive Zellen auf.

Generell führt der Entzug von bFGF bei CIS/-Cre und CIS/+Cre zu einer geringeren Zelldichte. Eine zusätzliche Inhibition des FGF-Signaltransduktionsweges mit Hilfe des Pharmakons SU5402 (Xu et al., 2008) führt in CIS/-Cre und CIS/+Cre Zellen zum Zelltod (Daten nicht gezeigt).

Das Zellschicksal der PAX6-positiven Zellen konnte bis dato nicht weitergehend untersucht werden, da sich die Zellen nur mit mechanischer und gleichzeitiger enzymatischer Behandlung von der Zellschale ablösen ließen. Dies führte zum Absterben der Zellen. Momentan werden zwei Strategien verfolgt, um PAX6-positive neurale Rosettenzellen zu generieren. Zum einen wird das duale SMAD-Inhibitoren Protokoll auf ein EB-basiertes Protokoll angewendet und zum anderen sollen die PAX6-positiven Zellen der direkten Konversion nach Chambers et al. (2009) schonender mittels Accutase und ROCK-Inhibitor passagiert werden.

Die Untersuchungen der direkten neuralen Konversion von humanen ES Zellen zeigen, dass eine SOX2-Überexpression zu deutlich mehr PAX6-positiven Zellen führt. Dies könnte ein Hinweis auf einen neuro-induktiven Effekt von SOX2 sein.

4 Diskussion

4.1 Entwicklung und Optimierung neuer genetischer Werkzeuge

Embryonale Stammzellen und davon abgeleitete Zellen stellen ein potentes *in vitro* Modell dar, um grundlegende entwicklungsbiologische Fragestellungen zu bearbeiten. Darüber hinaus gibt es vielversprechende Ansätze humane embryonale Stammzellen für klinische Anwendungen zu nutzen, sowohl direkt im Rahmen einer Stammzelltherapie als auch indirekt als Modell für bestimmte Erkrankungen. Die genetische Manipulation von ES-Zellen stellt bei diesen Anwendungen eine wichtige Grundvoraussetzung dar. Im Gegensatz zu murinen ES-Zellen lassen sich humane ES-Zellen ungleich schlechter genetisch modifizieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten genetische Werkzeuge entwickelt und optimiert werden, die es erlauben eine konditionale und kontrollierbare Transgenexpression in humanen ES-Zellen durchzuführen.

4.1.1 FLP-Proteintransduktion in embryonalen Stammzellen der Maus

Eine kombinierte Applikation von zwei zell-permeablen Rekombinasen würde das Anwendungsspektrum zur Genfunktionsanalyse *in vitro* enorm erweitern, unter anderem wäre eine reversibel induzierbare Genaktivität möglich. Dies war bisher aufgrund der vergleichsweise geringen Transfektionseffizienz von Rekombinasen nur eingeschränkt möglich. Eine zweite, vergleichbar effiziente zell-permeable Rekombinase zur bereits etablierten zell-permeablen Cre-Rekombinase könnte diese Einschränkung aufheben. Als zweite Rekombinase wurde eine zell-permeable Version der FLP-Rekombinase verwendet, die in der Arbeitsgruppe bereits entwickelt worden war (Patsch 2005).

Diese zell-permeable FLP-Rekombinase wurde zunächst für die Anwendung in murinen ES-Zellen optimiert. Hierfür wurden Reporterzelllinien zur Analyse verwendet, die nach FLP-vermittelter Rekombination das Reportergen *LacZ* exprimieren (Kessler 2010). Zur Validierung der Reporterlinien wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt und es konnte eine FC-lacZ-Linie als *single copy* Reporterzelllinie identifiziert werden. Diese Zelllinie wurde für alle weiteren Analysen verwendet, da eine verlässliche Bestimmung der Rekombinationseffizienz nur möglich ist, wenn eine einzelne Reportergenkassette im Genom integriert vorliegt. Über die Analyse der Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit wurde eine optimale Inkubationszeit und Konzentration für die FLP-Transduktion in FC-lacZ ES-Zellen ermittelt. Die größte Anzahl an blau gefärbten Kolonien (positiver β -Gal-Phänotyp) von 77% wurde nach einer Inkubationszeit von drei Stunden mit 4 μ M TAT-FLP ermittelt. Dies stellt

eine deutliche Steigerung der Effizienz im Vergleich zur initialen Rekombinationseffizienz von 42% dar (Kessler 2010). Die in einer Southern Blot-Analyse ermittelte maximale Rekombinationseffizienz von ca. 50 % wurde nach einer Inkubation von 3 Stunden mit 6 μM TAT-FLP erreicht. Die optimalen FLP-Transduktionsbedingungen liegen bei einer Konzentration von ca. 6 μM TAT-FLP und eine Inkubationsdauer von 1-3 Stunden. Die Diskrepanz zwischen der ermittelten maximalen Rekombinationseffizienz des β -Gal-Phänotyps und der Southern Blot-Analyse lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass die Auswertung einmal auf Reporterprotein-Ebene und einmal auf DNA-Ebene stattfand. Ein mosaikartig ausgeprägter β -Gal-Phänotyp innerhalb einer ES-Zellkolonie, könnte ein Grund für der Ermittlung einer höhere Rekombinationseffizienz auf Reporterprotein-Ebene sein.

Die geringere Effizienz von TAT-FLP im direkten Vergleich zu TAT-Cre mit >90% (Haupt et al., 2007; Peitz et al., 2007) könnte zum einem daran liegen, dass das Temperaturoptimum von FLP bei 25-30°C liegt. Die verwendete thermostabilere Variante FLPe, die fünfmal aktiver als das wildtypische FLP ist, weist allerdings nur ein Viertel der Aktivität von Cre in transienten Ansätzen auf (Buchholz et al., 1998). Die geringere Aktivität von FLP könnte die Folge einer verminderten Chromatin-Aktivität der FLP-Rekombinase im Vergleich zur Cre-Rekombinase sein (Andreas et al., 2002). Auch die Proteinstabilität und das Löslichkeitsverhalten von TAT-FLP in Zellkulturmedien sind im Vergleich zu TAT-Cre reduziert, so dass weniger Gesamtprotein in Lösung genommen werden kann. Es wäre weiterhin denkbar, dass bei der Proteinaufreinigung weniger biologisch aktive TAT-FLP Moleküle aufgereinigt werden, als es bei der Aufreinigung von TAT-Cre der Fall ist. Fest zu halten bleibt, dass eine Anwendung des TAT-FLP Transduktionssystems mit einer Rekombinationseffizienz von 50% eine Verbesserung gegenüber den herkömmlichen Methoden darstellt, um *in vitro* eine FLP-vermittelte Rekombination in Zellen zu induzieren. Die Transfektion von ES-Zellen mit einem für die FLP-Rekombinase kodierenden Plasmid resultiert in einer durchschnittlichen Rekombinationseffizienz von 6% (Schaff et al., 2001). Mittels Lipofektion konnte innerhalb der Arbeitsgruppe keine Rekombinationseffizienzen von mehr als 20% erreicht werden. Des Weiteren wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Andreas Zimmer (Molekulare Psychiatrie, Uniklinikum Bonn) gezeigt, dass die Keimbahnfähigkeit von TAT-FLP behandelten ES-Zellen der Maus erhalten bleibt. Somit stellt das TAT-FLP Transduktionssystem eine sehr effiziente Alternative zur Elektroporation, Lipofektion und Virustransduktion dar. Darüber hinaus ist die Transduktion von FLP-Protein eine untoxische (Kessler 2010), nicht auf DNA basierende Methode, die keine Gefahr der insertionalen

Mutagenese in sich birgt. Die vergleichsweise hohe Effizienz sowie die nicht toxischen Eigenschaften erlauben eine Anwendung auch mit wenigen Zellen.

4.1.2 Herstellung einer transduzierbaren Dre-Rekombinase

Zur Erweiterung des Repertoires an Rekombinasewerkzeugen wurde eine zell-permeable Version der Dre-Rekombinase hergestellt. Die Cre-homologe Rekombinase des *Phagen D6*, Dre genannt, hat auf DNA-Ebene eine Sequenzhomologie von 39% (Sauer und McDermott, 2004). Die große Homologie zur Cre-Rekombinase macht das Dre-rox zu einem vielversprechenden Kandidatensystem. Für die Herstellung einer transduzierbaren Dre-Rekombinase musste auf eine codon-optimierte Version für Säugetiere zurückgegriffen werden, da das Material der Erstpublikation von Sauer und McDermott (2004) nicht zugänglich war. Die für die Dre-Rekombinase kodierende Sequenz wurde in den N-terminalen pSESAME Vektor kloniert, um ein Fusionsprotein mit analoger Anordnung zum His-TAT-NLS-Cre (TAT-Cre) zu erhalten. Das hergestellte pSESAME-HTNDre Plasmid kodiert für das Fusionsprotein His-TAT-NLS-Dre und kann sowohl von Pro- als auch Eukaryoten exprimiert werden. Durch die transiente Co-Transfektion eines Dre-Expressions-(pSESAME-HTNDre) und eines Dre-Reporter-Plasmids (pSVkrox-LacZ) in NIH 3T3 Fibroblasten wurde eine β -Galaktosidase Expression induziert. Dadurch konnte die biologische Funktionalität des HTNDre (TAT-Dre) Fusionsproteins nachgewiesen werden. Zudem konnte ausgeschlossen werden, dass durch die Fusion der zusätzlichen Peptidsequenzen die enzymatische Aktivität blockiert wird. Zur weiteren Analyse des Dre-rox Systems wurde eine stabile Dre-Reporterzelllinie generiert, die über einen Dre-induzierbaren β -Gal-Phänotyp verfügt. Zur Validierung der Induzierbarkeit wurden die Klone der Dre-Reporterzelllinie transient mit pSESAME-HTNDre transfiziert. Fünf Klone (4, 5, 11, 18 und 20) mit der höchsten Induzierbarkeit, ermittelt über die Reportergenaktivität von β -Galaktosidase, wurden ausgewählt und mittels Southern Blot auf die Integrationshäufigkeit der Expressionskassette analysiert. In der Tat liegt die Zelllinie 18 mit einer für die *single copy* Integration erwarteten Bande von ~ 7.8 kb vor und wurde basierend auf dieser Eigenschaft zur weiteren Analyse des Dre-rox Systems verwendet. Darüber hinaus sollte die Heterospezifität von Dre validiert werden. Dies wurde durch eine überkreuz ausgeführte Transfektion von pSESAME-HTNDre und pTriEx-HTNCre in Cre- und Dre-Reporterzellen gezeigt. Es konnte keine β -Galaktosidase-Aktivität in Cre-Reporterzellen, die mit Dre-Expressionsplasmid und in Dre-Reporterzellen, die mit Cre-Expressionsplasmid transfiziert wurden, festgestellt werden. Die Transfektion der

