

**Untersuchung posttranslationaler Modifikationen
des Transkriptionsfaktors Oct4 in humanen
embryonalen Stammzellen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sebastian Diecke

aus Elsterwerda

August, 2011

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2005 bis August 2011 unter der Anleitung von Herrn Dr. Daniel Besser am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) in Berlin-Buch angefertigt.

1. Gutachter: Herr Dr. Daniel Besser

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am: 25.11.2011

Es ist besser, unvollkommene Entscheidungen durchzuführen, als beständig nach vollkommenen Entscheidungen zu suchen, die es niemals geben wird.
(Charles de Gaulle)

1 Inhalt

1 INHALT 4

2 ZUSAMMENFASSUNG 7

3 SUMMARY 8

4 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 9

5 EINLEITUNG 10

5.1 DAS STAMMZELLEN KONZEPT : STAMMZELLE IST NICHT GLEICH PLURIPOTENTE ZELLE 11

5.2 MULTIPOTENTE UND UNIPOTENTE ADULTE STAMMZELLEN 11

5.3 PLURIPOTENTE STAMMZELLEN EMBRYONALEN URSPRUNGS 12

 5.3.1 Embryonale Karzinomzellen (EC)..... 12

 5.3.2 Embryonale Stammzellen (ES) aus der inneren Zellmasse der Blastozyste 12

 5.3.3 Embryonale und Adulte Keimbahn-Stammzellen 15

 5.3.4 „Reprogrammierung“ : Künstlich erzeugte pluripotente Stammzellen 15

 5.3.4.1 Induzierte Pluripotente Stammzellen (iPS)..... 16

5.4 MOLEKULARE REGULATION DER SELBSTERNEUERUNG 17

 5.4.1 Unterschiedliche extrinsische Faktoren steuern die Selbsterneuerung der pluripotenten Stammzellen 18

 5.4.1.1 Pluripotenz der mESCs/miPS 18

 5.4.1.2 Pluripotenz der hESCs/hiPS..... 19

 5.4.1.3 Pluripotenz der EpiSCs und das Dogma der naiven Stammzelle 20

 5.4.1.4 G-Protein-gekoppelter Rezeptor und der PKA Signalweg 22

 5.4.2 Komplexe molekulare Regulation der Pluripotenz 24

 5.4.2.1 Intrinsische Regulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz 24

 5.4.2.2 Regulation der Pluripotenz auf epigenetischer Ebene 26

 5.4.2.3 MicroRNAs und Pluripotenz 26

 5.4.2.4 Die zentralen Transkriptionsfaktoren der Pluripotenz 27

 5.4.2.4.1 Oct4 und die Familie der POU-Transkriptionsfaktoren 27

 5.4.2.4.2 Sox2 31

 5.4.2.4.3 Nanog..... 32

5.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 33

6 MATERIAL UND METHODEN 34

6.1 MATERIAL 34

 6.1.1 Chemikalien 34

 6.1.2 Verwendete Zelllinien 35

 6.1.3 Bakterienstämme 35

 6.1.4 Radioaktive Verbindungen..... 36

 6.1.5 Antikörper..... 36

6.1.6	<i>Enzyme</i>	36
6.1.7	<i>Kits</i>	36
6.1.8	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	37
6.1.9	<i>Plasmide</i>	37
6.1.10	<i>Synthetische Oligonukleotide</i>	38
6.1.10.1	PCR.....	38
6.1.10.2	Mutations- und Kolonierungsoligonukleotide.....	38
6.1.10.3	EMSA.....	39
6.1.11	<i>Rekombinante Proteine</i>	39
6.1.12	<i>Puffer und Lösungen</i>	39
6.1.13	<i>Geräte</i>	40
6.1.14	<i>Software</i>	40
6.2	METHODEN.....	41
6.2.1	<i>Zellkultur</i>	41
6.2.1.1	Gewinnung von embryonalen Fibroblasten der Maus (MEFs).....	42
6.2.1.2	Produktion ekotropher Viren zur Herstellung von induzierten pluripotenten Mausstammzellen.....	42
6.2.1.3	Zellkultur der humanen embryonalen Stammzellen.....	44
6.2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	45
6.2.2.1	Klonierungen.....	46
6.2.2.2	Synthese der cDNA für die Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR).....	47
6.2.3	<i>Biochemische Methoden</i>	49
6.2.3.1	Extraktion nukleärer Proteine.....	49
6.2.3.2	Dephosphorylierung von Proteinen mit Alkalischer Phosphatase.....	49
6.2.3.3	Immunopräzipitation.....	49
6.2.3.4	GST- Aufreinigung von rekombinanten Proteinen für den anschließenden in vitro Kinase Assay.....	51
6.2.3.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	53
6.2.3.6	Transfer von Proteinen (Western Blot).....	55
6.2.3.7	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	55
6.2.3.8	EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay).....	57
6.2.4	<i>Reportergenstudien</i>	58
6.2.5	<i>Zellfärbung und Zellsortierung</i>	59
6.2.5.1	Immunfluoreszenz.....	59
6.2.5.2	Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS) und Durchflusszytometrie.....	59
7	ERGEBNISSE	60
7.1	STABILE OCT4-PROTEINEXPRESSION WÄHREND DER FRÜHEN PHASE DER SPONTANEN DIFFERENZIERUNG.....	60
7.2	DIFFERENZIERUNG FÜHRTE ZU VERÄNDERUNG DES OCT4-PHOSPHORYLIERUNGSPROFILS.....	63
7.3	IDENTIFIKATION POTENTIELLER PHOSPHORYLIERUNGSMOTIVE VON OCT4.....	65
7.4	<i>IN VITRO</i> PHOSPHORYLIERUNGSSTUDIEN VON OCT4.....	66
7.5	DIE PKA SIGNALTRANSDUKTIONSKASKADE UND OCT4-PHOSPHORYLIERUNG.....	68
7.6	POTENZIELLE FUNKTION DER OCT4-TRANSKRIPTIONSFAKTOR PHOSPHORYLIERUNG.....	71

7.6.1	<i>Subzelluläre Lokalisation von Oct4</i>	72
7.6.2	<i>Oct4/Sox2 Interaktion ist unabhängig von der Oct4-Phosphorylierung</i>	73
7.6.3	<i>Regulierung der DNA-Bindung</i>	74
7.6.3.1	Oct4 und andere POU-Domänen Transkriptionsfaktoren binden an artifizielle DNA-Bindungsmotive	74
7.6.3.2	Modulation des PKA Signalweges veränderten die Oct4-DNA-Bindung.....	77
7.7	PHOSPHORYLIERUNGSABHÄNGIGE BINDUNG VON OCT4 AN VERSCHIEDEN PROMOTORREGIONEN	80
7.7.1	<i>Oct4-DNA-Bindung während der spontanen Differenzierung</i>	80
7.7.2	<i>Unabhängige Verifizierung der EMSA Studien durch ChIP und Real-Time PCR</i>	81
7.7.3	<i>Die Bindung von Oct4 an einen artifiziellen Nanog-Promotor war ebenfalls phosphorylierungsabhängig</i>	83
7.8	PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER OCT4 PHOSPHORYLIERUNG BEI DER INDUKTION DER PLURIPOTENZ	85
7.8.1	<i>Das humane Oct4 kann während des Reprogrammierungs-prozesses das murine Oct4 ersetzen</i>	86
7.8.2	<i>Mutationen des Oct4-Phosphorylierungsmotives beeinflussen die Induktion von Pluripotenz negativ</i>	88
7.9	WEITERFÜHRENDE VERSUCHE UND VORLÄUFIGE ERGEBNISSE	90
7.9.1	<i>Metabolische Markierung (SILAC) der hESCs zur anschließenden Phosphoprotein Analyse</i>	90
7.9.2	<i>Weitere posttranslationalen Modifikationen von Oct4 wahrscheinlich</i>	92
8	DISKUSSION	94
8.1	OCT4-PHOSPHORYLIERUNGSUNTERSCHIEDE WÄHREND DER SPONTANEN DIFFERENZIERUNG	95
8.2	DER POU-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN OCT4 IST EIN PHOSPHOPROTEIN.....	96
8.3	DIE FUNKTION DER OCT4-PHOSPHORYLIERUNG	98
8.3.1	<i>Subzelluläre Lokalisation</i>	98
8.3.2	<i>Kofaktorbindung</i>	99
8.3.3	<i>Die Oct4-Phosphorylierung moduliert die Oct4-DNA-Bindung</i>	100
8.3.4	<i>Oct4-Protein Stabilität</i>	105
8.4	DER PKA SIGNALWEG UND DIE OCT4-PHOSPHORYLIERUNG BEEINFLUSSEN DIE PLURIPOTENZ UND DIE REPROGRAMMIERUNG.....	106
8.5	MODELLVORSTELLUNG DER PKA VERMITTELTEN OCT4 REGULATION	107
9	LITERATURVERZEICHNIS	109
10	PUBLIKATIONSLISTE	122
11	DANKSAGUNG	123
12	LEBENS LAUF	124
13	ERKLÄRUNG	126

2 Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen (ESC) ist ein komplexer Prozess, der durch das Zusammenspiel verschiedener molekularer Regulationsmechanismen ermöglicht wird. Das Zentrum dieses regulatorischen Netzwerkes bildet ein Transkriptionsfaktorkomplex, bestehend aus Oct4, Sox2 und Nanog. Die Differenzierung der ESCs führt im Allgemeinen zu einem Expressionsverlust dieser Transkriptionsfaktoren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf der spontanen Differenzierung (nCM 3d) zu deutlichen morphologischen und molekularen Veränderungen der humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) kam, während sich die Expression des zentralen Transkriptionsfaktors Oct4 kaum veränderte. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Proteinphosphorylierung die Funktion von Oct4 entscheidend beeinflussen. Mithilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DG) konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen den differenzierungsassoziierten Veränderungen der hESCs und dem Oct4-Phosphorylierungszustand hergestellt werden. Mithilfe bioinformatischer Software wurde eine potentielle Proteinkinase A (PKA) Phosphorylierungsstelle in der Oct4 Aminosäuresequenz identifiziert. Durch *in vitro* Kinase Experimente konnte daraufhin bestätigt werden, dass es sich bei Oct4 um ein Phosphoprotein handelt. Die Modulation der PKA-Signaltransduktionskaskade und Punktmutationen des potentiellen PKA-Phosphorylierungsmotives bedingten eine Veränderung der Proteinauftrennung in der 2-DG.

Als mögliche Konsequenz der Oct4-Phosphorylierung wurden veränderte DNA-Bindungseigenschaften von Oct4 nachgewiesen. Demnach wird die Oct4-DNA-Bindung durch die Phosphorylierung stabilisiert. Neben der differenzierungsabhängigen Dephosphorylierung von Oct4 konnte in einem Reprogrammierungsexperiment die essentielle Bedeutung der Oct4-Phosphorylierung bei der Induktion der Pluripotenz nachgewiesen werden.