Reporterzellen mit der korrespondierenden Rekombinase induzierte hingegen β -Galaktosidase-Aktivität. Nachdem die Heterospezifität des Dre-rox Systems nachgewiesen wurde und damit die publizierten Ergebnisse von Sauer und McDermott aus dem Jahr 2004 bestätigt werden konnten, wurde mit der Herstellung einer zellpermeablen Dre-Rekombinase fortgeföhren. Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass sich das rekombinante Dre-Fusionsprotein in *E. coli* exprimieren ließ, und dass es durch eine Ni-Affinitätschromatographie angereichert werden konnte. Das 384 AS lange und rechnerisch 43,4 kDa große Dre-Fusionsprotein ist deutlich als dominante Bande im Eluat zu erkennen. Die densitometrische Auswertung der Eluatfraktion ergab eine Reinheit von 92%. Insgesamt können drei weitere Kontaminationsbanden ausgemacht werden. Zwei Banden mit einem größeren Molekulargewicht von ca. 68 und 79 kDa. Bei diesen beiden Banden handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um endogene Bakterienproteine, da dieses Doppelbandenmuster unabhängig vom jeweiligen rekombinanten Protein in jedem Eluat einer Ni-Affinitätschromatographie aus *E. coli* (BL21-Stamm) zu erkennen ist. Im Western Blot werden die beiden Banden nicht vom α -His-Antikörper detektiert. Eine weitere Kontaminations-Bande von einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa ist in der SDS-PAGE Analyse nicht erkennbar, wird aber vom α -His-Antikörper detektiert. Hierbei könnte es sich um einen unvollständig translatierten Teil des Dre-Fusionsproteins handeln. Translationsabbrüche können durch seltene Codons, für die es in *E. coli* nur wenige tRNAs gibt, verursacht werden (Misra und Reeves, 1985). Beispielsweise benötigt das Triplet AGG (Arginin) eine der seltenen tRNAs in *E. coli* (Chen und Inouye, 1994). In der DNA-Sequenz des wildtypischen Dre kommt das AGG Codon nicht vor, wohingegen es 15-mal in der optimierten Codonsequenz für Säugetiere vorkommt. Selbst wenn dies keine Translationsabbrüche zur Folge hätte, könnte es die Translation erheblich verlangsamen, so dass letztendlich weniger Protein translatiert werden würde. Dies wäre eine mögliche Erklärung, weshalb die Proteinausbeute von TAT-Dre (6 mg pro Liter Expressionskultur) wesentlich geringer als die Ausbeute von TAT-Cre (25 mg pro Liter Expressionskultur) ausfällt. Im Gegensatz zu Dre kommen in der DNA-Sequenz von Cre nur zwei AGG Codons vor. Das rekombinante Dre konnte durch die Dialyse des Eluats in einen glycerinhaltigen Puffer (DCB, *Dre Concentration Buffer*) umgepuffert werden. Der DCB besteht zu 50% aus Glycerin und weist eine hohe NaCl-Konzentration von 2 M auf. Die Pufferzusammensetzung ermöglicht das Aufkonzentrieren durch Ultrafiltration auf eine Endkonzentration von ≥ 150 μ M TAT-Dre. Dies hat den entscheidenden Vorteil, dass die Vorratslösung bei -20°C gelagert werden kann, ohne dass es zu wiederholten Einfrier-Auftauzyklen mit einhergehenden

Funktionsverlusten kommt. Die Vorratslösung von TAT-Cre benötigt neben 50% Glycerin nur 0,5 M NaCl und das rekombinante Cre lässt sich in diesem Puffer bis zu einer Konzentration von 400 μ M anreichern.

	TAT-Cre	TAT-Dre	TAT-FLP
Reinheit im Stock	95%	92%	85%
Löslichkeit im Stock	16,8 mg/ml	6,4 mg/ml	5,4 mg/ml
Halbmaximale Aktivität	2 μ M und 60 min	4 μ M und 120 min	3 μ M und 30 min
Maximale Rekombinationseffizienz	$\geq 90\%$	$\geq 50\%$	$\geq 70\%$

Tab. 4.1: Vergleich der drei zell-permeablen Rekombinasen. Die Rekombinationseffizienz bezieht sich auf die induzierte Reporteraktivität in Reporterzellen

Abschließend lässt sich festhalten, dass sich die biochemischen Eigenschaften von TAT-Dre und TAT-Cre sehr ähnlich, aber nicht gleich sind. Die höhere Proteinausbeute und die praktischere Vorratshaltung von TAT-Dre im Vergleich zu TAT-FLP könnte in Zukunft TAT-Dre den Vorzug geben, zumal TAT-FLP nicht vollständig an die bemerkenswerten Eigenschaften in Bezug auf Effizienz und Thermostabilität von TAT-Cre heran kommt (siehe hierzu auch Tab. 4.1).

Dre-Proteintransduktion in Säugetierzellen

Für die Untersuchung der biologischen Funktionalität wurden Dre-Reporterzellen mit TAT-Dre supplementiertem Medium inkubiert. Durch die Analyse der Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit wurden die optimalen Bedingungen für eine Dre-Proteintransduktion ermittelt. Wird die Effizienz der Dre-Proteintransduktion als eine Funktion der Zeit betrachtet, so ergibt sich ein asymptotischer Verlauf. Die Funktion erreicht ein Plateau ab 8 Stunden, das bis zu einer Inkubationszeit von 16 Stunden bestehen bleibt. Die Auswertung der Konzentrationsabhängigkeit machte die Korrelation zwischen der verwendeten TAT-Dre Konzentration und der erzielten Effizienz deutlich. Der größte Anteil an blauen Reporterzellen von über 70% wurde bei einer Inkubationszeit von 14 Stunden und einer Konzentration von 8 μ M TAT-Dre erreicht. Versuche, die Effizienz durch eine höhere TAT-Dre Konzentration zu steigern, scheiterten. Bereits beim Verdünnen der Vorratslösung in Transduktionsmedium präzipitierte rekombinantes Protein, so dass maximal eine Konzentration von 8 μ M TAT-Dre eingestellt werden konnte. Womöglich wird das Löslichkeitsprodukt von TAT-Dre bei einer Konzentration von >8 μ M im Transduktionsmedium überschritten. Ohne den Zusatz von *Serum Replacement* ins Medium präzipitierten das rekombinante Dre-Fusionsprotein bereits

bei einer geringeren Konzentration ($\geq 2 \mu\text{M}$). Im Gegensatz dazu präzipitiert TAT-Cre in serumfreien Medien ab einer Konzentration von $\geq 5 \mu\text{M}$. Darüber hinaus ist eine weitaus geringere Konzentration ($1 \mu\text{M}$) ausreichend, um in $\geq 90\%$ der Reporterzellen eine Rekombination zu vermitteln. Dies könnte daran liegen, dass im Gegensatz zu TAT-Cre ein größerer Anteil des aufgereinigten Dre-Fusionsproteins biologisch inaktiv ist. Die Nettoladungen der beiden Rekombinasen ist annähernd identisch (Cre hat einen isoelektrischen Punkt von 10,3 und Dre einen pI Wert von 10,26) und sollten somit fast keinen Unterschied bei der Löslichkeit verursachen. Möglicher Weise könnten die Limitationen von TAT-Dre, die bei der Aufreinigung, Lagerung und Verdünnung auftreten, mit der Verwendung der wildtypischen DNA-Sequenz von Dre zur Herstellung einer zell-permeablen Version reduziert werden. Es zeichnet sich ab, dass die schlechtere Eigenschaft des TAT-Dre Fusionproteins im Vergleich zu TAT-Cre eine Proteintransduktionstechnik assoziierte Beobachtung ist. In anderen Anwendungen zeigte das Dre-rox Systems eine vergleichbare Effizienz und Stabilität wie das Cre-loxP System (eigene Beobachtungen; Anastassiadis et al., 2009). Nichtsdestotrotz stellt das zell-permeable Dre-Fusionsprotein eine Ergänzung zu TAT-Cre und eine potente Alternative zu TAT-FLP dar (siehe Tab. 4.1). Eine kombinierte und sequentielle *in vitro* Anwendung der drei zell-permeablen Rekombinasen würde komplexere konditionale Mutagenese Strategien ermöglichen. Eine mögliche Anwendung wäre eine reversible Genexpression von unterschiedlichen Genen oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Anwendung der unterschiedlichen Rekombinase-Systeme, um Reprogrammierungsfaktoren aus dem Genom der iPS Zellen zu entfernen, wäre sinnvoll, um eine Rekombination zwischen mehreren gleichen Erkennungsstellen zu verhindern. Darüber hinaus könnte der Einsatz unterschiedlicher Rekombinase-Systeme in Kombination mit konditionale Reprogrammierungsfaktoren helfen die Rolle der einzelnen Faktoren zu entschlüsseln.

4.1.3 Herstellung eines liganden-induzierbaren Dre-Fusionsproteins

Um das Potential des Dre-rox-Systems weitergehend zu analysieren und weitere Anwendungsmöglichkeiten auszuschöpfen, wurde ein Expressionskonstrukt für ein DrePBD Fusionsprotein (*progesterone ligand binding domain*) generiert. Hierfür wurde das für Säuger-tiere codon-optimierte Dre verwendet. Das Expressionskonstrukt ermöglicht eine posttranslational regulierbare Rekombinase-Aktivität. Die Wahl fiel auf die verbesserte Version der Progesteron induzierbare Domäne (PDB*), da sie eine geringe Hintergrundaktivität

hat (Wunderlich et al., 2001) und dies darüber hinaus die Möglichkeit offen hält, das DrePBD* kombiniert mit dem CreERT2 Fusionsprotein (Feil et al., 1997) anzuwenden.

Induktion des Dre-Fusionsproteins in Fibroblasten und murinen ES-Zellen

Die Induzierbarkeit und Aktivität des DrePBD* Fusionsproteins wurde Reporterzellen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Induzierbarkeit sowohl in ES-Zellen der Maus als auch in Fibroblasten außerordentlich effizient ist. Der induzierte β -Gal-Phänotyp der Reporterzelllinien ist nach einer Transfektion mit pNN_DrePBD* in Anwesenheit von 100 nM RU486 vergleichbar mit der Transfektion des konstitutiv aktiven Expressionsplasmids pDre. Eine gleiche enzymatische Aktivität sagt aus, dass die Dre-Rekombinase durch die C-terminale Fusion der 27 kDa großen Progesteron Bindedomäne nicht in ihrer biologischen Funktionalität eingeschränkt ist. Die geringe Hintergrundaktivität in Abwesenheit von RU486 von $\leq 1\%$ in Reporterzelllinien macht deutlich, dass die enzymatische Aktivität von DrePBD* im hohen Maße durch die Applikation des synthetischen Progesteronliganden RU486 gesteuert werden kann. Das macht die Anwendung des DrePBD* Fusionsproteins zu einem induzierbaren System mit einer fast vernachlässigbaren Hintergrundaktivität. Wird die relative β -Gal-Aktivität gegen die Konzentration von RU486 aufgetragen, nimmt der Verlauf der Funktionsgeraden eine sigmoidale Form an. Bereits bei einer RU486 Konzentration von 10 nM erreicht die Funktionsgerade ein Plateau. In Zukunft könnte eine Kombination von Tamoxifen und CreERT2 zusammen mit RU486 und DrePBD* benutzt werden, um Zielgene reversibel zu induzieren. Denkbar wäre ein Expressionssystem, dass durch die Applikation von Tamoxifen und der damit induzierten Cre-Aktivität eine Genexpression an- und durch die Applikation von RU486 und der damit induzierten Dre-Aktivität ausschalten könnte. Dies wurde *in vivo* bisher hauptsächlich mit Hilfe von Tetrazyklin regulierbaren Promotoren gesteuert. Das Tetrazyklin induzierbare System hat den entscheidenden Nachteil, dass entweder für die Unterdrückung oder für die Induktion der Genexpression dauerhaft Tetrazyklin dem System zugeführt werden muss. Zumal es bei Tetrazyklin-regulierten Systemen durch eine basale Promotoraktivität zu einer höheren Hintergrundaktivität kommt.

Es ist eher unwahrscheinlich, dass das bereits etablierte FLP-FRT System in der Maus durch das Dre-rox System ersetzt wird, selbst wenn es sich bei dem Dre-rox System um ein effizienteres System handelt. Allerdings könnte in zukünftigen Anwendungen auf das Dre-rox System zurückgegriffen werden, um komplexere Mausmodelle zu entwickeln. Beispielsweise

wenn es darum geht, die Funktion eines alternativ gespleißten Gens zu analysieren. So könnte Cre-loxP zur Entfernung des einen und Dre-rox zur Entfernung des anderen alternativen Exons verwendet werden. Denkbar wäre auch ein *in vivo* Modell zur Tumorentstehung, bei dem durch genetisch kontrollierte Multischritte die Tumorentstehung imitiert werden kann. Das FLP-FRT System könnte weiterhin ergänzend angewendet werden, da es meist ohnehin für das Entfernen der Selektionskassette und nicht für eine konditionale Mutagenese *per se* verwendet wird. Ein anderes Bild ergibt sich für Entwicklung konditionaler Strategien für das Tiermodell der Ratte. Erst unlängst gelang es ES-Zellen der Ratte zu generieren (Buehr et al., 2008; Li et al., 2008). Dies macht den Modellorganismus Ratte für genetische Modifikationen zum Neuland, für das es sich lohnen könnte das Dre-rox System von Beginn an zu integrieren.

4.2 Genfunktionsanalysen des Transkriptionsfaktors Sox2

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von murinem Sox2 sowie humanem SOX2 in der Pluripotenzerhaltung und während der frühen neuralen Differenzierung untersucht werden. Zur Modulation der Genfunktion wurden konditionale Expressionskassette verwendet, die durch ortsspezifische Rekombinasen reguliert werden können.

4.2.1 Cre-induzierbare Sox2 RNAi in murinen ES-Zellen

Zur Induktion eines Funktionsverlusts von Sox2 wurde ein Cre-induzierbares RNAi Expressionssystem erfolgreich angewendet. Von den drei verwendeten shRNA Sequenzen gegen Sox2, war nur die bereits validierte shRNA Sequenz-III (Ivanova et al., 2006) in der Lage, eine Differenzierung der ES-Zellen zu bewirken. Dabei korrelierten der GFP-positive Phänotyp mit der für undifferenzierte ES-Zellen typischen Morphologie und der Verlust der GFP-Fluoreszenz mit der Morphologie von differenzierenden Zellen. Eine anschließende Immunfärbung gegen Sox2 bestätigte den *knockdown*, da in GFP-negativen und differenzierenden Zellen kein Sox2 mehr detektiert werden konnte. Eine TAT-Cre Behandlung der shRNA-III ES-Zellen induzierte bei mehr als 30% der Kolonien eine morphologische Veränderungen des undifferenzierten Status von ES-Zellen. Die Zellen wurden vier Tagen nach TAT-Cre Applikation analysiert, da erst ab diesem Zeitpunkt ein vollständiger Verlust der GFP-Fluoreszenz beobachtet werden konnte. Es ist anzunehmen, dass die tatsächliche Effizienz größer ist. Es wäre denkbar, dass die proliferierenden ES-Zellen die differenzierenden und sich langsam teilenden Zellen innerhalb von 4 Tagen zahlenmäßig überwachsen haben. Zumal die Zellhaufen als einzelnes Ereignis gezählt

wurden, ist es naheliegend anzunehmen, dass diese nicht immer monoklonalen Ursprungs waren, so dass dadurch eine geringere Effizienz zustande kommen konnte. Diese Systemlimitation könnte umgangen werden, wenn statt des wildtypischen GFP Proteins mit einer Halbwertszeit von ~26 h (Corish und Tylor-Smith, 1999) eine instabilere GFP Variante (*unstableGFP*) verwendet werden würde. Das *unstableGFP* hat eine proteolytische Signalsequenz am C-Terminus fusioniert, dies bedingt eine kürzere Halbwertszeit von einigen Minuten bis wenige Stunden (Corish und Tyler-Smith, 1999; Andersen et al., 1998). Ein *unstableGFP* würde es erlauben die Effizienz schon nach kurzer Zeit auf Einzelzellebene zu bestimmen. Außerdem könnte die Zellpopulation frühzeitig in eine GFP-negative und GFP-positive Zellpopulation aufgetrennt werden. Eine weitere Möglichkeit, um eine stabile Zelllinie mit einem induzierbaren *knockdown* Effekt zu erhalten, wäre die Anwendung einer Tetrazyklin-induzierbare shRNA (Zafarana et al., 2009). Dieses System hat den Vorteil, dass alle ES-Zellen synchron induziert werden. Ein entscheidender Nachteil des Tetrazyklin-induzierbaren Systems ist allerdings, dass der Promotor nicht vollständig zu jeder Zeit reprimiert vorliegt und es so zu einer basalen Expression kommen kann. Diese Undichtigkeit des Systems wäre im Falle eine Sox2 spezifischen RNAi fatal, da dadurch das kritische Expressionsniveau von Sox2 verändert würde und so das dynamische Gleichgewicht der Pluripotenzerhaltung, irreversibel aus der Balance gebracht werden könnte. Die Daten zeigen, dass eine Kombination des pSico Vektors mit der Cre-Proteintransduktion eine effiziente Methode darstellt, um eine streng regulierbare, Cre-induzierbare shRNA Expression in ES-Zellen der Maus zu erzielen. Die RNAi-Zielsequenz weist eine 100%ige Homologie zum SOX2-Transkript des Menschen auf und ermöglicht die Nutzung des pSico-Sox2-shRNA-III Vektors auch in humanen ES-Zellen.

4.2.2 Cre-induzierbarer Sox2/SOX2-Überexpression in murinen und humanen ES-Zellen

Herstellung einer Cre-induzierbaren Sox2-Überexpression in ES-Zellen

Für eine Spezies-spezifische Überexpression wurde murine Sox2 und humane SOX2 cDNA in den pBOI-IP Vektor eingebracht. Das Cre-induzierbare Expressionssystem ermöglicht eine zeitlich regulierbare Transgenexpression. Die Konditionalität des Expressionssystems ohne nachweisbare Hintergrundaktivität wurde durch Immunfärbungen, Western Blot-Analysen und RT-PCR-Analysen bestätigt. Dabei ließ sich das transgene von endogenem Sox2/SOX2 durch den N-terminalen FLAG-tag unterscheiden. Das FLAG-Sox2/SOX2 Protein wies ein

aberrantes Lauferhalten in der SDS-PAGE auf, das sich bei Western Blot-Analysen mittels α -Sox2-Antikörper in einer zweiten Bande widerspiegelte. Die Inkubation der Membran mit einem α -FLAG-Antikörper bestätigte, dass es sich bei der zusätzlichen Bande um das FLAG-tag markierte Sox2/SOX2 handelt. In einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse wurde auch auf RNA-Ebene keine Transgenaktivität vor Cre-Induktion detektiert. Die konditionale Expressionskassette erweist sich somit als streng reguliert, d. h. eine Transgenexpression tritt erst nach einer Cre-vermittelten Rekombination auf. Die Expressionskassette des pBOI-IP Vektors hat mehrere entscheidende Vorteile. Der CAG-Promotor in Kombination mit der Polyoma Enhancer-Sequenz erlaubt eine stabile Langzeitexpression in murinen und humanen ES-Zellen als auch in davon abgeleitet differenzierten Zellen. (Alexpoulou et al., 2008; Chambers et al., 2003; Liew et al., 2007). Der ubiquitäre CAG-Promotor erlaubt nach Transfektion der Zielzellen eine positive Selektion auf das Neomycin-Resistenzgen. Durch die nachgeschaltete Sequenz eines Transkriptionsstops wird die Expression des Zielgens blockiert. Im Vergleich zu konstitutiv-aktiven Expressionssystemen bleibt das wildtypische Expressionsprofil, abgesehen von potentiellen Positionseffekten, bis zur Induktion des Zielgens bewahrt. Erst nach einer Cre-vermittelten Rekombination und der Exzision der Neo-Stop-Sequenz wird das transgene Zielgen exprimiert. Ein Puromycin Resistenzgen ist über eine IRES Sequenz mit dem transgenen Sox2/SOX2 verbunden. Dies hat den entscheidenden Vorteil, dass auf das Rekombinationsereignis positiv selektioniert werden kann. Darüber hinaus ermöglicht die genetische Fusion der FLAG-Sequenz an die cDNA eine Diskriminierung zwischen endogenem und transgenem Protein. Die beschriebenen günstigen Eigenschaften der Expressionskassette des pBOI-IP Vektors konnten sowohl in murinen als auch humanen ES-Zellen dokumentiert werden

Transgenes Sox2 kompensiert den Verlust von endogenem Sox2

Der Nachweis der biologischen Funktion von FLAG-Sox2 wurde in einem Kompensations-Experiment erbracht. Der siRNA vermittelte *knockdown* des endogenen Sox2 konnte von FLAG-Sox2-exprimierende ES-Zellen kompensiert werden. In FLAG-Sox2-exprimierenden ES-Zellen blieb die für undifferenzierte Zellen typische Morphologie bis 60 Stunden nach siSox2 Transfektion bewahrt. In Kontrollzellen hingegen resultierte die siSox2 Applikation in einer morphologischen Veränderung der ES-Zellen. Eine Western Blot-Analyse bestätigte den *knockdown* des endogenen Sox2 Proteins. Erstaunlicherweise war der *knockdown* Effekt so hoch, dass bei den siRNA transfizierten Kontrollzellen kein endogenes Sox2 Protein mehr immundetektiert werden konnte. Wohingegen bei FLAG-Sox2 exprimierenden Zellen eine

starke, aber keine vollständige Reduktion des endogenen Sox2 Proteins festgestellt wurde. Dieser Effekt ist möglicherweise auf eine autoregulatorische Schleife von Sox2 zurückzuführen. Denkbar wäre, dass das transgene Sox2 zusammen mit endogenem Oct3/4 die Transkription des endogenen Sox2 Gens weiterhin aufrechterhält. Dies hätte einen Kompensationseffekt zur Folge, der nicht nur auf dem Ersatz durch das Transgen beruht, sondern auch auf der Transaktivierung des endogenen Transkriptionsfaktors. Sox2-überexprimierende Zellen, die mit siSox2 transfiziert wurden, differenzierten nicht. Aus dieser Beobachtung lässt sich eine biologische Funktionalität des FLAG-Sox2 Proteins ableiten. Die genetische Fusion der FLAG-Sequenz wurde am N-Terminus vorgenommen, um die Integrität der C-terminalen Proteininteraktionsdomäne (Bowles et al., 2000) nicht zu gefährden. Trotzdem hätte die Extension am N-Terminus mit einem FLAG-tag unvorhersehbare Auswirkungen auf die biologische Funktionalität des Transkriptionsfaktors zu Folge haben können.

Cre-induzierbare Sox2 Expression induziert Apoptose

Basierend auf der publizierten Beobachtung von Mitsui und Kollegen (2003), dass eine ektopische Sox2-Expression zu massiven Zelltod führt und der eigenen Beobachtung, dass die ektopische Sox2 Expression nur ein moderates Expressionsniveau erreichte, stellte sich die Frage, ob ES-Zellen mit einer hohen ektopischen Sox2-Expression absterben. Dies hätte zur Folge, dass auf ES-Zellklone selektioniert werden würde, die ein moderates Expressionsniveau besitzen. Letztendlich würde eine ES-Zellpopulation angereichert werden, die das transgene Sox2 in einem für ES-Zellen tolerierbarem Bereich exprimieren. Tatsächlich spricht die in Abb. 3.18 dargestellte Immunfärbung für diese Erklärung. Zur Evaluation, ob eine erhöhte Sox2-Expression in ES-Zellen Apoptose induziert, wurde zum einen gegen den Apoptosemarker Caspase-3 (aktivierte Form) immungefärbt und zum anderen die Kernfragmentierung mittels DAPI-Färbung untersucht. Tatsächlich korrelierte die Caspase-3 Immunfärbung mit einer Kernfragmentierung, was für eine induzierte Apoptose spricht. Die transgenen ES-Zellkolonien wiesen fast alle Caspase-3 positive Zellen auf. Wohingegen nur 5% der TAT-Cre behandelten WT Zellen Caspase-3 positive Zellen haben. Außerdem zeigte sich, dass TAT-Cre behandelte transgene Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen zwischen 24-55% mehr Caspase-3-positive Zellen pro Kolonie aufweisen. Die Anzahl an Caspase-3-positiven Zellen wird durch die Selektion mit Puromycin vergrößert, was vermutlich am Zelltod der nicht-induzierten Zellen liegt. Es ist denkbar, dass eine Selektion auf ES-Zellklone stattfindet, die einerseits rekombiniert wurden, aber andererseits

nur ein moderates Sox2-Überexpressionsniveau haben. Zur Herstellung einer Sox2-überexprimierenden Zelllinie wurde nach der TAT-Cre Behandlung routinemäßig mit Puromycin auf das Rekombinationsereignis selektioniert. Alle nicht-rekombinierten Zellen exprimieren keine Puromycin-N-Acetyltransferase und sterben ab. Dadurch blieb zunächst die Sox2-induzierte Apoptose unentdeckt. Dies wäre eine Erklärung für die geringe Transgenexpression von Sox2 in den analysierten ES-Zellen.