Anhand der in dieser Dissertation generierten Daten wurde ein Modell erstellt, in dem versucht wird, die potentielle Funktion der PKA-vermittelten Oct4-Phosphorylierung bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz und der spontanen Differenzierung zu erklären.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Studien bieten somit neue Einblicke in den Regulierungsmechanismus von Oct4 während der spontanen Differenzierung der hESCs und zeigen des Weiteren eine direkte Verbindung zwischen der Phosphorylierung eines der zentralen Transkriptionsfaktoren der Pluripotenz (Oct4) und der Reprogrammierung somatischer Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen.

3 Summary

The maintenance of pluripotency in embryonic stem cells (ESC) is a complex process that is mediated by the interaction of different molecular mechanisms. At the core of these molecular mechanisms lies the autoregulatory complex of the transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog. In general differentiation of the ESCs is associated with the downregulation of these core transcription factors.

In this study, we show that spontaneous differentiation of human embryonic stem cells (hESCs) leads to morphological and molecular changes without a significant decrease in the expression of the core transcription factor Oct4. Therefore, we hypothesized that posttranslational modifications, such as protein phosphorylation, may decisively influence the function of Oct4.

Using two-dimensional gel electrophoresis (2-DG) we established a possible link between the differentiation-associated morphological and molecular changes in the hESCs and the Oct4-phosphorylation state. Bioinformatic analysis identified in the amino acid sequence of Oct4, a putative protein kinase A (PKA) phosphorylation site, which was confirmed by *in vitro* kinase assays. Furthermore, modulation of the PKA signaling pathway and a point mutation of the potential PKA phosphorylation site caused a change in the Oct4 protein migration pattern in the 2-DG.

Furthermore phosphorylation of Oct4 lead to a change in its DNA binding properties, suggesting that phosphorylation may stabilize Oct4 binding to DNA.

Finally, we demonstrate that Oct4 phosphorylation not only influences the maintenance of pluripotency in hESCs, but is also important for the induction of pluripotency in somatic cells. The exact mechanism of how changes in Oct4 phosphorylation influence the global gene expression in these processes remains to be identified.

In conclusion, our studies provide new insights into the regulatory mechanisms of the core transcription factor Oct4 and also provide a direct link between Oct4 phosphorylation events and somatic cell reprogramming. Furthermore, we propose a model, which describes the potential role of PKA-mediated Oct4 phosphorylation in maintaining pluripotency and during spontaneous differentiation.

4 Abkürzungsverzeichnis

8-Br-	8-Bromoadenosine	MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
cAMP	3',5' cyclic monophosphate	MCS	Multiple cloning site
%	Prozent (Vol/Vol)	MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
°C	Grad Celsius	MEF	Maus embryonale Fibroblasten
µg	Mikrogramm	mg	Milligramm
µl	Mikroliter	min	Minuten
µM	Mikromolar	ml	Milliliter
µm	Mikrometer	mM	Millimolar
Abb.	Abbildung	mRNA	Messenger RNA
APS	Ammoniumperoxidisulfat	mt	Mutante
AS	Aminosäure	nCM(nCM-L)	nicht konditioniertes hESC-Medium
bp	Basenpaare	nCM-H	„schweres“ nicht konditioniertes hESC-Medium
BSA	Bovines Serumalbumin	NTD	Amino-terminale Transaktivierungsdomäne + DNA bindende Domäne
cDNA	komplementäre DNA	NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation	ng	Nanogramm
CIP	Calf Intestine Phosphatase	NHS	N-Hydroxysuccinimid
CM(CM-L)	konditioniertes hESC-Medium	NLS	Nuclear localization signal
CM-H	„schweres“ konditioniertes Medium	OSKM	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc
Ctl	Kontrolle	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	PBS	Phosphate buffered saline
DBD	DNA bindende Domäne	PBS-T	Phosphate buffered saline mit Tween20
DC	DNA bindende Domäne + Carboxy-terminale Transaktivierungsdomäne	PBS-X	Phosphate buffered saline mit Triton X-100
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DMSO	Dimethylsulfoxid	Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PFA	Paraformaldehyd
DNase	Deoxyribonuklease	pH	potentia hydrogenii
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	pI	Isoelektrischer Punkt
DTT	Dithiothreitol	PKA	Proteinkinase A
E	Embryonaler Tag	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ECL	Enhanced Chemiluminescence	pTyr	Phospho-Tyrosin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	rh	Rekombinant human
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraacetat	RNA	Ribonukleinsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay	rpm	Umdrehungen pro Minute
et al.	et altera	qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase PCR
FACS	Fluorescence associated cell sorting	SDS	Sodiumdodecylsulfat
FCS	Fötale Kälberserum	SILAC	Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture
Fgf2	Fibroblast Growth Factor 2	STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
f.S.	freie DNA Sonde	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
GFP	Green fluorescent protein	WB	Western Blot
h	Stunde	wt	Wildtyp
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure	ü.N.	über Nacht
hESCs	human embryonic stem cells	ÜS	Überstand
HRP	Horseradish Peroxidase		
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase		
ICM	Inner cell mass		
Ig	Immunglobulin		
IK	Isotypkontrolle		
IL	Interleukin		
INAKs	mitotisch inaktive MEFs		
IP	Immunopräzipitation		
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen		
kDa	Kilodalton		
KSR	KnockOut Serum Replacement		
LIF	Leukemia inhibitory factor		
LTR	Long Terminal Repeat		
M	Molar		

5 Einleitung

Der Begriff „Stammzelle“ wurde erstmals von dem deutschen Biologen Ernst Haeckel im Jahre 1868 eingeführt. Er benutzte das Wort Stammzelle in Verbindung mit dem Wort Stammbaum und bezeichnete so einzellige Vorfahren eines mehrzelligen Organismus oder ein befruchtetes Ei, welches in der Lage ist, sich in alle Zellen eines Organismus zu entwickeln⁷. In der Folge wurde der Begriff Stammzelle von weiteren Wissenschaftlern aufgegriffen und in Bezug auf die Entwicklung des Blutsystems und die Keimplasmatheorie verwendet⁷. Mit der Entdeckung von hämatopoetischen Stammzellen manifestierte sich die heutige Begriffsbedeutung der Stammzelle als eine Art Vorläuferzelle mit ausgeprägtem Differenzierungspotenzial⁷. Anhand dieser Definition war es in der Folge möglich, weitere gewebespezifische Stammzellen wie z. B. des zentralen Nervensystems, des Darms und der Haut zu charakterisieren. Stammzellen haben als einheitliches Merkmal die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (engl.: *self-renewal*). Sie unterscheiden sich jedoch anhand ihres jeweiligen Differenzierungspotenzials. In Säugetieren haben nur die befruchtete Eizelle (Zygote) und die frühen Blastomeren eine allseitige Entwicklungsfähigkeit. Sie sind als einzige Zellen in der Lage, den gesamten Embryo sowie das extraembryonale Gewebe (Plazenta) zu bilden und werden dementsprechend als *totipotent* bezeichnet⁸. Mit voranschreitender Embryonalentwicklung kommt es zu ersten Differenzierungsprozessen (Blastozyste, Innere Zellmasse und Trophoblastzellen) der Zellen, wonach diese als *pluripotent* bezeichnet werden. Pluripotente Zellen sind in der Lage, sich in verschiedene Zellschichten zu entwickeln, die im weiteren Verlauf der Embryogenese sämtliche Gewebe und Organe des Organismus bilden. Diese Zellschichten werden Keimblätter genannt und umfassen Entoderm (z.B. Lunge, Darm, Pankreas), Mesoderm (z.B. Muskel, Knochen, Blutzellen) und Ektoderm (z.B. Nervensystem, Haut)⁹. Eine Differenzierung der pluripotenten Zellen in extraembryonale Trophoblastzellen ist aufgrund erster Einschränkungen des Entwicklungspotenziales nicht mehr möglich. *Multipotente* Stammzellen können sich in eine begrenzte Anzahl von Zelltypen einer definierten Zellgruppe entwickeln (z. B. hämatopoetische Stammzellen)¹⁰. *Unipotente* Stammzellen haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sind aber in ihrem Differenzierungsvermögen stark eingeschränkt und können sich daher nur in einen bestimmten Zelltypen entwickeln (z. B. Spermatoγονien-Stammzellen)³. Terminal differenzierte Zellen haben ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren und werden daher als *nullipotent* bezeichnet¹¹.

5.1 Das Stammzellen Konzept : Stammzelle ist nicht gleich pluripotente Zelle

Man definiert Stammzellen als die ursprünglichen Vorläuferzellen der über 200 differenzierten Zelltypen des adulten Organismus. Nach jeder Zellteilung kann die resultierende Tochterzelle als unabhängige Stammzelle weiterwachsen (*self-renewal*) oder sich in einen gewebsspezifischen Zelltypen entwickeln (Differenzierung)¹². Eine Vielzahl von intrinsischen und extrinsischen zellulären Mechanismen regulieren die Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung in sämtlichen Stammzellen. Der Ort dieser speziellen Regulierung ist zelltypenabhängig und wird als Stammzellnische bezeichnet^{13 14}. Die allgemein gültige Definition für Stammzellen umfasst eine uneinheitliche Gruppe verschiedenartiger Zellen, wodurch es leicht zur Konfusion bei der exakten Benennung kommen kann. Daher erfolgt eine weitere Einteilung der Stammzellen einerseits anhand ihrer Potenzialität andererseits nach der Art oder dem Ort ihrer Gewinnung. Man unterscheidet daher zwischen zwei Hauptgruppen, den pluripotenten embryonalen Stammzellen und den gewebespezifischen adulten Stammzellen mit eingeschränkter Differenzierungsfähigkeit.