Entzug extrinsischer Pluripotenzfaktoren bei Sox2/SOX2-überexprimierenden Zellen

Der Entzug der extrinsischen Pluripotenzfaktoren LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) und BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein-4*) bei ES-Zellen der Maus führt bereits in der ersten Passage zu deren Differenzierung. Auch der Pluripotenzmarker Oct-3/4 kann danach nicht mehr immundetektiert werden. Bei Cre-induzierter Sox2-Überexpression setzt die Differenzierung zeitverzögert ein und läuft dazu langsamer ab. In der zweiten Passage sind immer noch kompakte Zellkolonien zu erkennen, die in einer Immunfärbung mit α -Oct-3/4-Antikörper positiv sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass der durch den Entzug von LIF und BMP4 verursachte Pluripotenzverlust nur teilweise durch eine transgene Sox2-Expression kompensiert werden kann. Masui und Kollegen beschrieben Sox2 als den Hauptfaktor, welcher die Pluripotenz von ES-Zellen der Maus über das Expressionsniveau von Oct3/4 steuert (Masui et al., 2007). Sox2 aktiviert zum einen den *Orphan Nuclear Receptor* Nr5a2, einen positiven Oct4-Regulator (Gu et al., 2005) und reprimiert zum anderen Nr2f2, einen negativen Regulator (Schoorlemmer et al., 1994) von Oct-3/4 (Masui et al., 2007). Dieser mechanistische Zusammenhang könnte eine Erklärung für eine verzögerte Differenzierung der Sox2-überexprimierenden Zellen nach LIF- und BMP4-Entzug darstellen. Um diese Hypothese absichern zu können, wäre eine Genexpressionsanalyse von Nr2f2 und Nr5a2 hilfreich. Auch sollte die Genexpression weitere Pluripotenz assoziierter Faktoren (Utf1, Fgf4, Lefty1 und Nanog) für eine Analyse herangezogen werden.

Der Entzug des extrinsischen Pluripotenzfaktors bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*) bei humanen SOX2-überexprimierenden ES-Zellen führte zu einer ähnlichen morphologischen Beobachtung, wie bei den Sox2-überexprimierenden ES-Zellen der Maus. Humane Cre-induzierte Zellen differenzieren langsamer als die nicht-induzierten Kontrollzellen. Es gelang nicht, eine bFGF- und Feederzellen-unabhängige Selbsterneuerung sowie Pluripotenzerhaltung aufrecht zu erhalten, wie es für eine ektopische NANOG Expression beschrieben wurde (Darr et al., 2006). In Folgeuntersuchungen wäre es interessant das

Expressionsniveau von Oct3/4 oder anderer Pluripotenz-assoziiierter Marker während der Differenzierung zu untersuchen. Zumal das Expressionsniveau von OCT3/4 in humanen SOX2-überexprimierenden ES-Zellen genauso hoch ist wie in nicht-induzierten Kontrollzellen. Dies würde die Hypothese der Selektion von Klonen, die eine für ES-Zellen tolerierbare Menge an Sox2 exprimieren, unterstützen.

Sox2/SOX2-überexprimierende ES-Zellen in der EB-induzierten Differenzierung

Cre-induzierte murine und humane ES-Zellen, unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Morphologie nicht von dem jeweiligen wildtypischen ES-Zellen. Auch das Expressionsmuster von Oct-3/4, Pax6 (*Paired Box 6*) und Nestin (Intermediärfilament Typ VI) in Immunfärbungen ist mit nicht-induzierten als auch WT ES-Zellen vergleichbar. Demnach tolerieren murine ES-Zellen eine moderat erhöhte Sox2-Expression, die als transgene Sox2-Bande in Western Blots ersichtlich ist. Auch humane ES-Zellen scheinen eine moderat erhöhte SOX2-Expression zu tolerieren, was zum einen im Western Blot zu erkennen ist und zum anderen als dreifache Hochregulation der Gesamtexpression von SOX2 in der qRT-PCR detektiert werden kann. Zur weitergehenden Analyse der ektopischen Sox2/SOX2-Expression wurden Cre-induzierte ES-Zellen einer EB-basierten Differenzierung ausgesetzt. Analysen der Western Blots sowie der Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass die BOI-Sox2/SOX2-IP Expressionskassette während der Differenzierung nicht *gesilenced* wird. Dies trifft sowohl für murine als auch humane Zellen zu. Im Gegensatz zu den nicht-induzierten Zellen zeigen die Sox2-überexprimierenden Zellen der Maus eine verminderte Neigung, aus dem Zellverband der plattierten EB-Aggregate zu migrieren und adhärent auf dem Schalenboden zu wachsen. Gleichzeitig nehmen die Zellaggregate jedoch an Volumen zu. Auch bei humanen Cre-induzierten Zellen war dieser Effekt, allerdings weniger deutlich, zu beobachten. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass der Pluripotenzverlust in SOX2-überexprimierenden Zellen verlangsamt stattfindet und die Zellen somit noch ES-Zelleigenschaften aufweisen. Für einen verzögerten Übergang vom pluripotenten Zustand der Zellen in die Differenzierung spricht auch die Genexpressionsanalyse der EBs, diese zeigte, dass Pluripotenz-assoziierte Marker wie LEFTY, NANOG und OCT-3/4 im Vergleich zu den Kontrollzellen um den Faktor 20 hochreguliert sind. Interessanterweise sind alle drei hochregulierten Pluripotenz-assoziierten Marker direkte Zielgene des Transkriptionsfaktors SOX2 (Nakatake et al., 2006; Okumura-Nakanishi et al., 2005; Tomioka et al., 2002). Wohingegen der Pluripotenz-assoziierte Marker REX-1 in SOX2-überexprimierenden Zellen nicht hochreguliert vorliegt. In ES-Zellen der Maus wird Rex-1 durch Nanog transaktiviert und dem heterodimeren Sox2/Oct-3/4-Komplex

wird nur eine unterstützende Wirkung zu geschrieben (Shi et al., 2006). Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass REX-1 als einziger analysierter Pluripotenz-assoziiertes Marker nicht hochreguliert wird. Interessanterweise zählt Rex-1 zu den Pluripotenz-assoziierten Genen, welche keine funktionelle Rolle in der Pluripotenz-erhaltung zugeschrieben wird (Masui et al., 2008). Diese Betrachtung wird durch die eigenen Ergebnisse der SOX2-Überexpression unterstützt. Auch der trophektodermale Marker EOMES wird in SOX2-überexprimierenden ES-Zellen sowie in plattierten EBs bis zu zehnfach hochreguliert. Eine physikalische Interaktion von SOX2 mit Promotorelementen von EOMES wird in der Literatur beschrieben (Boyer et al., 2005). Offenbar hat die SOX2-Überexpression einen induktiven Effekt auf die Expression des trophektodermalen Markers EOMES, der aber nicht ausreicht, um eine trophektodermale Differenzierung unter den verwendeten Zellkulturbedingungen voranzutreiben. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass zwei weitere trophektodermale Marker ID2 und CDX2 weder in ES-Zellen noch in Zellen plattierter EBs hochreguliert werden. Dies spricht gegen die Progression einer trophektodermalen Differenzierung in SOX2-überexprimierenden Zellen. Möglicherweise wird ein Fortschreiten der Differenzierung in Trophektoderm auf einer weiteren regulatorischen Ebene, zum Beispiel durch die reziproke Regulation des NANOG und CDX2 Promotors unterbunden, so wie es für ES-Zellen der Maus publiziert wurde (Chen et al., 2009). Die Herunterregulation des endogenen Transkriptionsfaktors SOX2 in humanen SOX2-überexprimierenden ES-Zellen könnte ein weiterer Hinweis drauf sein, dass es eine negativ-regulatorische Schleife auf transkriptioneller Ebene gibt. Für solch einen Regulationsmechanismus spricht, dass es auch für WT ES-Zellen essentiell sein könnte, eine kritische SOX2-Proteinmenge nicht zu überschreiten.

In der spontanen Differenzierung von humanen ES-Zellen über die Ausbildung von EBs war auffällig, dass vier Tage nach dem Plattieren der EBs die Expression des frühen neuralen Markers NESTIN weitläufig ausgeprägt war. Im Gegensatz dazu waren weniger Zellen für den späten neuralen Marker TUJ1 positiv als bei nicht-induzierten Kontrollzellen. Scheinbar unterstützt die transgene SOX2-Expression eine neuroektodermale Induktion. Die transgene SOX2-Expression ist jedoch nicht ausreichend, um eine Entwicklung in Zelltypen der anderen beiden Keimblätter vollständig zu blockieren. Dies könnte erklären, warum SOX2-überexprimierende ES-Zellen eine abnormale Koexpression von Genen aufweisen. Beispielsweise verhindert die Überexpression von SOX2 nicht die Koexpression des endodermalen Markers

AFP. Wohingegen AFP und SOX2 in nicht-induzierten Kontrollzellen nicht koexprimiert werden.

Die Beobachtung der inhibierten neuronalen Progression von SOX2-überexprimierenden Zellen setzt sich in Immunfärbungen von 9 Tage alten plattierten EBs fort. TUJ1-positive Cre-induzierte Zellen hatten im direkten Vergleich kürzere Zellfortsätze (Neuriten) als nicht-induzierte Kontrollzellen. Andererseits wurden bei der Cre-induzierten Zellpopulation größere Zellaggregate mit großflächigeren PAX6-positiven Arealen als bei den Kontrollzellen detektiert. TUJ1 als neuronaler Marker erscheint im zeitlichen Verlauf der Neurogenese erst nach erfolgter Expression von PAX6. Somit könnte aus den Beobachtungen die Hypothese aufgestellt werden, dass SOX2 Zellen in der spontanen Differenzierung vermehrt neurale Vorläuferzellen bilden, die aber ein vermindertes terminales Differenzierungspotential besitzen. Eine anhaltende SOX2-Überexpression friert die Zellen gewissermaßen im Stadium einer neuronalen Vorläuferpopulation ein. *In vivo* wird die Sox2-Expression in der Maus und dem Menschen mit dem Erhalt von neuronalen Stammzellen (Ferri et al., 2004; Graham et al., 2003; Suh et al., 2007; Taranova et al., 2006) in Verbindung gebracht. Studien in neuronalen Vorläuferzellen des Huhns zeigten, dass eine Inhibition der Sox2 Aktivität zum Zellzyklusarrest führt. Erst im Anschluss an den Zellzyklusarrest erfolgte die neuronale Differenzierung der Zellen (Bylund et al., 2003; Graham et al. 2003, Tanaka et al., 2004). In Übereinstimmung damit ist auch, dass der Transkriptionsfaktor PAX6 in der Literatur als Marker für Neuronale Stammzellen (NSZ) beschrieben wird (Chambers et al., 2009). Untersuchungen in dieser Arbeit weisen darauf hin, dass dieser Mechanismus bei humanen Zellen konserviert ist. Es bleibt zu analysieren, ob eine induzierbare Deletion der SOX2-Überexpression zur Reversion und damit verstärkten terminalen neuronalen Differenzierung führt.

4.2.3 SOX2 Expression fördert die direkte Konversion von humanen ES-Zellen in neurale Vorläuferzellen

Durch die Anwendung des Protokolls von Chambers et al. (2009) konnten die bereits beobachteten Unterschiede zwischen Cre-induzierten Zellen und nicht-induzierten Kontrollzellen in der EB-basierten Differenzierung bestätigt und untermauert werden. Wie schon in den vorhergehenden Differenzierungsansätzen konnten in allen Cre-induzierten Zellen die Expression von SOX2 immundetektiert werden. Im Vergleich dazu waren bei den nicht-induzierten Kontrollzellen nur vereinzelte Zellen SOX2 positiv. Interessanterweise waren in der Kontrollzellpopulation die wenigsten PAX6-positiven Zellen auch positiv für

SOX2. Beide Transkriptionsfaktoren gelten als Marker für neurale Stammzellen (Conti et al., 2006; Elkabetz et al., 2008; Koch et al., 2009; Shin et al., 2006; Tabar et al., 2005). In der Cre-induzierten Zellpopulation hingegen sind nicht nur mehr SOX2/PAX6 doppelt-positive Zellen sondern insgesamt fünfmal mehr PAX6-positive Zellen zu beobachten. SOX2/PAX6 doppelt-positive Zellen ordneten sich darüber hinaus spontan zu neuronalen Rosetten an (Abb. 27.A). In der neuronalen Differenzierung von humanen ES-Zellen durchläuft die Anordnung der Zellen eine morphologische Veränderung, die durch die Ausbildung radiär angeordneter neuronaler Epithelzellen charakterisiert ist. Diese Anordnung der Zellen wird als Neuronale Rosette bezeichnet, (Elkabetz et al., 2008; Perrier et al., 2004; Zhang et al., 2001). Interessanterweise ordneten sich PAX6-positive SOX2-überexprimierende Zellen spontan zu neuronalen Rosetten an. Bei den Kontrollzellen hingegen war dies nicht zu beobachten. Im beschriebenen Protokoll von Chambers und Kollegen bilden sich neuronale Rosetten erst nach dem Vereinzeln und erneuten Aussäen der Zellen. Dies deutet darauf hin, dass humane SOX2-überexprimierende ES-Zellen schneller und gezielter in neuronale Zellen differenziert werden können. Daten einer kürzlich erschienen Studie von Chng und Kollegen (2010) unterstützen die Idee einer beschleunigten neuronalen Induktion in SOX2-überexprimierenden Zellen. Das Modell der Studie beschreibt *Smad-interacting protein 1* (SIP1) als Regulator der Zelldetermination, dessen Expressionsniveau darüber entscheidet, ob humane ES-Zellen in Neuroektoderm oder Mesendoderm differenzieren. SIP1 induziert Neuroektoderm und inhibiert Mesendoderm, darüber hinaus wird SOX2 als Transaktivator von SIP1 beschrieben (Chng et al., 2010). Letzteres könnte eine Erklärung für den beobachteten neuro-induktiven Effekt der SOX2-Überexpression darstellen. Die SOX2⁺ und PAX6⁺ Zellen der neuronalen Rosetten könnten demnach eines der primitivsten neuronalen Vorläuferzellstadien, die aus humanen ES-Zellen gewonnen wurden, widerspiegeln (Chambers et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass diese so genannten R-NS Zellen (*rosette neural stem cells*) in der terminalen Differenzierung eine für den vorderen Bereich des ZNS (Zentrale Nervensystem) typische Markerexpression annehmen (Elkabetz et al., 2008). Es ist bis dato nicht gelungen, Zellen aus meinen Ansätzen der direkten Konversion zu passagieren und expandieren, um deren Zellschicksal weitergehend untersuchen zu können. Des Weiteren lässt sich aus der Analyse der Experimente schließen, dass FGF-2 für die direkte Konversion von humanen ES-Zellen, in neuronale Vorläuferzellen essentiell ist. Sowohl Cre-induzierte und nicht-induzierte ES-Zellen, die mit einem Inhibitor für den FGF Rezeptor-1 (SU4502; Xu et al., 2008) behandelt wurden, sterben ab. Dieser Entzug von bFGF führt bei der direkten Konversion zu einer geringeren Zelldichte. Der Beobachtung, dass der Entzug von bFGF bei der direkten

Konversion zu einer geringeren Zelldichte führt, kommt eine besondere Bedeutung zu. Diese Beobachtung befindet sich in Einklang mit der Hypothese, dass FGF-2 nicht für die Akquisition der neuralen Zelldetermination wichtig ist, sondern dass FGF-2 durch seinen proliferativen Effekt die neurale Differenzierung einer Zellpopulation unterstützt (Smukler et al., 2006). Demnach hätte FGF-2 keinen induktiven Effekt auf die neurale Differenzierung *in vitro*, sondern wäre essentiell für die Proliferation und/oder das Überleben von neuralen Stammzellen. Es kann festgehalten werden, dass die Cre-induzierbare SOX2-Überexpression ein sehr wertvolles zelluläres Modell für die Untersuchung der frühen neuralen Induktion in humanen Zellen ist.

4.3 Ausblick

Durch eine kombinierte Anwendung von zell-permeablen TAT-Cre, TAT-FLP und TAT-Dre können weitaus komplexere konditionale Strategien umgesetzt werden. Den Rekombinasen könnten einzelne Aufgaben zugeordnet werden, wie beispielsweise das Recyclen von Resistenzmarkern für FLP und die konditionale Mutagenese unterschiedlicher Genabschnitte durch die sequentielle Anwendung von TAT-Cre und TAT-Dre.

Das entwickelte Dre-Transduktionssystem könnte zum Einsatz kommen, um Reprogrammierungsfaktoren nach erfolgter Reprogrammierung aus dem Genom zu entfernen. Dadurch bliebe das Cre-loxP System weiterhin für *fatemapping*-Analysen im Zuge der Reprogrammierung anwendbar.

Das DrePBD* eignet sich im Gegensatz zu FLPERT2 (Hunter et al., 2004) für eine kombinierte Anwendung mit CreERT2 (Feil et al., 1996). Tamoxifen und CreERT2 zusammen mit RU486 und DrePBD* könnten benutzt werden, um Zielgene reversibel zu induzieren. Denkbar wäre ein Expressionssystem, dass durch die Applikation von Tamoxifen und der damit induzierten Cre-Aktivität eine Genexpression an- und durch die Applikation von RU486 und der damit induzierten Dre-Aktivität ausschalten könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Umsetzung einer konditionalen RNAi-Strategie das Cre-Transduktionssystem mit dem lentiviralen Vektor pSico kombiniert. Dieses System soll nun in humane ES-Zellen übertragen werden, um die Rolle des Transkriptionsfaktors SOX2 in der Pluripotenzerhaltung und in der neuralen Differenzierung eingehender zu untersuchen.

Die reversibel induzierbare BOI-Sox2/SOX2-IP-Expressionkassette wurde zur konditionalen Überexpression des Transkriptionsfaktors Sox2 in murinen und humanen ES-Zellen genutzt. Durch diesen genetischen Ansatz konnte der neuro-induktive Effekt der SOX2-Überexpression während Differenzierung gezeigt werden. Darauf aufbauend, wäre es von besonderem

Interesse diesen Effekt durch die Applikation von zell-permeablem Sox2-Protein (Bosnali und Edenhofer, 2008) nachzuahmen, um ES-Zellen gezielt und effizient ohne genetische Modifikation in neurale Vorläuferzellen zu differenzieren oder gar direkt zu konvertieren. Beobachtungen dieser Studie deuten daraufhin, dass eine SOX2-Überexpression ES-Zellen in der neuronalen Differenzierung in einem Vorläuferzellstadium einfriert. Hieraus und aus der kürzlich erschienen Publikation von Vierbuchen et al (2010) könnte sich ein Reprogrammierungsansatz ergeben, bei dem über die Modulation des Sox2-Expressionsniveau und in Kombination mit weiteren für neurale Stammzellen spezifische Faktoren, somatische Zellen direkt in neurale Vorläufer- bzw. Stammzellen konvertiert werden könnten.

5 Zusammenfassung

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind sowohl für die Entwicklungsbiologie als auch für die biomedizinische Forschung von besonderem Interesse. Humane ES-Zellen eröffnen die Möglichkeit, *in vitro* neue Erkenntnisse über die frühe Embryonalentwicklung des Menschen zu gewinnen. Das *high mobility group* DNA Bindeprotein Sox2 ist einer der Schlüsselfaktoren während der Embryogenese der Maus, sowohl in der Präimplantationsphase als auch in der frühen neuralen Entwicklungsphase. Im Rahmen dieser Dissertation sollte die funktionale Rolle des Transkriptionsfaktors SOX2 insbesondere in der frühen neuralen Differenzierung von humanen ES-Zellen analysiert werden.

Da sich humane ES-Zellen im Vergleich zu murinen ES-Zellen ungleich schlechter genetisch modifizieren lassen, wurde ein genetisches Verfahren entwickelt und optimiert, das eine konditionale und kontrollierbare Transgenexpression in humanen ES-Zellen ermöglicht. Die Anwendung der Proteintransduktionstechnik auf ortsspezifische DNA-Rekombinasen erlaubt die hocheffiziente Regulation konditionaler Genexpressionen. In der vorliegenden Arbeit wurde das FLP-Transduktions-System, für die Verwendung in murinen ES-Zellen bis zu einer Rekombinationseffizienz von über 70% optimiert. Die Keimbahngängigkeit von TAT-FLP behandelten ES-Zellen blieb dabei erhalten. Analog zu TAT-FLP wurde eine membranpermeable Version der Dre-Rekombinase entwickelt, um das Spektrum an Rekombinasewerkzeugen zu erweitern.

Mit Hilfe konditionaler Expressionskassetten, die sowohl *gain-of-function* als auch *loss-of-function* Studien erlauben, wurde in Kombination mit zell-permeablen Rekombinasen eine funktionelle Analyse des Transkriptionsfaktors Sox2 durchgeführt. Der Cre-induzierbare *knockdown* von Sox2 zeigte, dass der Transkriptionsfaktor für den Erhalt des undifferenzierten Status von murinen ES-Zellen notwendig ist. Eine Cre-induzierbare Sox2-Überexpression reichte hingegen nicht aus, um murine ES-Zellen in Abwesenheit der extrinsischen Faktoren LIF und BMP4 zu kultivieren, wie es für die Überexpression von Nanog, einem weiteren Pluripotenzfaktor, beschrieben ist. Eine Cre-induzierbare SOX2-Überexpression in humanen ES-Zellen ist ebenfalls nicht in der Lage, die Pluripotenz in Abwesenheit des extrinsischen Pluripotenzfaktors bFGF aufrecht zu erhalten. Allerdings ergab die Genexpressionsanalyse ausgewählter Marker, dass in SOX2-überexprimierenden Zellen während der Differenzierung die Pluripotenz-assoziierten Gene LEFTY, NANOG und OCT3/4 hochreguliert sind. Dies scheint ein Indiz dafür zu sein, dass in spontan differenzierenden Zellen die SOX2-Überexpression einen stabilisierenden Effekt auf das

Pluripotenznetzwerk in humanen ES-Zellen ausübt und der Differenzierungsprozess dadurch zeitlich verzögert abläuft. Immunzytologische Färbungen gegen Marker aller drei Keimblätter wiesen auf einen neuro-induktiven Effekt der SOX2-Überexpression während der spontanen Differenzierung hin. Dieser neuro-induktive Effekt wurde bei der direkten Konversion von humanen ES-Zellen in neurale Vorläuferzellen bestätigt. SOX2-überexprimierende humane ES-Zellen differenzierten überwiegend in neurale PAX6-positive Zellen, welche sich darüber hinaus spontan zu neuralen Rosetten anordneten. Die Untersuchungen dieser Arbeit weisen auf eine konservierte Rolle von Sox2 bei Maus und Mensch in der frühen neuralen Differenzierung hin.

6 Literaturverzeichnis

- Ahn, S. & Joyner, A. L. (2004) Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell*, 118(4), 505-16.
- Alexopoulou, A. N., Couchman, J. R. & Whiteford, J. R. (2008) The cmv early enhancer/chicken beta actin (cag) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors. *BMC Cell Biol*, 9(2).
- Amabile, G. & Meissner, A. (2009) Induced pluripotent stem cells: Current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med*, 15(2), 59-68.
- Ambros, V. (2004) The functions of animal micrnas. *Nature*, 431(7006), 350-5.
- Ambrosetti, D. C., Basilico, C. & Dailey, L. (1997) Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by sox2 and oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol Cell Biol*, 17(11), 6321-9.
- Amin, A., Roca, H., Luetke, K. & Sadowski, P. D. (1991) Synapsis, strand scission, and strand exchange induced by the flp recombinase: Analysis with half-*flp* sites. *Mol Cell Biol*, 11(9), 4497-508.
- Anastassiadis, K., Fu, J., Patsch, C., Hu, S., Weidlich, S., Duerschke, K., Buchholz, F., Edenhofer, F. & Stewart, A. F. (2009) Dre recombinase, like cre, is a highly efficient site-specific recombinase in e. Coli, mammalian cells and mice. *Dis Model Mech*, 2(9-10), 508-15.
- Andersen, J. B., Sternberg, C., Poulsen, L. K., Bjorn, S. P., Givskov, M. & Molin, S. (1998) New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 64(6), 2240-6.
- Andreas, S., Schwenk, F., Kuter-Luks, B., Faust, N. & Kuhn, 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(11), 2299-306.
- Aubert, J., Dunstan, H., Chambers, I. & Smith, A. (2002) Functional gene screening in embryonic stem cells implicates wnt antagonism in neural differentiation. *Nat Biotechnol*, 20(12), 1240-5.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N. & Lovell-Badge, R. (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on sox2 function. *Genes Dev*, 17(1), 126-40.
- Baer, A. & Bode, J. (2001) Coping with kinetic and thermodynamic barriers: Rmce, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Curr Opin Biotechnol*, 12(5), 473-80.
- Baldino, F., Jr., Chesselet, M. F. & Lewis, M. E. (1989) High-resolution in situ hybridization histochemistry. *Methods Enzymol*, 168(761-77).
- Bartel, D. P. (2004) Micrnas: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-97.
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S. L. & Lander, E. S. (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125(2), 315-26.
- Boer, B., Kopp, J., Mallanna, S., Desler, M., Chakravarthy, H., Wilder, P. J., Bernadt, C. & Rizzino, A. (2007) Elevating the levels of sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of sox2:Oct-3/4 target genes. *Nucleic Acids Res*, 35(6), 1773-86.
- 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(6), 1207-17.
- Bonifaci, N., Sitia, R. & Rubartelli, A. (1995) Nuclear translocation of an exogenous fusion protein containing hiv tat requires unfolding. *AIDS*, 9(9), 995-1000.