5.2 Multipotente und unipotente adulte Stammzellen

Adulte somatische Stammzellen erfüllen zeitlebens wichtige Funktion in der zellulären Homöostase des Organismus. Dieser Selbstregulationsmechanismus umfasst hauptsächlich die Regeneration und Reparaturprozesse verschiedenartiger Gewebe. Ein entscheidendes Merkmal hierbei ist die Fähigkeit der adulten Stammzellen zur asymmetrischen Zellteilung. Die Zellen sind dadurch in der Lage, sich selbst zu erneuern und zeitgleich spezialisierte Zellen zu bilden¹⁵. Diese gewebespezifischen Zellen ersetzen alterndes oder beschädigtes Zellmaterial und erhalten so die Funktionsfähigkeiten der verschiedenen Gewebe und Organe aufrecht. Sehr umfassend untersucht ist die Funktion der adulten Stammzellen in den hoch proliferativen Krypten des Darmepithels, bei der Hämatopoese, im Knochenmark und in der Haut. Einige dieser Stammzellen sind multipotent und daher in der Lage, sich in mehrere Zelltypen des jeweiligen Gewebes zu entwickeln (z.B. hämatopoetische, neuronale und mesenchymale Stammzellen^{10, 16}. Endotheliale Stammzellen und Zellen der Haut sind in ihrem Differenzierungspotenzial eingeschränkt und können sich nur in einen Zelltypen entwickeln (unipotent)¹⁷. Seit einigen Jahren wird die Frage diskutiert, inwieweit adulte Stammzellen die Fähigkeit zur Transdifferenzierung (Zellplastizität) haben. Dieser Begriff umschreibt die Fähigkeit der Zellen, sich außer in differenzierte Zellen ihres ursprünglichen Gewebetyps auch noch in fremde Gewebetypen entwickeln zu können¹⁸. Bis heute konnte kein eindeutiger Beweis für die spontane Transdifferenzierung von adulten Stammzellen erbracht werden^{19, 20}.

5.3 Pluripotente Stammzellen embryonalen Ursprungs

Im nachfolgenden werden die wichtigsten Vertreter der Pluripotenten Zelllinien genannt und kurz eingeführt. Im Mittelpunkt der Betrachtungen stehen die embryonalen Stammzellen sowie die induzierten pluripotenten Stammzellen.

5.3.1 Embryonale Karzinomzellen (EC)

Pluripotente Zellen wurden erstmals im Zusammenhang mit Teratokarzinomen beschrieben^{21, 22}. Teratokarzinome sind bösartige Keimzelltumore die vornehmlich die weiblichen und männlichen Gonaden, Ovarien und Testes betreffen. Hauptbestandteile dieser Tumore sind undifferenzierte embryonale Karzinomzellen sowie differenzierte Zellderivate der drei Keimblätter²³. Man vermutet, dass die embryonalen Karzinomzellen aus den primordialen Keimzellen der Embryonalentwicklung hervorgehen¹⁷. Anhand von Transplantationsstudien konnte gezeigt werden, dass einzelne embryonale Karzinomzellen in der Lage waren, eine fortlaufende Teratokarzinombildung in den jeweiligen Empfängertieren auszulösen²². In der Folge wurden zur genauen Charakterisierung verschiedener embryonaler Karzinomzellen standardisierte Tests eingeführt. Dazu gehörten neben der beschriebenen *in vivo* Teratokarzinombildung, die *in vitro* Differenzierung der Derivate der drei Keimblätter (*embryoid bodies*) und die Blastozysteninjektion zur Bildung von Chimären Mäusen^{24, 25}. Zellen die sämtliche Standards erfüllen, werden als pluripotente Zellen bezeichnet.

5.3.2 Embryonale Stammzellen (ES) aus der inneren Zellmasse der Blastozyste

Das Leben aller Säugetiere beginnt mit einer einzelnen totipotenten Zelle (Zygote) aus welcher sich im Verlaufe der Embryonalentwicklung ein vollständiger Organismus bildet. Im ersten Stadium der Embryogenese kommt es zu mehreren Furchungsteilungen der Zygote. Die entstehenden Einzelzellen werden als Blastomere bezeichnet und sind bis zum 4-Zellstadium des sich entwickelnden Embryos totipotent¹¹. Mit fortschreitender Differenzierung und weiteren Furchungsteilungen bildet sich aus der Zygote eine mit Zellen gefüllte Kugel, die Morula (8 bis 32 Zellen). In der Folge weiterer Differenzierungsprozesse bildet sich aus der Morula die sogenannte Blastozyste. Diese frühe Blastozyste ist eine flüssigkeitsgefüllte Hohlkugel (Blastocoel) und besteht aus einer äußeren trophoektodermalen Zellschicht (TE) und einer innenliegenden pluripotenten Zellansammlung, der inneren Zellmasse (IZM). Nachfolgend bildet sich aus der IZM das primitive Endoderm (Hypoblast) und die frühen Präimplantations-

Epiblastzellen⁶. Bei der Einnistung (Post-Implantation) in die Gebärmutter besteht der Embryo aus pluripotenten Epiblastzellen und extraembryonalem Ektoderm und Endoderm²⁶.

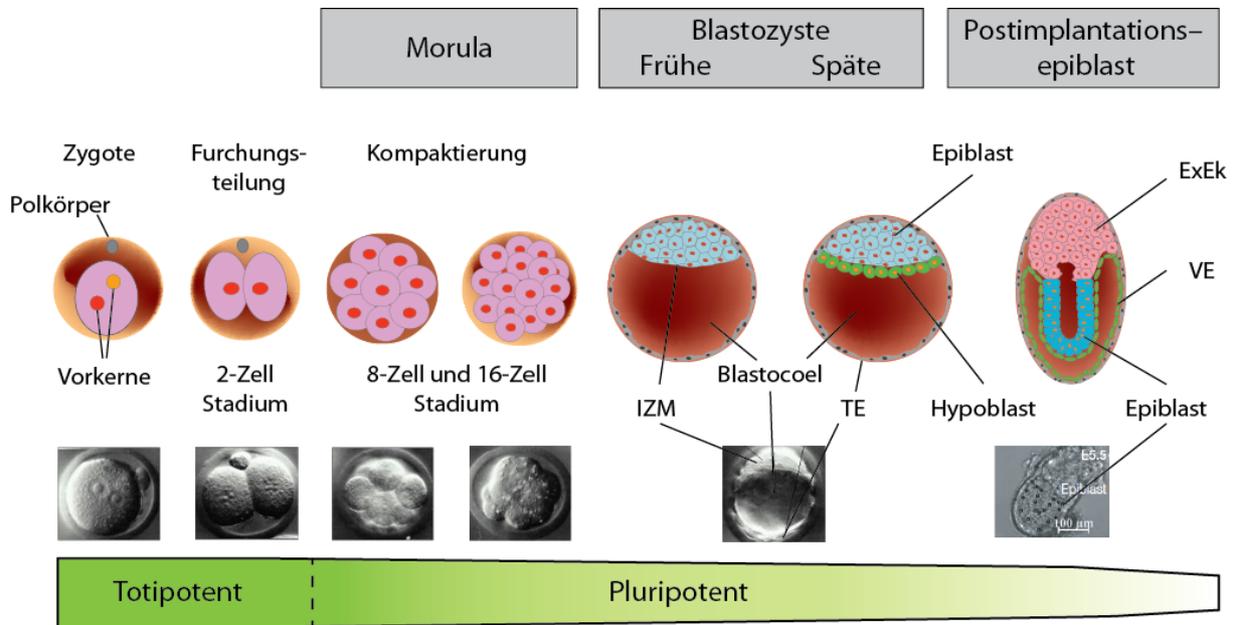


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Prä- und Periimplantationsstadien der Maus

Nach der Konzeption kommt es während der Embryogenese fortlaufend zu verschiedenen Differenzierungsprozessen (E0.5 - E5.5). Während der Kompaktierung kommt es zur Ausbildung von zellulären Verbindungen zwischen den Blastomeren und zur Polarisierung der Zellen. E: Embryonaler Tag nach der Befruchtung, IZM: Innere Zellmasse, TE: Trophoektoderm, ExEk: Extraembryonales Ektoderm, VE: Viszerales Endoderm (Adaptiert von Molecular Biology of the Cell, 4th Edition Figure 21-83)

Anfang der siebziger Jahre konnte anhand von Transplantationsstudien gezeigt werden, dass einige Zellen der Blastozyste bezüglich ihres Entwicklungspotenzials mit embryonalen Karzinomzellen vergleichbar waren²⁷. Aus diesem Grund wurde versucht, die pluripotenten Zellen der Blastozyste zu isolieren²⁸. Entscheidend für die Isolierung dieser Zellen waren Erkenntnisse aus der Erforschung der embryonalen Karzinomzellen. Hierzu gehören unter anderem die Ermittlung der idealen Zellkulturbedingungen, die Bestimmung verschiedener Marker (SSEA-1, Alkalische Phosphatase) zur eindeutigen Identifikation pluripotenter Zielzellen und die definierten Standardtest zum Beweis der Pluripotenz^{24, 25, 29-31}. Daraufhin konnte, durch die Kokultivierung mit embryonalen Fibroblasten, im Jahre 1981 erstmals eine pluripotente Stammzelllinie aus der inneren Zellmasse (IZM) einer sich entwickelnden Mausblastozyste gewonnen werden^{32, 33}. Diese Zellen waren im Sinne der zuvor genannten Standardtests pluripotent und hatten das Potenzial, sich in Zellderivate aller drei Keimblätter zu differenzieren. Im Gegensatz zu den embryonalen Karzinomzellen waren die Zellen der IZM in einem hohem Maß keimbahngängig und zeigten keine tumorigenen Eigenschaften³⁴. Die auf diesem Wege

gewonnenen Zellen bezeichnet man heutzutage als **embryonale Stammzellen der Maus (mESC)**. Zusätzlich konnten pluripotente Zellen embryonalen Ursprungs auch nach der Einnistung des Embryos in die Gebärmutter isoliert werden. Obwohl diese **Epiblast-Stammzellen (EpiSC)** viele Pluripotenz-assoziierten Kriterien erfüllen, unterscheiden sie sich bezüglich ihres Entwicklungspotenzials und der Zellkulturanforderung deutlich von den embryonalen Stammzellen der Maus ^{26, 35, 36}.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass embryonale und Epiblast-Stammzellen keineswegs mit der Inneren Zellmasse der Blastozyste gleichzusetzen sind. Während der Embryonalentwicklung existiert die innere Zellmasse nur transient und durchläuft ständige Differenzierungsprozesse. Im Gegensatz dazu teilen sich embryonale Stammzellen ohne dabei zu differenzieren (symmetrische Zellteilung). Die Fähigkeit der embryonalen Stammzellen zur Selbsterneuerung und symmetrische Zellteilung ist wahrscheinlich zellkulturabhängig und ist für die innere Zellmasse nicht bekannt ³⁷.