- Bosnali, M. & Edenhofer, F. (2008) Generation of transducible versions of transcription factors oct4 and sox2. *Biol Chem*, 389(7), 851-61.
- Bosnali, M., Munst, B., Thier, M. & Edenhofer, F. (2009) Deciphering the stem cell machinery as a basis for understanding the molecular mechanism underlying reprogramming. *Cell Mol Life Sci*, 66(21), 3403-20.
- Bowles, J., Schepers, G. & Koopman, P. (2000) Phylogeny of the sox family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*, 227(2), 239-55.
- 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(6), 947-56.
- Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., Levine, S. S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M. K., Bell, G. W., Otte, A. P., Vidal, M., Gifford, D. K., Young, R. A. & Jaenisch, R. (2006) Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, 441(7091), 349-53.
- Branda, C. S. & Dymecki, S. M. (2004) Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell*, 6(1), 7-28.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. (2002) A system for stable expression of short interfering rnas in mammalian cells. *Science*, 296(5567), 550-3.
- Brustle, 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(26), 14809-14.
- Buchholz, F., Angrand, P. O. & Stewart, A. F. (1996) A simple assay to determine the functionality of cre or flp recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res*, 24(15), 3118-9.
- Buchholz, F., Angrand, P. O. & Stewart, A. F. (1998) Improved properties of flp recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol*, 16(7), 657-62.
- 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(21), 4256-62.
- Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., Mclay, R., Hall, J., Ying, Q. L. & Smith, A. (2008) Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*, 135(7), 1287-98.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitsch, B. G. & Muhr, J. (2003) Vertebrate neurogenesis is counteracted by sox1-3 activity. *Nat Neurosci*, 6(11), 1162-8.
- 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(1), 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(5), 643-55.
- 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(7173), 1230-4.
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M. & Studer, L. (2009) Highly efficient neural conversion of human es and ips cells by dual inhibition of smad signaling. *Nat Biotechnol*, 27(3), 275-80.
- Chen, L., Yabuuchi, A., Eminli, S., Takeuchi, A., Lu, C. W., Hochedlinger, K. & Daley, G. Q. (2009) Cross-regulation of the nanog and cdx2 promoters. *Cell Res*, 19(9), 1052-61.
- Chickarmane, V., Troein, C., Nuber, U. A., Sauro, H. M. & Peterson, C. (2006) Transcriptional dynamics of the embryonic stem cell switch. *PLoS Comput Biol*, 2(9), e123.

- Chng, Z., Teo, A., Pedersen, R. A. & Vallier, L. Sip1 mediates cell-fate decisions between neuroectoderm and mesendoderm in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 6(1), 59-70.
- Collignon, J., Sockanathan, S., Hacker, A., Cohen-Tannoudji, M., Norris, D., Rastan, S., Stevanovic, M., Goodfellow, P. N. & Lovell-Badge, R. (1996) A comparison of the properties of sox-3 with sry and two related genes, sox-1 and sox-2. *Development*, 122(2), 509-20.
- Console, S., Marty, C., Garcia-Echeverria, C., Schwendener, R. & Ballmer-Hofer, K. (2003) Antennapedia and hiv transactivator of transcription (tat) "Protein transduction domains" Promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J Biol Chem*, 278(37), 35109-14.
- Conti, L., Reitano, E. & Cattaneo, E. (2006) Neural stem cell systems: Diversities and properties after transplantation in animal models of diseases. *Brain Pathol*, 16(2), 143-54.
- Corish, P. & Tyler-Smith, C. (1999) Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng*, 12(12), 1035-40.
- Darr, H., Mayshar, Y. & Benvenisty, N. (2006) Overexpression of nanog in human es cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development*, 133(6), 1193-201.
- Derossi, D., Chassaing, G. & Prochiantz, A. (1998) Trojan peptides: The penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol*, 8(2), 84-7.
- Desbaillets, I., Ziegler, U., Groscurth, P. & Gassmann, M. (2000) Embryoid bodies: An in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol*, 85(6), 645-51.
- Dietz, G. P. & Bahr, M. (2004) Delivery of bioactive molecules into the cell: The trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci*, 27(2), 85-131.
- Du, Z. W., Hu, B. Y., Ayala, M., Sauer, B. & Zhang, S. C. (2009) Cre recombination-mediated cassette exchange for building versatile transgenic human embryonic stem cells lines. *Stem Cells*, 27(5), 1032-41.
- Dymecki, S. M. & Tomasiewicz, H. (1998) Using flp-recombinase to characterize expansion of wnt1-expressing neural progenitors in the mouse. *Dev Biol*, 201(1), 57-65.
- Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N. D., Tabar, V. & Studer, L. (2008) Human es cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev*, 22(2), 152-65.
- Elliott, G. & O'hare, P. (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, 88(2), 223-33.
- Ellis, P., Fagan, B. M., Magness, S. T., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., McMahon, A., Rao, M. & Pevny, L. (2004) Sox2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci*, 26(2-4), 148-65.
- Esposito, D. & Scoocca, J. J. (1997) The integrase family of tyrosine recombinases: Evolution of a conserved active site domain. *Nucleic Acids Res*, 25(18), 3605-14.
- Evans, M. J. & Kaufman, M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154-6.
- Falnes, P. O. & Sandvig, K. (2000) Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol*, 12(4), 407-13.
- 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(2), 664-8.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., Lemeur, M., Metzger, D. & Chambon, P. (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(20), 10887-90.

- Ferri, A. L., Cavallaro, M., Braidà, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P. P., Sala, M., De Biasi, S. & Nicolis, S. K. (2004) Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, 131(15), 3805-19.
- Fong, H., Hohenstein, K. A. & Donovan, P. J. (2008) Regulation of self-renewal and pluripotency by sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26(8), 1931-8.
- Fraidenraich, D., Lang, R. & Basilico, C. (1998) Distinct regulatory elements govern fgf4 gene expression in the mouse blastocyst, myotomes, and developing limb. *Dev Biol*, 204(1), 197-209.
- Frankel, A. D. & Pabo, C. O. (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6), 1189-93.
- Garcia-Otin, A. L. & Guillou, F. (2006) Mammalian genome targeting using site-specific recombinases. *Front Biosci*, 11(1108-36).
- Glaser, S., Anastassiadis, K. & Stewart, A. F. (2005) Current issues in mouse genome engineering. *Nat Genet*, 37(11), 1187-93.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. & Pevny, L. (2003) Sox2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, 39(5), 749-65.
- Green, M. & Loewenstein, P. M. (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*, 55(6), 1179-88.
- Gu, H., Marth, J. D., Orban, P. C., Mossmann, H. & Rajewsky, K. (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in t cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 265(5168), 103-6.
- Gu, P., Goodwin, B., Chung, A. C., Xu, X., Wheeler, D. A., Price, R. R., Galardi, C., Peng, L., Latour, A. M., Koller, B. H., Gossen, J., Kliever, S. A. & Cooney, A. J. (2005) Orphan nuclear receptor Irh-1 is required to maintain oct4 expression at the epiblast stage of embryonic development. *Mol Cell Biol*, 25(9), 3492-505.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. & Lovell-Badge, R. (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346(6281), 245-50.
- Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R. & Young, R. A. (2007) A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*, 130(1), 77-88.
- Han, K., Jeon, M. J., Kim, S. H., Ki, D., Bahn, J. H., Lee, K. S., Park, J. & Choi, S. Y. (2001) Efficient intracellular delivery of an exogenous protein gfp with genetically fused basic oligopeptides. *Mol Cells*, 12(2), 267-71.
- Harris, M. C., D'Angio, C. T., Gallagher, P. R., Kaufman, D., Evans, J. & Kilpatrick, L. (2005) Cytokine elaboration in critically ill infants with bacterial sepsis, necrotizing enterocolitis, or sepsis syndrome: Correlation with clinical parameters of inflammation and mortality. *J Pediatr*, 147(4), 462-8.
- Haupt, S., Edenhofer, F., Peitz, M., Leinhaas, A. & Brustle, O. (2007) Stage-specific conditional mutagenesis in mouse embryonic stem cell-derived neural cells and postmitotic neurons by direct delivery of biologically active cre recombinase. *Stem Cells*, 25(1), 181-8.
- Hayashi, S. & McMahon, A. P. (2002) Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of cre: A tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol*, 244(2), 305-18.
- Hochedlinger, K. & Plath, K. (2009) Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*, 136(4), 509-23.
- Hoess, R. H., Wierzbicki, A. & Abremski, K. (1986) The role of the loxp spacer region in p1 site-specific recombination. *Nucleic Acids Res*, 14(5), 2287-300.
- Hoess, R. H., Ziese, M. & Sternberg, N. (1982) P1 site-specific recombination: Nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(11), 3398-402.

- Hunter, N. L., Awatramani, R. B., Farley, F. W. & Dymecki, S. M. (2005) Ligand-activated flpe for temporally regulated gene modifications. *Genesis*, 41(3), 99-109.
- Hwang, S., Tamilarasu, N., Kibler, K., Cao, H., Ali, A., Ping, Y. H., Jeang, K. T. & Rana, T. M. (2003) Discovery of a small molecule tat-trans-activation-responsive rna antagonist that potently inhibits human immunodeficiency virus-1 replication. *J Biol Chem*, 278(40), 39092-103.
- Imai, T., Jiang, M., Chambon, P. & Metzger, D. (2001) Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid x receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric cre recombinase (cre-ert2) in adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(1), 224-8.
- Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J. M., Xiao, J. H., Chambon, P. & Metzger, D. (1999) Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: Comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible cre-er(t) and cre-er(t2) recombinases. *Nucleic Acids Res*, 27(22), 4324-7.
- Inoue, M., Kamachi, Y., Matsunami, H., Imada, K., Uchikawa, M. & Kondoh, H. (2007) Pax6 and sox2-dependent regulation of the sox2 enhancer n-3 involved in embryonic visual system development. *Genes Cells*, 12(9), 1049-61.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H. & Benvenisty, N. (2000) Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med*, 6(2), 88-95.
- Ivanova, N., Dobrin, R., Lu, R., Kotenko, I., Levorse, J., Decoste, C., Schafer, X., Lun, Y. & Lemischka, I. R. (2006) Dissecting self-renewal in stem cells with rna interference. *Nature*, 442(7102), 533-8.
- Jans, D. A. & Hassan, G. (1998) Nuclear targeting by growth factors, cytokines, and their receptors: A role in signaling? *Bioessays*, 20(5), 400-11.
- Jensen, F. C., Girardi, A. J., Gilden, R. V. & Koprowski, H. (1964) Infection of human and simian tissue cultures with rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 52(53-9).
- Joliot, A., Maizel, A., Rosenberg, D., Trembleau, A., Dupas, S., Volovitch, M. & Prochiantz, A. (1998) Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of engrailed homeoprotein. *Curr Biol*, 8(15), 856-63.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M. & Kondoh, H. (2000) Pairing sox off: With partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet*, 16(4), 182-7.
- Kaplan, I. M., Wadia, J. S. & Dowdy, S. F. (2005) Cationic tat peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control Release*, 102(1), 247-53.
- Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S. I. & Sasai, Y. (2000) Induction of midbrain dopaminergic neurons from es cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*, 28(1), 31-40.
- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomeli, H., Nagy, A., McLaughlin, K. J., Scholer, H. R. & Tomilin, A. (2004) Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep*, 5(11), 1078-83.
- Kelberman, D., Rizzoti, K., Avilion, A., Bitner-Glindzicz, M., Cianfarani, S., Collins, J., Chong, W. K., Kirk, J. M., Achermann, J. C., Ross, R., Carmignac, D., Lovell-Badge, R., Robinson, I. C. & Dattani, M. T. (2006) Mutations within sox2/sox2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J Clin Invest*, 116(9), 2442-55.
- Kellendonk, C., Tronche, F., Monaghan, A. P., Angrand, P. O., Stewart, F. & Schutz, G. (1996) Regulation of cre recombinase activity by the synthetic steroid ru 486. *Nucleic Acids Res*, 24(8), 1404-11.
- Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T. & Wiles, M. V. (1993) Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol*, 13(1), 473-86.