Die bahnbrechenden Arbeiten zur Gewinnung von embryonalen Stammzellen der Maus und verschiedener nicht-humaner Primatenstammzellen führten schließlich zur Isolierung der ersten **humanen embryonalen Stammzelllinie (hESC)** im Jahr 1998 ^{38, 39}. Auch diese Zellen zeigten alle Charakteristika einer pluripotenten Zelle, wie z.B. die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, die Bildung von Teratokarzinomen nach der Injektion in eine immundefiziente Maus und die Fähigkeit der Differenzierung in Ektoderm, Endoderm und Mesoderm ⁴⁰. Später wurden weitere murine und humane embryonale Stammzelllinien etabliert, unter anderem aus der Morula und aus einzelnen Blastomeren der sich entwickelnden Blastozyste ⁴¹⁻⁴³. Aufgrund ihres nahezu allumfassenden Differenzierungspotenzials, stellen die humanen embryonalen Stammzellen eine vielversprechende Quelle für therapeutische Ansätze im Bereich der regenerativen Medizin dar. Durch die Verwendung von tierischen Serumkomponenten bei der Gewinnung und Kultivierung der Zellen, kann es potentiell zur Übertragung von Pathogenen kommen und machte lange Zeit einen therapeutischen Einsatz dieser Zellen unmöglich. Durch die Fortschritte der letzten Jahre im Bereich der Isolierung und Kultivierung der humanen embryonalen Stammzellen, unabhängig von tierischen Produkten, scheint die Verwendung der Zellen in der regenerativen Medizin prinzipiell möglich ⁴⁴.

5.3.3 Embryonale und Adulte Keimbahn-Stammzellen

Pluripotente Stammzelllinien konnten in der Folge auch aus den Zellen der Keimbahn isoliert werden ⁴⁵. Diese primordialen Keimbahn-Stammzellen (EGC) waren morphologisch von murine embryonalen Stammzellen nicht zu unterscheiden und konnten sowohl Teratokarzinome als auch Chimäre Mäuse bilden ^{46, 47}. Interessanterweise unterscheiden sich embryonale Keimbahn-Stammzellen und embryonale Stammzellen anhand ihres Methylierungsstatus an verschiedenen DNA-Sequenzen. Es ist bekannt, dass die Methylierung CpG reicher Promotorregionen zur Inaktivierung der Transkription führt und unmethylierte Promotorregionen die aktive Transkription begünstigen. Daher lassen sich diese Unterschiede im Methylierungsstatus vermutlich mit dem fortgeschrittenen Differenzierungszustandes und einer partiell abweichenden transkriptionellen Regulation der Zellen erklären ⁴⁷. Die Etablierung von adulten Keimbahn-Stammzellen der Maus gelang im Jahr 2004. Diese Zellen waren ebenfalls pluripotent, zeigten aber die spezifischen Methylierungsmuster ihrer Vorläuferzellen ⁴⁸. Die Isolierung von humanen embryonalen und adulten Keimbahn-Stammzellen wurde ebenfalls beschrieben ^{49, 50}. Bis zum heutigen Tag wird die eindeutige pluripotente Integrität dieser Zellen kontrovers diskutiert ^{23, 51}.

5.3.4 „Reprogrammierung“ : Künstlich erzeugte pluripotente Stammzellen

Humane embryonale Stammzellen werden in der Regel aus der Blastozyste eines sich entwickelnden Embryos gewonnen. Dieses Standardverfahren führt in den meisten Fällen zur Zerstörung des Embryos und ist daher aus ethischen Gesichtspunkten äußerst umstritten ⁵². Das vielversprechende Potenzial dieser Zellen im Bereich der regenerativen Medizin auf der einen Seite und die ethische Problematik auf der anderen Seite führten zur Suche nach alternativen Methoden zur Gewinnung von pluripotenten Stammzellen.

Bei der **Parthogenese** (Jungfernzeugung) kommt es ohne Befruchtung der Eizelle durch eine Samenzelle zur Bildung eines Embryos. Parthenoten können *in vitro* durch eine Vielzahl von mechanischen, chemischen und elektrischen Manipulationen der Oozyte generiert werden. Dabei wird die Eizelle zur Teilung angeregt, wodurch es in der Folge zur Ausbildung der Blastozyste kommt ⁵³. Aufgrund der fehlenden paternalen chromosomalen Information ist die Embryogenese von Parthenoten gestört und bricht an spezifischen Stellen der embryonalen Entwicklung ab ⁵⁴. Des Weiteren konnte in den letzten 50 Jahren durch verschiedene Reprogrammierungsexperimente gezeigt werden, dass Zellkerne von somatischen Zellen eine gewisse Plastizität beibehalten ⁵⁵. Diese Zellen können durch die Übertragung ihrer Zellkerne (**Zellkerntransfer**) in ein entkerntes

Oozyte oder durch die **Fusion mit pluripotenten Zellen** reprogrammiert werden ^{56 57-60}. Es wurde daher vermutet, dass unbefruchtete Eizellen sowie embryonale Stammzellen spezifische Faktoren im Zytoplasma und/oder Zellkern enthalten, die die Totipotenz bzw. Pluripotenz in somatischen Zellen induzieren können ⁶¹.

5.3.4.1 Induzierte Pluripotente Stammzellen (iPS)

Die Erkenntnisse aus den Kerntransfer- und Zellfusionsexperimenten führten 2006 zu den bahnbrechenden Ergebnissen der „Reprogrammierung“ von somatischen Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen ⁶¹. Durch die ektopische Expression der Transkriptionsfaktorkombination aus Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc wurden somatische Zellen in keimbahngängige, induzierte pluripotente Zellen (iPS) überführt ⁶²⁻⁶⁴. Diese iPS Zellen waren bezüglich der Morphologie, der Wachstumseigenschaften und Expression verschiedener Markergene annähernd mit embryonalen Stammzellen identisch. Des Weiteren differenzierten die Zellen *in vivo* und *in vitro* in Zellerivate aller drei Keimblätter und nahmen nach der Injektion in die Blastozyste an der Embryonalentwicklung teil. Neben verschiedenen somatischen Zellen der Maus konnten auch Zellen anderer Spezies, inklusive des Menschen, reprogrammiert werden ⁶⁵⁻⁶⁷. Dabei konnten einige der zuvor erwähnten Transkriptionsfaktoren durch andere Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox2, Nanog, Lin28) ersetzt werden ⁶⁸. In der Folge wurde gezeigt, dass die Reprogrammierung mit weiteren Transkriptionsfaktorkombinationen möglich war und dass einige Transkriptionsfaktoren durch die chemische Aktivierung oder Inhibierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden ersetzt werden konnten ^{66, 69-73}. Die ektopische Expression der Transkriptionsfaktoren initiiert umfassende transkriptionelle Veränderungen in den infizierten Zellen und einen äußerst ineffizienten Reaktivierungsprozess der Pluripotenz-assoziierten Gene Oct4, Sox2 und Nanog. In Folge der Reaktivierung kommt es unter anderem zur endogenen Expression dieser Gene und somit zur Stabilisierung des pluripotenten Zustands der iPS Zellen unabhängig von den exogenen Faktoren ⁶. Bei der Reprogrammierung wird der epigenetische Status der somatischen Zellen gelöscht und in einen pluripotenten Status überführt ⁷⁴. Diese Transformation konnte durch die Zugabe verschiedener chemischer Mediatoren begünstigt werden ⁷⁵. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass neben den transkriptionellen und epigenetischen Veränderungen auch microRNAs auf post-transkriptioneller Ebene eine entscheidende Rolle während der Reprogrammierung einnehmen ⁷⁶.

Die Verwendung von retroviralen und lentiviralen Vektoren für die Reprogrammierung birgt ein hohes Mutationsrisiko und macht den Einsatz der iPS Zellen in der regenerativen Medizin unmöglich ⁷⁷. Aus diesem Grund wurden weitere Reprogrammierungstechniken entwickelt. Diese Techniken basieren auf einer nahezu vollständigen Entfernung des

integrierten Virus aus dem Genom, auf nicht integrierende Viren, eine transiente Vektorexpression oder auf einer protein- oder mRNA abhängigen induzierten Reprogrammierung⁷⁸⁻⁸².

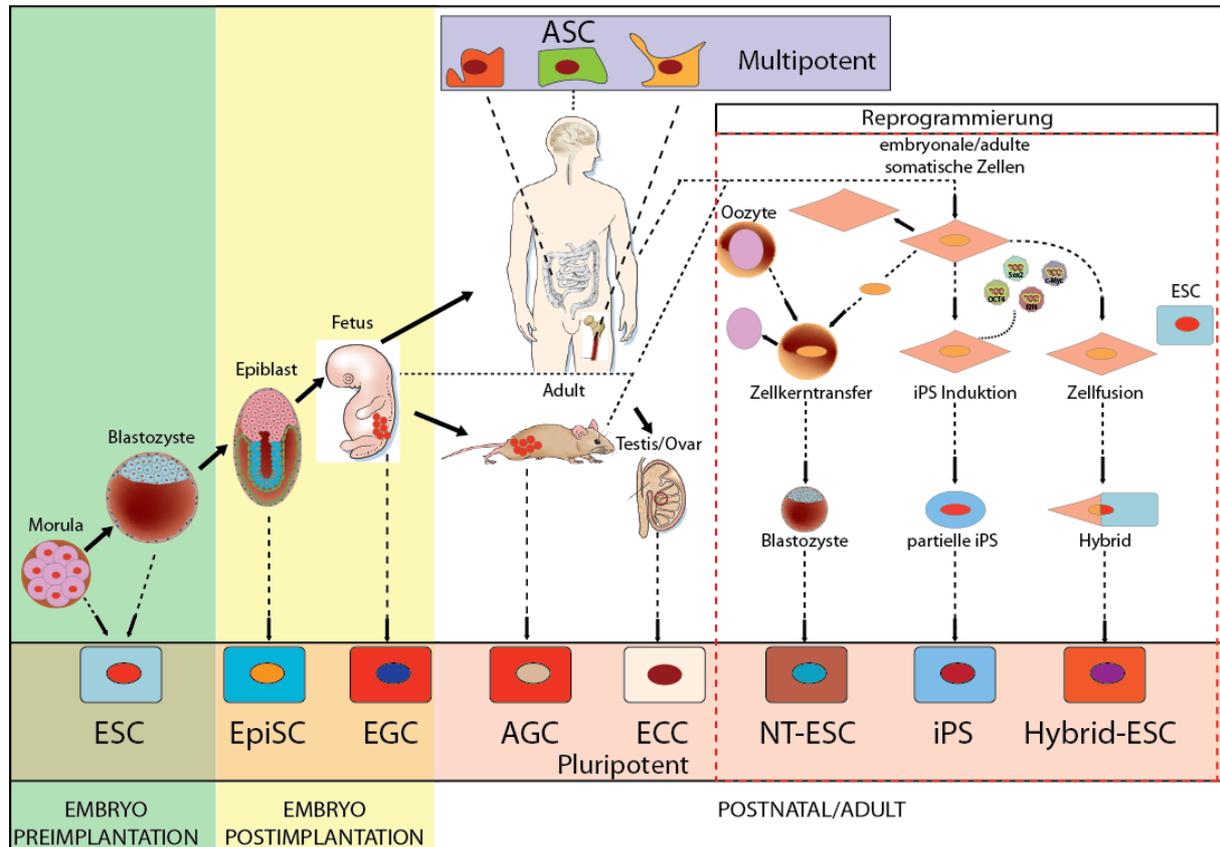


Abb. 1.2: Übersichtsdarstellung des Ursprungs verschiedener multipotenter und pluripotenter Zellen