- Kiefer, J. C. (2007) Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn*, 236(8), 2356-66.
- Kiernan, A. E., Pelling, A. L., Leung, K. K., Tang, A. S., Bell, D. M., Tease, C., Lovell-Badge, R., Steel, K. P. & Cheah, K. S. (2005) Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature*, 434(7036), 1031-5.
- Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J. & Orkin, S. H. (2008) An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell*, 132(6), 1049-61.
- Klotz, L., Dani, I., Edenhofer, F., Nolden, L., Evert, B., Paul, B., Kolanus, W., Klockgether, T., Knolle, P. & Diehl, L. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma control of dendritic cell function contributes to development of cd4+ t cell anergy. *J Immunol*, 178(4), 2122-31.
- Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J. A., Ladewig, J. & Brustle, O. (2009) A rosette-type, self-renewing human es cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(9), 3225-30.
- Kondo, T. & Raff, M. (2004) Chromatin remodeling and histone modification in the conversion of oligodendrocyte precursors to neural stem cells. *Genes Dev*, 18(23), 2963-72.
- Kondoh, H. & Kamachi, Y. (2009) Sox-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Kopp, J. L., Ormsbee, B. D., Desler, M. & Rizzino, A. (2008) Small increases in the level of sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26(4), 903-11.
- Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S. Y., Suemori, H., Nakatsuji, N. & Tada, T. (2005) Octamer and sox elements are required for transcriptional cis regulation of nanog gene expression. *Mol Cell Biol*, 25(6), 2475-85.
- Kwon, Y. D., Oh, S. K., Kim, H. S., Ku, S. Y., Kim, S. H., Choi, Y. M. & Moon, S. Y. (2005) Cellular manipulation of human embryonic stem cells by tat-pdx1 protein transduction. *Mol Ther*, 12(1), 28-32.
- 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(14), 6232-6.
- Lee, H., Shamy, G. A., Elkabetz, Y., Schofield, C. M., Harrision, N. L., Panagiotakos, G., Socci, N. D., Tabar, V. & Studer, L. (2007) Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem Cells*, 25(8), 1931-9.
- Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., Chevalier, B., Johnstone, S. E., Cole, M. F., Isono, K., Koseki, H., Fuchikami, T., Abe, K., Murray, H. L., Zucker, J. P., Yuan, B., Bell, G. W., Herbolsheimer, E., Hannett, N. M., Sun, K., Odom, D. T., Otte, A. P., Volkert, T. L., Bartel, D. P., Melton, D. A., Gifford, D. K., Jaenisch, R. & Young, R. A. (2006) Control of developmental regulators by polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, 125(2), 301-13.
- Levenstein, M. E., Ludwig, T. E., Xu, R. H., Llanas, R. A., Vandenheuvel-Kramer, K., Manning, D. & Thomson, J. A. (2006) Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*, 24(3), 568-74.
- Lewandoski, M. (2001) Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet*, 2(10), 743-55.
- Li, J., Pan, G., Cui, K., Liu, Y., Xu, S. & Pei, D. (2007) A dominant-negative form of mouse sox2 induces trophectoderm differentiation and progressive polyploidy in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 282(27), 19481-92.
- Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., Maxson, R. E., Schulze, E. N., Song, H., Hsieh, C. L., Pera, M. F. & Ying, Q. L. (2008) Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell*, 135(7), 1299-310.

- Liew, C. G., Draper, J. S., Walsh, J., Moore, H. & Andrews, P. W. (2007) Transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25(6), 1521-8.
- 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(4), 431-40.
- Madore, S. J. & Cullen, B. R. (1993) Genetic analysis of the cofactor requirement for human immunodeficiency virus type 1 tat function. *J Virol*, 67(7), 3703-11.
- Magin, T. M., Mcwhir, J. & Melton, D. W. (1992) A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res*, 20(14), 3795-6.
- Martin, G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12), 7634-8.
- Maruyama, M., Ichisaka, T., Nakagawa, M. & Yamanaka, S. (2005) Differential roles for sox15 and sox2 in transcriptional control in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 280(26), 24371-9.
- 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(6), 625-35.
- Masui, S., Ohtsuka, S., Yagi, R., Takahashi, K., Ko, M. S. & Niwa, H. (2008) Rex1/zfp42 is dispensable for pluripotency in mouse es cells. *BMC Dev Biol*, 8(45).
- Matin, M. M., Walsh, J. R., Gokhale, P. J., Draper, J. S., Bahrami, A. R., Morton, I., Moore, H. D. & Andrews, P. W. (2004) Specific knockdown of oct4 and beta2-microglobulin expression by rna interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells*, 22(5), 659-68.
- McLeod, M., Craft, S. & Broach, J. R. (1986) Identification of the crossover site during flp-mediated recombination in the *saccharomyces cerevisiae* plasmid 2 microns circle. *Mol Cell Biol*, 6(10), 3357-67.
- Miller, C. A., Patterson, W. L., Johnson, P. K., Swartzell, C. T., Wogoman, F., Albarella, J. P. & Carrico, R. J. (1988) Detection of bacteria by hybridization of rna with DNA-latex and immunodetection of hybrids. *J Clin Microbiol*, 26(7), 1271-6.
- 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(5), 631-42.
- Munst, B., Patsch, C. & Edenhofer, F. (2009) Engineering cell-permeable protein. *J Vis Exp*, 34).
- Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A. & Dowdy, S. F. (1998) Transduction of full-length tat fusion proteins into mammalian cells: Tat-p27kip1 induces cell migration. *Nat Med*, 4(12), 1449-52.
- Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J. C., Jones, A. T., Sugiura, Y. & Futaki, S. (2004) Cellular uptake of arginine-rich peptides: Roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol Ther*, 10(6), 1011-22.
- Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., Yagi, K., Miyazaki, J., Matoba, R., Ko, M. S. & Niwa, H. (2006) Klf4 cooperates with oct3/4 and sox2 to activate the lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 26(20), 7772-82.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H. & Smith, A. (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the pou transcription factor oct4. *Cell*, 95(3), 379-91.

- Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A. & Muramatsu, M. (1999) The gene for the embryonic stem cell coactivator *Utf1* carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of *oct-3/4* and *sox-2*. *Mol Cell Biol*, 19(8), 5453-65.
- 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(13), 2048-60.
- Niwa, H., Masui, S., Chambers, I., Smith, A. G. & Miyazaki, J. (2002) Phenotypic complementation establishes requirements for specific *pou* domain and generic transactivation function of *oct-3/4* in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 22(5), 1526-36.
- Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A. G. (2000) Quantitative expression of *oct-3/4* defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of es cells. *Nat Genet*, 24(4), 372-6.
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D. & Adachi, K. (2009) A parallel circuit of *lif* signalling pathways maintains pluripotency of mouse es cells. *Nature*, 460(7251), 118-22.
- Nolden, L., Edenhofer, F., Peitz, M. & Brustle, O. (2007) Stem cell engineering using transducible cre recombinase. *Methods Mol Med*, 140(17-32).
- O'gorman, S., Dagenais, N. A., Qian, M. & Marchuk, Y. (1997) Protamine-cre recombinase transgenes efficiently recombine target sequences in the male germ line of mice, but not in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26), 14602-7.
- Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A. C., Segal, M. & McKay, R. D. (1996) Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev*, 59(1), 89-102.
- Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H. & Ishikawa, F. (2005) *Oct-3/4* and *sox2* regulate *oct-3/4* gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 280(7), 5307-17.
- Pan, G., Li, J., Zhou, Y., Zheng, H. & Pei, D. (2006) A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *FASEB J*, 20(10), 1730-2.
- Patsch, C. & Edenhofer, F. (2007) Conditional mutagenesis by cell-permeable proteins: Potential, limitations and prospects. *Handb Exp Pharmacol*, 178, 203-32.
- Peitz, M., Jager, R., Patsch, C., Jager, 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(8), 508-17.
- 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(7), 4489-94.
- Perrier, A. L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M. E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N. L. & Studer, L. (2004) Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(34), 12543-8.
- Pevny, L. & Placzek, M. (2005) *Sox* genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol*, 15(1), 7-13.
- Prochiantz, A. (2000) Messenger proteins: Homeoproteins, *tat* and others. *Curr Opin Cell Biol*, 12(4), 400-6.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S. & Khvorova, A. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*, 22(3), 326-30.
- Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H. & Robson, P. (2005) Transcriptional regulation of *nanog* by *oct4* and *sox2*. *J Biol Chem*, 280(26), 24731-7.
- Rosner, M. H., De Santo, R. J., Arnheiter, H. & Staudt, L. M. (1991) *Oct-3* is a maternal factor required for the first mouse embryonic division. *Cell*, 64(6), 1103-10.

- Rossant, J. & Tam, P. P. (2009) Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development*, 136(5), 701-13.
- Rothbard, J. B., Jessop, T. C. & Wender, P. A. (2005) Adaptive translocation: The role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(4), 495-504.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-4.
- Sambrook, J. & Gething, M. J. (1989) Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*, 342(6247), 224-5.
- 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(20), 6086-95.
- 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(20), 6086-95.
- 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(1), 6-10.
- Scholer, H. R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K. & Gruss, P. (1990) New type of pou domain in germ line-specific protein oct-4. *Nature*, 344(6265), 435-9.
- Schoorlemmer, J., Van Puijenbroek, A., Van Den Eijnden, M., Jonk, L., Pals, C. & Kruijer, W. (1994) Characterization of a negative retinoic acid response element in the murine oct4 promoter. *Mol Cell Biol*, 14(2), 1122-36.
- Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S. F. (1999) In vivo protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, 285(5433), 1569-72.
- Schwenk, F., Kuhn, R., Angrand, P. O., Rajewsky, K. & Stewart, A. F. (1998) Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res*, 26(6), 1427-32.
- Shi, W., Wang, H., Pan, G., Geng, Y., Guo, Y. & Pei, D. (2006) Regulation of the pluripotency marker rex-1 by nanog and sox2. *J Biol Chem*, 281(33), 23319-25.
- Shin, S., Mitalipova, M., Noggle, S., Tibbitts, D., Venable, A., Rao, R. & Stice, S. L. (2006) Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions. *Stem Cells*, 24(1), 125-38.
- Silver, D. P. & Livingston, D. M. (2001) Self-excising retroviral vectors encoding the cre recombinase overcome cre-mediated cellular toxicity. *Mol Cell*, 8(1), 233-43.
- Singh, A. M., Hamazaki, T., Hankowski, K. E. & Terada, N. (2007) A heterogeneous expression pattern for nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25(10), 2534-42.
- Skehel, J. J., Cross, K., Steinhauer, D. & Wiley, D. C. (2001) Influenza fusion peptides. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 4), 623-6.
- 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(6200), 688-90.
- Smith, J. R., Vallier, L., Lupo, G., Alexander, M., Harris, W. A. & Pedersen, R. A. (2008) Inhibition of activin/nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Dev Biol*, 313(1), 107-17.
- Smith, W. C. & Harland, R. M. (1992) Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the spemann organizer in xenopus embryos. *Cell*, 70(5), 829-40.