Pluripotente Zellen können während verschiedener Phasen der Embryonalentwicklung gewonnen werden. Embryonale Stammzellen (ESC) werden aus den Blastomeren der Morula und der inneren Zellmasse der Blastozyste isoliert. Epiblast-Stammzellen (EpiSC) und embryonale Keimbahn-Stammzellen (EGC, embryonic germ stem cells) werden nach der Einnistung des Embryos in die Gebärmutter gewonnen. Im adulten Organismus existieren neben pluripotenten adulten Keimbahn-Stammzellen (AGC) und embryonalen Karzinomzellen (ECC) auch multipotente adulte Stammzellen (ASC), wie z.B. neuronale Stammzellen oder Knochenmarkstammzellen. Durch einen als Reprogrammierung bezeichneten Prozess können somatische Zellen in pluripotente Zellen überführt werden (embryonale Stammzellen aus Zellkerntransfer, NT-ESC; induzierte pluripotente Stammzellen, iPS; embryonale Stammzellen aus Zellfusionsexperimenten Hybrid-ESC). (Adaptiert nach^{83, 6)}

5.4 Molekulare Regulation der Selbsterneuerung

Die pluripotente Integrität der embryonalen Stammzellen ist von dem exakten Zusammenspiel einer Vielzahl von extrinsischen und intrinsischen Einflüssen abhängig. Unter extrinsischen Einflüssen versteht man im allgemeinen lösliche Bestandteile des Zellkulturmediums, wie z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere Proteine. Diese Faktoren werden entweder direkt mit dem Medium zugegeben, von Kokultivierungszellen

oder den ESCs selbst sezerniert. In Folge dieser externen Signalmoleküle werden spezifische Signaltransduktionskaskaden innerhalb der Zelle aktiviert, die wiederum die Expression der intrinsischen Hauptpluripotenzfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog steuern. Somit besteht ein direkter Zusammenhang zwischen extra- und intrazellulären Faktoren, in deren Abhängigkeit die ESCs entweder differenzieren oder den Selbsterneuerungsprozess (Pluripotenz) durchlaufen.

5.4.1 Unterschiedliche extrinsische Faktoren steuern die Selbsterneuerung der pluripotenten Stammzellen

Die für die Kokultivierung der ESCs verwendeten Fibroblasten sezernieren eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, unter anderem Lif (*Leukemia inhibitory factor*), Fgf (*fibroblast growth factor*), Tgf- β (*transforming growth factor β*), Aktivin, und Antagonisten des Bmp Signalweges⁸⁴⁻⁸⁶. Erstaunlicherweise hatten diese Wachstumsfaktoren zum Teil einen divergenten Einfluss auf die Steuerung der Pluripotenz der verschiedenen Stammzellen.

5.4.1.1 *Pluripotenz der mESCs/miPS*

Murine ESCs sind bei ihrem Selbsterneuerungsprozess vornehmlich von dem Leukämie-inhibitorischen Faktor (Lif) und dem Tgf- β /Bmp4 Signalweg abhängig. Der Lif-Faktor gehört zur IL-6 Zytokin-Familie und wurde erstmals in Verbindung mit der Differenzierung von myeloischen Leukämiezellen (M1) beschrieben⁸⁷. Des Weiteren inhibiert Lif die *in vitro* Differenzierung von mESCs und unterstützt gleichzeitig die Aufrechterhaltung des pluripotenten Zustandes der Zellen⁸⁸. Die physiologische *in vivo* Funktion von Lif bezieht sich auf einen Arrest in der Embryonalentwicklung bei Säugetieren während des Winterschlafs oder in der Laktationsphase. Bei diesem als Diapause bezeichneten Ruhezustand von Säugetieren scheint die Lif Aktivität vor allem die Erhaltung des Entwicklungspotentials von Embryonen vor der Einnistung zu ermöglichen⁸⁹. Die Bindung von Lif an die extrazelluläre Domäne des Glykoprotein-130(gp130)/Lif Rezeptorkomplexes führt zu Rekrutierung der zytoplasmatischen Januskinasen (JAK) und zur phosphorylierungsbedingten Aktivierung der Stat3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) Signaltransduktionskaskade⁹⁰. Die phosphorylierten und dimerisierten Stat3 Komplexe translozieren in den Zellkern und aktivieren dort verschiedene Pluripotenz-assoziierte Zielgene inklusive der Transkriptionsfaktoren c-Myc, Klf4 und Nanog^{91, 92}. Die c-Myc Proteinmenge in der Zelle wird unter anderem auch durch die Glykogen-Synthasekinase 3 β (Gsk3 β) gesteuert. Durch die aktive Form von Gsk3 β wird c-Myc phosphoryliert und so für die Ubiquitin Kinasen vermittelte Degradation markiert⁹³. Die Lif-Rezeptorbindung führt zur

Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) abhängigen Deaktivierung von Gsk3 β und somit zur Stabilisierung von c-Myc (siehe **Abb. 1.3**)⁹⁴. Die Aktivität von Gsk3 β wird zusätzlich von der *wingless*type Signalkaskade (Wnt) kontrolliert⁵. Die Wnt bedingte Deaktivierung von Gsk3 β erhöht die Menge von β -catenin im Zellkern, wodurch es zur vermehrten Transkription verschiedener Zielgenen kommt, wie z.B. die der Pluripotenz regulierenden Faktoren Stat3, Oct4 und Tcf3⁹⁵⁻⁹⁷. Neben der Aktivierung des JAK/Stat3 Signalweges initiiert Lif zusätzlich die SHP-2 abhängige Transphosphorylierung und Mobilisierung des Ras/Raf/MEK/ERK Signalweges⁹⁸. Daraufhin transloziert phosphoryliertes ERK (*Extracellular signal Regulated Kinase*) in den Kern und startet die Transkription der Zielgene. Erstaunlicherweise führt die gesteigerte Expression dieser Gene vermehrt zur Differenzierung der mESC⁹⁰. Es ist daher anzunehmen, dass der Selbsterneuerungsprozess der mESC von einer exakten Balance zwischen der JAK/Stat3, der PI3-Kinase und der Ras/Raf/MEK/ERK Signalkaskade abhängig ist⁹⁹. Ein möglicher Mediator dieser Feinabstimmung ist der Tgf- β Signalweg. Die Tgf- β Signalkaskade untergliedert sich in zwei Hauptbestandteile, dem Tgf- β /Aktivin/Nodal Teil und Tgf- β /Bmp4 Teil. Im Zellkulturmedium enthaltene Serumproteine aktivieren den Tgf- β /Bmp4 Rezeptorkomplex, woraufhin die zytoplasmatischen Proteine Smad1/5/8 (R-Smads, *receptor regulated-similar to mother against decapentaplegic homologues*) an die Rezeptoren binden und phosphoryliert werden¹⁰⁰. Im Anschluss bindet phosphoryliertes Smad1/5/8 an den Kofaktor Smad4 und gelangt so in den Zellkern. Dort aktivieren bzw. inhibieren die entsprechenden Smad1/5/8-Smad4 Heterodimere ihre jeweiligen Zielgene wie z. B. Gene der Id (*inhibitor of differentiation*) Familie¹⁰⁰. Die Hauptfunktion der Bmp Signalkaskade in Verbindung mit der Lif Signalkaskade ist jedoch die Inhibierung des Lif (Ras/Raf/MEK/ERK) vermittelten Differenzierungssignals⁹⁹(siehe **Abb. 1.3**).

5.4.1.2 Pluripotenz der hESCs/hiPS

Für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Zustandes in den hESCs ist hauptsächlich das Zusammenspiel des Fgf und des Tgf- β /Aktivin/Nodal Signalweges verantwortlich¹⁰¹⁻¹⁰³. Die hESCs werden routinemäßig in Anwesenheit von Kokultivierungszellen (embryonale Fibroblasten der Maus, MEF) oder in einem, von MEFs konditionierten Medium (CM) kultiviert^{40, 104}. Neuerdings kommen vermehrt chemisch definierte Medien zum Einsatz¹⁰⁵. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Medien ist „*basic fibroblast growth factor*“ (Fgf2). Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Fgf2 das proliferative Wachstum der hESCs unterstützt und die Blockierung der Fgf Signalkaskade zur Differenzierung der Zellen führt⁴⁰. Der molekulare Wirkungsmechanismus von Fgf2 ist noch nicht vollends geklärt, man vermutet jedoch eine Interaktion von direkten und indirekten Einflüssen¹⁰⁶. Die indirekte Wirkung von Fgf2 bezieht sich auf die von den

Kokultivierungszellen sezernierten Moleküle des Tgf- β Signalweges wie Gremlin, Tgf- β und Aktivin^{85, 86}. Im Gegensatz zu den mESCs ist in den hESCs der Tgf- β /Aktivin/Nodal Teil der Tgf- β Signalkaskade für die Pluripotenz der Zellen entscheidend¹⁰². Die Aktivierung des Tgf- β /Bmp4 Signalweges führt hingegen zur massiven Differenzierung der Zellen¹⁰⁷. Durch die Bindung von Aktivin oder Tgf- β an den Tgf- β /Aktivin/Nodal Rezeptorkomplex kommt es zur Phosphorylierung von Smad2/3 und in Verbindung mit Kofaktor Smad4 zur Transkription verschiedener Pluripotenz-assoziiierter Gene wie z.B. *Oct4*, *Nanog* und *Fgf*^{9, 108, 109}. Der Kofaktor Smad4 ist sowohl für die Weiterleitung des Aktivin/Nodal Signals als auch des Bmp4 Signales notwendig. Die erhöhte Aktivität des Tgf- β /Aktivin/Nodal Signalweges bedingt die vermehrte Smad4 Beteiligung in diesem Teil der Tgf- β Signalkaskade und führt zur verringerten Aktivität des Tgf- β /Bmp4 Rezeptors¹⁰⁰. Das von den MEFs sezernierte Gremlin ist ein Antagonist des Tgf- β /Bmp4 Signalweges und unterbindet parallel die Aktivität des Rezeptors. Die direkte Wirkung von Fgf2 auf die hESCs führt zur Rezeptor-abhängigen Aktivierung der ERK- und/oder der PI3K Signalkaskade und zur erhöhten Expression von Tgf- β , Gremlin und Nanog^{23, 85, 110}. Die von der PI3K- und Wnt-Signalkaskade vermittelte Deaktivierung von Gsk3 β stabilisiert den pluripotenten Zustand der Zellen zusätzlich^{9, 97}. Das komplexe Zusammenspiel diverser Signaltransduktionskaskaden ist daher die Grundlage für den Selbsterneuerungsprozesses der hESCs.

5.4.1.3 Pluripotenz der EpiSCs und das Dogma der naiven Stammzelle

Embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen die aus der inneren Zellemasse der frühen Blastozyste isoliert wurden und die Fähigkeit haben sich in Zellderivate der drei Keimblätter zu entwickeln²³. Obwohl mESCs und hESCs während vergleichbarer Entwicklungsstadien der Embryogenese isoliert wurden, unterscheiden sie sich bezüglich der Kultivierungsanforderungen, Morphologie, molekularen Identität sowie im Differenzierungsverhalten¹¹¹. Die aus den Mäusen isolierten Stammzellen wachsen als dichtgepackte, dreidimensionale Kolonien mit einer Verdopplungszeit von zirka 16 Stunden und können in Form von Einzelzellen passagiert werden. Im Gegensatz dazu müssen hESCs als Zellcluster passagiert werden und wachsen in Form von flachen zweidimensionalen Kolonien mit einer Verdopplungszeit von etwa 36 Stunden¹¹². Des Weiteren unterscheiden sie sich bezüglich der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle (*stage-specific embryonic antigens* (SSEA)). Die mESCs exprimieren SSEA-1, wohingegen hESCs SSEA-3 und SSEA-4 positiv sind. Auf epigenetischer Ebene unterscheiden sich diese Zellen z.B. bezüglich der X Chromosom Inaktivierung und der Bindung der Pluripotenz Faktoren an spezifische Promotorregionen^{113, 114}. Ursprünglich wurde vermutet, dass es sich bei den beschriebenen Unterschieden

zwischen mESCs und hESCs um Variationen von vergleichbaren Zellpopulationen verschiedener Spezies handelt ¹¹⁵. Diese Sichtweise veränderte sich mit der Etablierung der Maus Epiblast-Stammzellen ^{26, 35}. Diese Zellen waren morphologisch und bezüglich der Zellkulturanforderungen nahezu mit den hESCs identisch. So sind die Epiblastzellen vom Fgf2 und Tgf- β /Aktivin/Nodal Signalweg abhängig und wachsen als flache zweidimensionale Kolonien. Auch auf molekularer Ebene, wie z.B. der X-Chromosom Deaktivierung in Zellen weiblichen Ursprungs (X-Inaktivierung) und Genexpression, sind die EpiSCs mit den hESCs vergleichbar ⁶. Aufgrund der beschriebenen Gemeinsamkeiten und Unterschiede der jeweiligen embryonalen Stammzellpopulationen postulierten Nichols und Smith 2009 das Dogma der „naiven“ und „primed“ Stammzelle. Demnach entsprechen mESCs einem eher „naiven“ ursprünglichen Entwicklungsstadium, wohingegen EpiSCs und hESCs einem mehr differenzierten „primed“ Stadium der Embryogenese widerspiegeln (siehe **Abb. 1.3**)¹¹⁵. Der „naive“ pluripotente Zustand der mESCs ist durch die Aktivität des Lif und Bmp Signalweges sowie durch eine fehlende X-Inaktivierung charakterisiert. Die weiter fortgeschrittenen pluripotenten humanen Stammzellen und EpiSCs sind vom Fgf2 und Tgf- β /Aktivin/Nodal Signalweg abhängig und haben in Zellen weiblichen Ursprungs ein inaktives X-Chromosom („primed“) ¹¹¹. Die *in vitro* Differenzierung von „naiven“ mESCs in „primed“ mESCs (EpiSCs) durch den Wechsel der Zellkulturbedingungen von Lif/Bmp zu Fgf2 und Tgf- β /Aktivin/Nodal bestätigte das postulierte Dogma der aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien von ESCs und EpiSCs ¹¹⁶. Des Weiteren ermöglichte die Aktivierung/Inhibierung diverser Signaltransduktionskaskaden (Zugabe z. B. von Aktivin; PD0325901 MEK Inhibitor, CHIR99021 Gsk Inhibitor) sowie verschiedene genetische Manipulationen die Überführung der EpiSCs in „naive“ mESCs und bekräftigen so den direkten Zusammenhang der beiden Zelltypen ¹¹⁷⁻¹¹⁹. Die Überführung der hESCs und hiPS in einen mESC ähnlichen Zustand führte zu der Annahme, dass auch im humanen System ein „naiver“ pluripotenter Zelltyp existiert ^{6, 112}. Interessanterweise war bei der Etablierung und Aufrechterhaltung des „naiven“ pluripotenten Zustand der humanen Zellen die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) Signaltransduktionskaskade über den *G-coupled protein receptor* (GPCR) mit Forskolin von Vorteil ⁶(**Abb. 1.3**).

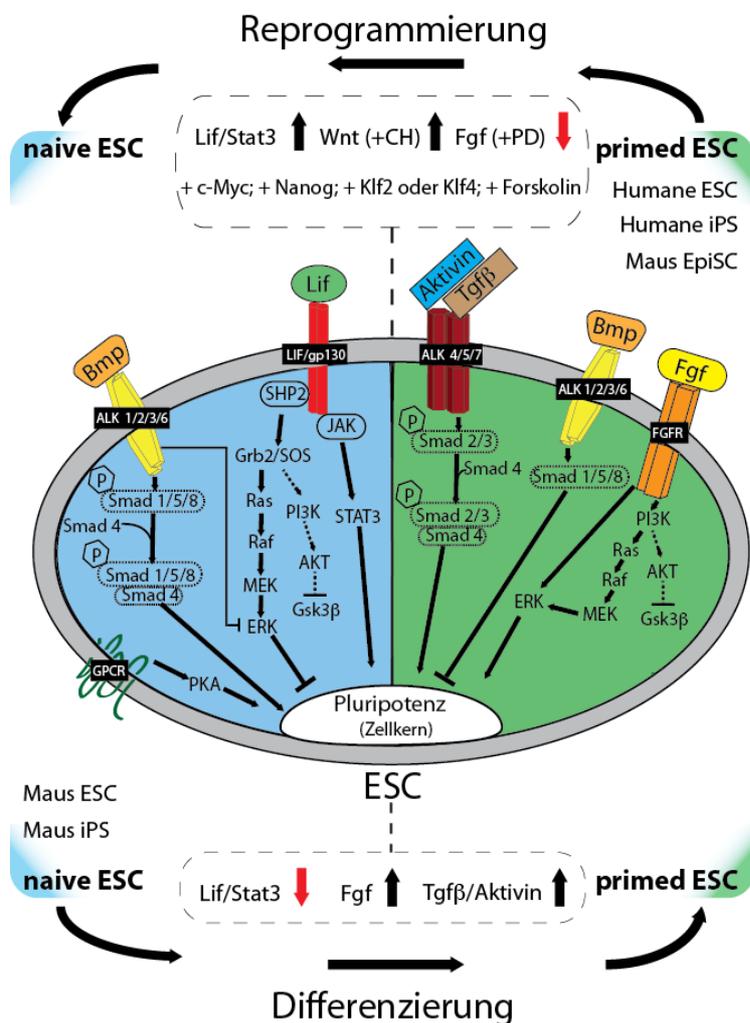


Abb.1.3: Signaltransduktionskaskaden und das Dogma der pluripotenten Stammzellen

Pluripotente Zellen können in Form eines ursprünglichen „naiven“ Entwicklungsstadiums oder in Form eines mehr differenzierten „primed“ Entwicklungsstadiums isoliert und kultiviert werden. Der pluripotente Zustand der „naiven“ Zellen (mESCs, miPS) wird durch die Aktivität der Lif und Tgf-β/Bmp Signaltransduktionskaskaden aufrecht erhalten. Zellen des „primed“ Zustandes (hESCs, hiPS, mEpiESC) sind dagegen vom Fgf und Tgf-β/Aktin/Nodal abhängig. Durch die Manipulation verschiedener Signalwege (Deaktivierung: roter Pfeil, Aktivierung: schwarzer Pfeil, (+) Zugabe von Forskolin) und/oder der Überexpression einzelner Transkriptionsfaktoren (+c-Myc, +Nanog, +Klf2, +Klf4) können die Zellen des einen Zustandes in den jeweilig anderen Zustand überführt werden. (Wnt Signalweg, Wnt; PD, PD0325901 MEK Inhibitor; CH, CHIR99021 Gsk Inhibitor; GPCR, G-coupled protein receptor; Agonist des PKA Signalweges bindet GPCR, Forskolin); (Adaptiert ^{5, 6}).

5.4.1.4 G-Protein-gekoppelter Rezeptor und der PKA Signalweg

Die Aktivierung der membranständigen G-Protein-gekoppelte 7-Transmembranhelix-Rezeptoren (GPCR, *G protein coupled receptors*) erfolgt durch die Bindung von Liganden wie z.B. Hormonen oder Zytokinen ². Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und zur Bindung von heterotrimeren G-Proteine ($G\alpha\beta\gamma$). Diese Interaktion katalysiert den Austausch von GDP zu GTP an der $G\alpha$ Untereinheit des G-Proteinen Komplexes ¹²⁰. Daraufhin spaltet sich der Komplex vom Rezeptor ab und dissoziiert in eine GTP gebundene $G\alpha$ Untereinheit und einen $G\beta\gamma$ Dimer. Sowohl die $G\alpha$ Untereinheit als auch die $G\beta\gamma$ Untereinheit können anschließend verschiedene Effektorproteine aktivieren oder inhibieren ^{121, 122}. Im Falle des PKA Signalweges bindet das stimulierende $G\alpha$ -Protein an die Membran-gebundene Adenylzyklase, welche anschließend die Produktion von cAMP aus ATP katalysiert (**Abb. 1.4**) ¹. Ein erhöhter cAMP Spiegel führt daraufhin zur Aktivierung des PKA Signalweges oder weiterer Zielproteine wie z. B. der Ras-ähnlichen GTPasen oder verschiedener

Ionenkanäle ^{123, 124}. Die Regulation der cAMP Menge in der Zelle erfolgt durch inhibitorische G-Proteine sowie durch Phosphodiesterasen und ist Teil der korrekten cAMP-vermittelten Signalweiterleitung ^{125, 126}.