- Smukler, S. R., Runciman, S. B., Xu, S. & Van Der Kooy, D. (2006) Embryonic stem cells assume a primitive neural stem cell fate in the absence of extrinsic influences. *J Cell Biol*, 172(1), 79-90.
- Stadtfeld, M. & Hochedlinger, K. (2009) Without a trace? Piggyback-ing toward pluripotency. *Nat Methods*, 6(5), 329-30.
- Stark, W. M., Boocock, M. R. & Sherratt, D. J. (1992) Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet*, 8(12), 432-9.
- Sugiyama, S., Di Nardo, A. A., Aizawa, S., Matsuo, I., Volovitch, M., Prochiantz, A. & Hensch, T. K. (2008) Experience-dependent transfer of otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell*, 134(3), 508-20.
- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'amour, K. A. & Gage, F. H. (2007) In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of sox2⁺ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 1(5), 515-28.
- Tabar, V., Panagiotakos, G., Greenberg, E. D., Chan, B. K., Sadelain, M., Gutin, P. H. & Studer, L. (2005) Migration and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells in the rat brain. *Nat Biotechnol*, 23(5), 601-6.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-76.
- Tanaka, S., Kamachi, Y., Tanouchi, A., Hamada, H., Jing, N. & Kondoh, H. (2004) Interplay of sox and pou factors in regulation of the nestin gene in neural primordial cells. *Mol Cell Biol*, 24(20), 8834-46.
- Taranova, O. V., Magness, S. T., Fagan, B. M., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S. R. & Pevny, L. H. (2006) Sox2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev*, 20(9), 1187-202.
- Ten Berge, D., Koole, W., Fuerer, C., Fish, M., Eroglu, E. & Nusse, R. (2008) Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell Stem Cell*, 3(5), 508-18.
- Thompson, S., Clarke, A. R., Pow, A. M., Hooper, M. L. & Melton, D. W. (1989) Germ line transmission and expression of a corrected hprt gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell*, 56(2), 313-21.
- Thomson, J. A., 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(5391), 1145-7.
- Thorpe, H. M. & Smith, M. C. (1998) In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(10), 5505-10.
- Tokuzawa, Y., Kaiho, E., Maruyama, M., Takahashi, K., Mitsui, K., Maeda, M., Niwa, H. & Yamanaka, S. (2003) Fbx15 is a novel target of oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Mol Cell Biol*, 23(8), 2699-708.
- Tomioka, M., Nishimoto, M., Miyagi, S., Katayanagi, T., Fukui, N., Niwa, H., Muramatsu, M. & Okuda, A. (2002) Identification of sox-2 regulatory region which is under the control of oct-3/4-sox-2 complex. *Nucleic Acids Res*, 30(14), 3202-13.
- Trounson, A. (2009) Rats, cats, and elephants, but still no unicorn: Induced pluripotent stem cells from new species. *Cell Stem Cell*, 4(1), 3-4.
- Tunnemann, 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(11), 1775-84.
- Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. & Sharp, P. A. (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*, 13(24), 3191-7.
- Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M. & Giacca, M. (2001) Internalization of HIV-1 Tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, 276(5), 3254-61.

- Uchikawa, M., Kamachi, Y. & Kondoh, H. (1999) Two distinct subgroups of group b sox genes for transcriptional activators and repressors: Their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mech Dev*, 84(1-2), 103-20.
- Vallier, L., Alexander, M. & Pedersen, R. A. (2005) Activin/nodal and fgf pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 118(Pt 19), 4495-509.
- Vegeto, E., Allan, G. F., Schrader, W. T., Tsai, M. J., McDonnell, D. P. & O'malley, B. W. (1992) The mechanism of ru486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell*, 69(4), 703-13.
- Ventura, A., Meissner, A., Dillon, C. P., Mcmanus, M., Sharp, P. A., Van Parijs, L., Jaenisch, R. & Jacks, T. (2004) Cre-lox-regulated conditional rna interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(28), 10380-5.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Sudhof, T. C. & Wernig, M. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 463(7284), 1035-41.
- 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(3), 310-5.
- Wang, G., Zhang, H., Zhao, Y., Li, J., Cai, J., Wang, P., Meng, S., Feng, J., Miao, C., Ding, M., Li, D. & Deng, H. (2005) Noggin and bfgf cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem Biophys Res Commun*, 330(3), 934-42.
- Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D. N., Theunissen, T. W. & Orkin, S. H. (2006) A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, 444(7117), 364-8.
- Wang, Y., Xu, J., Pierson, T., O'malley, B. W. & Tsai, S. Y. (1997) Positive and negative regulation of gene expression in eukaryotic cells with an inducible transcriptional regulator. *Gene Ther*, 4(5), 432-41.
- Wang, Z. X., Teh, C. H., Chan, C. M., Chu, C., Rossbach, M., Kunarso, G., Allapitchay, T. B., Wong, K. Y. & Stanton, L. W. (2008) The transcription factor zfp281 controls embryonic stem cell pluripotency by direct activation and repression of target genes. *Stem Cells*, 26(11), 2791-9.
- Wegner, M. & Stolt, C. C. (2005) From stem cells to neurons and glia: A soxist's view of neural development. *Trends Neurosci*, 28(11), 583-8.
- Wender, P. A., Mitchell, D. J., Pattabiraman, K., Pelkey, E. T., Steinman, L. & Rothbard, J. B. (2000) The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(24), 13003-8.
- Wiebe, M. S., Nowling, T. K. & Rizzino, A. (2003) Identification of novel domains within sox-2 and sox-11 involved in autoinhibition of DNA binding and partnership specificity. *J Biol Chem*, 278(20), 17901-11.
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A. & Gough, N. M. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336(6200), 684-7.
- Wood, H. B. & Episkopou, V. (1999) Comparative expression of the mouse sox1, sox2 and sox3 genes from gastrulation to early somite stages. *Mech Dev*, 86(1-2), 197-201.
- Worsdorfer, P., Maxeiner, S., Markopoulos, C., Kirfel, G., Wulf, V., Auth, T., Urschel, S., Von Maltzahn, J. & Willecke, K. (2008) Connexin expression and functional analysis of gap junctional communication in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26(2), 431-9.
- Wright, E. M., Snopek, B. & Koopman, P. (1993) Seven new members of the sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res*, 21(3), 744.

- Wunderlich, F. T., Wildner, H., Rajewsky, K. & Edenhofer, F. (2001) New variants of inducible cre recombinase: A novel mutant of cre-pr fusion protein exhibits enhanced sensitivity and an expanded range of inducibility. *Nucleic Acids Res*, 29(10), E47.
- Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J. A. & Kosik, K. S. (2009) MicroRNA-145 regulates oct4, sox2, and klf4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*, 137(4), 647-58.
- 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(12), 1261-4.
- Xu, R. H., Peck, R. M., Li, D. S., Feng, X., Ludwig, T. & Thomson, J. A. (2005) Basic fgf and suppression of bmp signaling sustain undifferentiated proliferation of human es cells. *Nat Methods*, 2(3), 185-90.
- Xu, R. H., Sampson-Barron, T. L., Gu, F., Root, S., Peck, R. M., Pan, G., Yu, J., Antosiewicz-Bourget, J., Tian, S., Stewart, R. & Thomson, J. A. (2008) Nanog is a direct target of tgfbeta/activin-mediated smad signaling in human escs. *Cell Stem Cell*, 3(2), 196-206.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. (2003) Bmp induction of id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with stat3. *Cell*, 115(3), 281-92.
- Yu, P. B., Hong, C. C., Sachidanandan, C., Babitt, J. L., Deng, D. Y., Hoynig, S. A., Lin, H. Y., Bloch, K. D. & Peterson, R. T. (2008) Dorsomorphin inhibits bmp signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*, 4(1), 33-41.
- Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C. & Dailey, L. (1995) Developmental-specific activity of the fgf-4 enhancer requires the synergistic action of sox2 and oct-3. *Genes Dev*, 9(21), 2635-45.
- Zafarana, G., Avery, S. R., Avery, K., Moore, H. D. & Andrews, P. W. (2009) Specific knockdown of oct4 in human embryonic stem cells by inducible short hairpin rna interference. *Stem Cells*, 27(4), 776-82.
- Zappone, M. V., Galli, R., Catena, R., Meani, N., De Biasi, S., Mattei, E., Tiveron, C., Vescovi, A. L., Lovell-Badge, R., Ottolenghi, S. & Nicolis, S. K. (2000) Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in cns stem cells. *Development*, 127(11), 2367-82.
- Zervas, M., Millet, S., Ahn, S. & Joyner, A. L. (2004) Cell behaviors and genetic lineages of the mesencephalon and rhombomere 1. *Neuron*, 43(3), 345-57.
- Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O. & Thomson, J. A. (2001) In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 19(12), 1129-33.
- 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(3), 779-89.

7 Eigene Publikationen

Patsch C., Kessler D., Edenhofer F.

Genetic engineering of mammalian cells by direct delivery of FLP recombinase protein
Methods (unter Begutachtung)

Keramari M., Razavi J., Ingman KA., **Patsch C.**, Edenhofer F., Ward CM., Kimber SJ.

Sox2 is essential for formation of trophectoderm in the preimplantation embryo
PLoS ONE (in Revision)

Patsch C.*, Peitz M.*, Otte D., Kessler D., Jungverdorben J., Wunderlich FT., Brüstle O., Zimmer A. Edenhofer F. (2010)

Engineering cell-permeant FLP recombinase for the inducible and reversible overexpression of CDX2 in human embryonic stem cells.

Stem Cells; 28(5):894-902

Münst B.*, **Patsch C. ***, Edenhofer F. (2009)

Engineering cell-permeable protein.

J Vis Exp. (34). pii: 1627. doi: 10.3791/1627

Anastassiadis K., Fu J., **Patsch C.**, Hu S., Weidlich S., Duerschke K., Buchholz F., Edenhofer F., Stewart AF. (2009)

Dre recombinase, like Cre, is a highly efficient site-specific recombinase in E. coli, mammalian cells and mice.

Dis Model Mech.; 2 (9-10):508-15.

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. 27;45 (8):508-517

Patsch C., Edenhofer F. (2007)

Conditional mutagenesis by cell-permeable proteins: potential, limitations and prospects.

Handb Exp Pharmacol.;178 :203-32

Tünnemann, G., Martin, M.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

* diese Autoren haben gleichermaßen zur Arbeit beigetragen

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Oliver Brüstle danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut als auch für die Begutachtung dieser Arbeit und dafür, dass er mir die Teilnahme an der „Summerschool of Hydra“ ermöglichte.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Frank Edenhofer für die Bereitstellung der interessanten und herausfordernden Projekte, die vielfältigen Anregungen, die freundliche Förderung sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der strategischen Ausrichtung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Michael Hoch danke ich, für seine bereitwillige Übernahme diese Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu betreuen.

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

Mein großer Dank gebührt allen Mitarbeitern der Stem Cell Engineering Group, die mir immer mit Rat und Tat helfend zur Seite standen. Die Zusammenarbeit war sehr produktiv und hat schlicht und ergreifend Spaß gemacht. Insbesondere bedanke ich mich bei Matthias Brandt, Daniela Kessler, Johannes Jungverdorben Michael Peitz und Sabine Schenk für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei den Cre-, Dre-, und FLP-Projekten.

Frau Anke Leinhaas danke ich für ihre Unterstützung bei der Fibroblasten Präparation. Bei Frau Banu Meiners sowie Herrn Peter Wurst von der Flow Cytometry Core Facility möchte ich für die Hilfe beim *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)* danken. Bei Frau Anna Magerhans möchte ich mich für die exzellente technische Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit bedanken.

Dem „letzten Mohikaner“ Bernhard Münst bin ich für die zahllosen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Diskussionen und vor allem für den unschätzbaren moralischen Beitrag dankbar.

Meinen Freunden Andre, Dajo, Ines, Markus, Sven und Thomas danke ich für ihre moralischen Beistand.

Meiner Freundin Anna möchte ich für ihre Geduld sowie Fürsorge, aber insbesondere auch für ihre wissenschaftliche Unterstützung danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Undine und Manfred, die immer hinter mir standen und die mich nach Kräften unterstützten. Ihre großzügige finanzielle Förderung ermöglichte mein Studium und die daran anschließende Promotion.

9 Erklärung

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

Bonn, im August 2010

Christoph Patsch