Die Proteinkinase A ist ein Holoenzym und besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten (PKAC, C) und einem Homodimer aus zwei regulatorischen Untereinheiten (PKAR, R) ¹²⁷. Die regulatorischen Untereinheiten steuern die Aktivität von PKA und können über die Interaktion mit verschiedenen Ankerproteinen (AKAP) die ortsspezifische, lokale Wirkung von PKA beeinflussen ¹. Im Ausgangszustand sind die katalytischen und regulatorischen Untereinheiten aneinander gebunden, wodurch die Kinase inaktiviert ist. Die Bindung des sekundären Botenstoffes cAMP an die regulatorische Untereinheit (R) führt zu einer Konformationsänderung und ermöglicht die Dissoziation der katalytischen Untereinheit (C). Die C Untereinheit ist eine Serin/Threonin spezifische Kinase und phosphoryliert Zielsequenzen mit dem Motif RRX(S/T), wobei X einer beliebigen Aminosäure entspricht. Neben Ionenkanälen und Enzymen reguliert PKA auch die Bindung diverser Zielproteine an verschiedene Promotorregionen sowie deren Lokalisierung und Stabilität ¹. So konnte z.B. gezeigt werden, dass PKA den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element binding protein*) phosphoryliert und so die Transkription verschiedener Zielgene steuert ¹²⁸. Die Aktivität von PKA wird von verschiedenen Phosphodiesterasen (PDE) und hitzestabilen Proteinkinaseinhibitoren (PKI) gesteuert. Dabei handelt es sich um sogenannten Pseudosubstratinhibitor, die kompetitiv die Bindung von PKA an verschiedene Zielsequenzen verhindern und den nukleären Export der C Untereinheit unterstützen ¹²⁷.

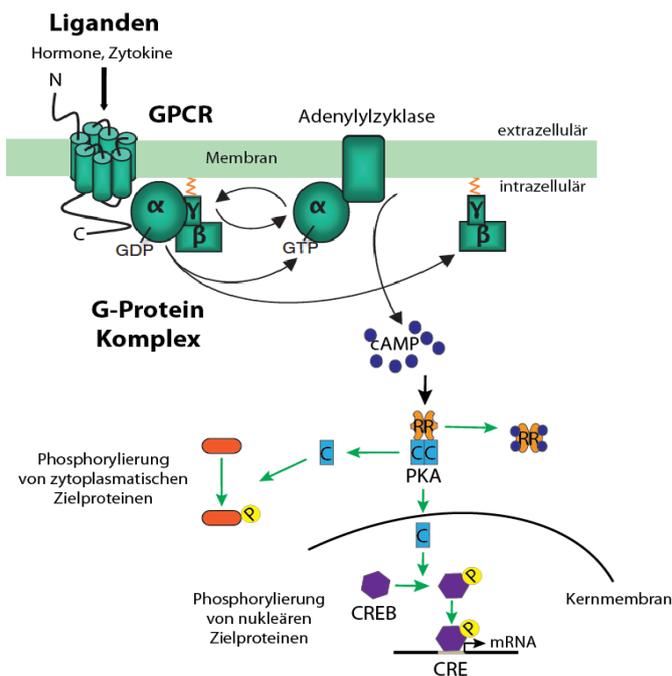


Abb. 1.4: Kanonische Aktivierung der PKA Signalkaskade

Die Bindung verschiedener Liganden an einen Transmembranrezeptor (GPCR) führt zur Aktivierung der Adenylzyklase durch die G α Untereinheit und zur Produktion von cAMP. Daraufhin bindet cAMP an den PKA Heterotetramer, wodurch es zur Freisetzung der regulatorischen (R) und katalytischen (C) Untereinheiten kommt. Die katalytischen Untereinheiten phosphorylieren in der Folge verschiedene zytosolische und nukleäre Proteine (CREB), wodurch die Transkription verschiedener Zielgene gesteuert wird. (GPCR, G-Protein-gekoppelter Rezeptor; CREB, *cAMP response element binding protein*) (adaptiert nach ^{1, 2})

5.4.2 Komplexe molekulare Regulation der Pluripotenz

Neben den zuvor erwähnten extrinsischen Faktoren sind verschiedene intrinsischer Regulatoren Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Zustandes in den embryonalen Stammzellen. Zu diesen Hauptregulatoren gehören Transkriptionsfaktoren, Chromatinregulatoren und nicht-kodierende RNAs. Die für pluripotente Stammzellen charakteristische mRNA Genexpression ist dementsprechend ein Produkt des exakten Zusammenspiels dieser Regulatoren (**Abb. 1.5**).

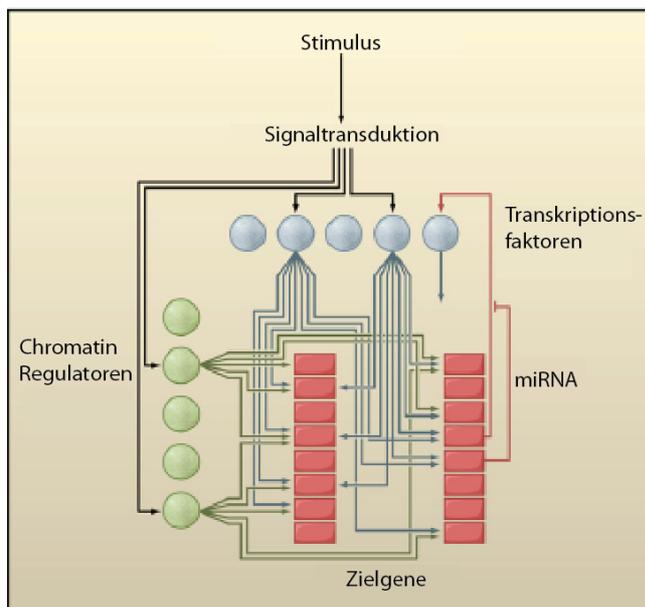


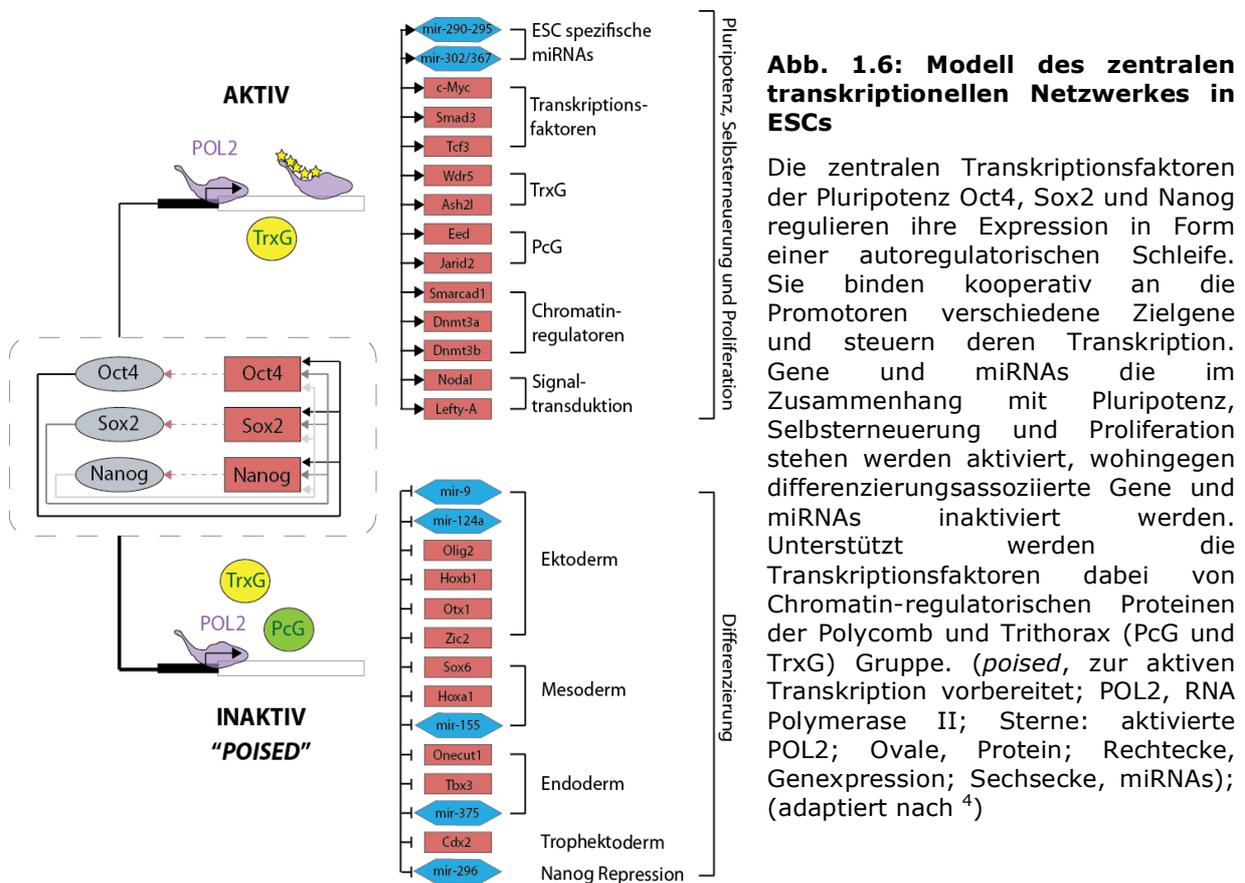
Abb. 1.5: Regulationsebenen der Pluripotenz

Das Modell zeigt die möglichen Interaktionen der einzelnen regulatorischen Ebenen zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz. Verschiedene Umwelteinflüsse stimulieren spezifische Signalwege in deren Folge es zur Aktivierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren (blaue Kreise) und Chromatinregulatoren (grüne Kreise) kommt. Diese wiederum kontrollieren die Expression verschiedener Zielgene (rote Vierecke), unter anderem mehrere miRNAs (microRNAs) welche ebenfalls Einfluss auf die Expression diverser Transkriptionsfaktoren haben. (adaptiert nach ³)

5.4.2.1 Intrinsische Regulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz

Erstaunlicherweise steuert eine relativ geringe Anzahl von Transkriptionsfaktoren die Entwicklung des gesamten Organismus. Dabei regulieren Transkriptionsfaktoren über die Bindung an spezifische DNA Regionen die Expression ihrer Zielgene. Die Bindung an diese *promotor* oder *enhancer* Regionen kann entweder zu einer erhöhten oder verringerten Expression der Zielgene führen ⁴. Die eigentliche Funktion eines Transkriptionsfaktors ist die Rekrutierung der RNA Polymerase zu der entsprechenden Ziel-DNA, die daraufhin transkribiert wird. Transkriptionsfaktoren agieren entweder eigenständig oder als Multiproteinkomplexe in Verbindung mit verschiedenen Kofaktoren ^{129 130}. Neben der Proteinexpressionsmenge sind posttranslationale Modifikationen weitere regulatorische Elemente, welche die Funktion der einzelnen Transkriptionsfaktoren entscheidend beeinflussen können. Aufgrund des charakteristischen Expressionsmusters und der essentiellen Funktionen während der frühen Embryogenese wurde vermutet, dass die Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog

das Zentrum des transkriptionellen regulatorischen Netzwerkes in embryonalen Stammzellen bilden ^{37, 131, 132}. Genomweite Promotorbindungsstudien bestätigten, dass diese Proteine die Haupt- oder zentralen Transkriptionsfaktoren der Pluripotenz sind und mit einem weiteren Transkriptionsfaktor (Sox2) kooperativ interagieren ^{113, 133, 134}. So konnte gezeigt werden, dass Oct4, Sox2 und Nanog einen autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus etablieren, indem sie ihre eigene Expression und die Expression untereinander regulieren (siehe **Abb. 1.6**). Man vermutet, dass diese Art von autoregulatorischen Mechanismen die Expression der einzelnen Faktoren stabilisiert und so die Aufrechterhaltung des pluripotenten Zustandes der embryonalen Stammzellen unterstützt ⁴. Des Weiteren binden diese drei zentralen Transkriptionsfaktoren kooperativ an eine Vielzahl von Zielgenen und kontrollieren deren Expression ^{113, 134}. So werden z.B. Pluripotenz-assoziierte Transkriptionsfaktoren und Chromatin-Remodulierungsfaktoren in ihrer Expression verstärkt, wohingegen differenzierungsassoziierte Transkriptionsfaktoren und miRNAs reprimiert werden ³. Diese netzwerkartige Struktur der Genexpressionskontrolle, reguliert durch die zentralen Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog, ermöglicht den embryonalen Stammzellen äußerst effizient die Pluripotenz oder den Differenzierungsprozess zu steuern ¹³⁵.



5.4.2.2 Regulation der Pluripotenz auf epigenetischer Ebene

Als Chromatin bezeichnet man den stark kondensierte Zustand der DNA innerhalb des Zellkerns ¹³⁶. Die DNA wird dabei um mehrere Histone gewickelt und so komprimiert ¹³⁷. Man unterscheidet stark kondensiertes, transkriptionell inaktives Heterochromatin und dekondensiertes transkriptionell aktives Euchromatin ¹³⁸. Zusätzlich wird die transkriptionelle Aktivität des Chromatins durch DNA Methylierungen und Histonmodifikationen beeinflusst ¹³⁹. Zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen der Histone gehören diverse Azetylierungen und Methylierungen ¹³⁶. Im allgemeinen führen Histonmodifikation durch Proteine der Trithorax Gruppe (TrxG) zur Aktivierung der Transkription (z.B. H3K4, Histon 3 Lysin 4 Methylierung und Azetylierung), wohingegen Modifikationen durch Proteine der Polycomb Gruppe (PcG; H3K9 und H3K27 Methylierung) die Transkription inhibieren ¹⁴⁰. Bei den sogenannten „bivalenten“ Histondomänen sind zeitgleich Modifikationen der TrxG (H3K4) und PcG (H3K27) Proteingruppe vorhanden. Bei diesen Domänen kommt es zur Rekrutierung und Initiation der Transkriptionsmaschinerie, aber durch die inhibierende Wirkung der PcG Proteine nicht zur vollständigen Elongation des Transkripts ⁴. Die auf diese Weise regulierten Gene werden als „Poised“ (zur aktiven Transkription vorbereitet) bezeichnet (siehe **Abb. 1.6**)¹⁴¹. Interessanterweise handelt es sich bei einer Vielzahl der von Oct4, Sox2 und Nanog gebundene Promotorregionen um differenzierungsassoziierte Gene mit „bivalenten“ Histonmodifikationen ¹⁴². Es wurde daher vermutet, dass die Bindung von Oct4, Sox2 und Nanog an diese differenzierungsassoziierten Gene die Rekrutierung der Polycomb Proteine unterstützt und so die Expression dieser Gene reguliert ¹³³. Ein weiteres Beispiel für die kooperative Wirkungsweise der zentralen Transkriptionsfaktoren und der epigenetische Regulation bei der Erhaltung der Pluripotenz ist die Oct4 bedingte Expression verschiedener Histondemethylasen und die davon abhängige Nanog Expression ¹⁴⁰.

5.4.2.3 MicroRNAs und Pluripotenz

Die essentielle Bedeutung der MicroRNAs für die Selbstregulation der ESCs wurde deutlich, nachdem gezeigt werden konnte, dass ESCs mit defizienter miRNA Prozessierungsmaschinerie Proliferation- und Differenzierungsdefekte aufwiesen ^{143, 144}. MicroRNAs sind nicht-kodierende RNAs in einer Länge von ca. 22 Nukleotiden. Sie regulieren die Pluripotenz und den Differenzierungsprozesses der embryonalen Stammzellen über die Degradation der Ziel-mRNA oder durch die Inhibition der mRNA Translation ¹³⁹. Die zentralen Transkriptionsfaktoren wiederum kontrollieren über die Expressionsregulation der verschiedenen miRNAs die Pluripotenz und den Differenzierungsprozess der ESCs (siehe **Abb. 1.6**) ^{4, 145}.

5.4.2.4 Die zentralen Transkriptionsfaktoren der Pluripotenz

5.4.2.4.1 Oct4 und die Familie der POU-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der POU-Transkriptionsfaktor (Pit, Oct, Unc) umfasst ein Vielzahl von Transkriptionsfaktoren verschiedener Spezies mit unterschiedlichsten biologischen Funktionen (Oct1, Oct2, Oct6, PIT1, BRN2)¹⁴⁶. Die Transkriptionsfaktoren dieser Familie bestehen aus einer N- und C-terminalen Domäne sowie aus einer charakteristischen POU Domäne¹⁴⁷. Aufgrund von Sequenzhomologien in der POU Domäne wurden diese Transkriptionsfaktoren in sechs verschiedene Untergruppen eingeteilt^{148, 149}. Innerhalb der Oct-Proteinfamilien-Untergruppen (Oct1, Oct2, Oct4 und Oct6) waren diese Homologien am stärksten ausgeprägt¹⁵⁰. Die POU DNA-Bindungsdomäne unterteilt sich in eine N-terminale POU spezifische Domäne (POU_S) und eine C-terminale POU Homöodomäne (POU_{HD}), die durch flexible Linker in variablen Längen verbunden sind (**Abb. 1.7 A**)¹⁵¹. Strukturell charakteristisch für die POU-Transkriptionsfaktorfamilie ist die Sekundärstruktur der beiden Subdomänen in Form eines H-T-H (Helix-turn-Helix)-Motives. Die POU_S und die POU_{HD} Domänen bestehen demzufolge aus vier bzw. drei alpha-Helices, die teilweise für den Kontakt mit der Ziel-DNA verantwortlich sind^{146, 149}. Beide Subdomänen fungieren als eine funktionelle Einheit und erkennen die für POU-Transkriptionsfaktoren spezifische, 8 Basenpaar-umfassende, kanonischen Oktamer-Sequenzen ATGCAAAT¹⁵². Dabei binden die beiden POU Domänen jeweils eine Hälfte der Oktamer-Sequenz (POU_S ATGC; POU_{HD} AAAT)¹⁵¹. Die Flexibilität der Linker Region sowie die Erkennung verschiedener Konsensussequenzen des Oktamer-Motives ermöglicht es den POU-Transkriptionsfaktoren an eine Vielzahl von Ziel-Genen zu binden und so deren Transkription entsprechend zu aktivieren oder zu inhibieren¹⁵³. So können die Subdomänen z.B. in unterschiedlicher Orientierung an die DNA binden oder gewisse Basenpaarabstände innerhalb der zweigeteilten Oktamer-Sequenzen tolerieren (**Abb. 1.7 B**)^{152, 154}. Die POU-Domänen-Transkriptionsfaktoren binden dabei an definierte DNA-Motive innerhalb der Promotorregionen verschiedener Zielgene, welche unter den Begriffen PORE, MORE und NORE zusammengefasst wurden^{152, 155-157}. Das NORE Motiv „N Oct-3 recognition element“ wurde bisher nur im Zusammenhang mit BRN-2 beschrieben und spielte in den nachfolgenden Untersuchungen keine Rolle¹⁵⁸. Das „Palindromic Oct-factor Recognition Element“ (PORE, ATTTGAAATGCAAAT) wurde als POU/DNA-Bindungsmotiv innerhalb des Osteopontin Gens (OPN) identifiziert¹⁵⁵. Das zweite POU-Faktor Erkennungselement MORE („more“ PORE, ATGCATATGCAT) wurde als Ziel-Sequenz von Oct1 und Oct2 im Immunglobulin „heavy chain enhancer“ detektiert¹⁵⁶. Diese Sequenzen werden standardmäßig zur genaueren Analyse der POU-Transkriptionsfaktor / DNA-Bindung eingesetzt¹⁵⁹. Mithilfe dieser artifiziellen Bindungsmotive konnte gezeigt werden, dass POU-Transkriptionsfaktoren an diversen

Zielsequenzen mit anderen Transkriptionsfaktoren heterodimerisieren bzw. als Monomer oder Homodimer binden (**Abb. 1.7 C**)¹⁵⁷. Die meisten der bisher beschriebenen Oct4-Zielgene ähneln dem artifiziiellen PORE-Motive. Die *in vivo* Relevanz des MORE-Motives ist noch nicht vollends verstanden, es zeigt jedoch das Oct4 DNA in verschiedenen Konformationen binden kann.

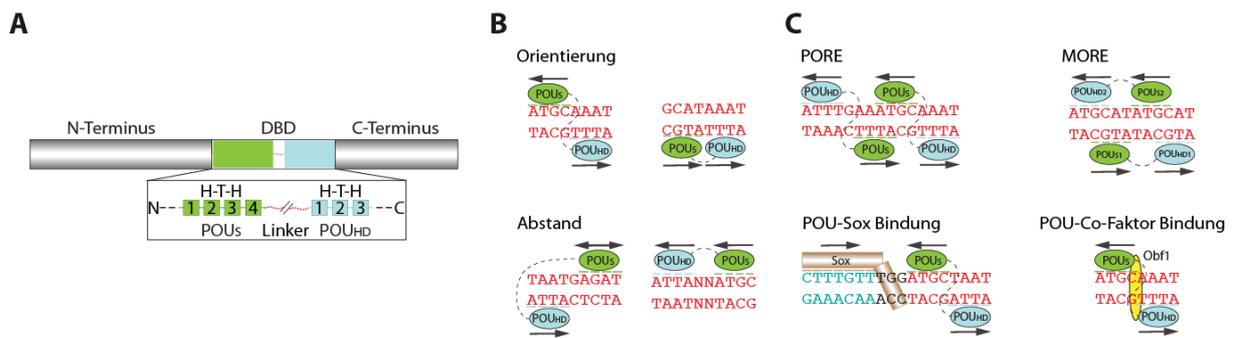


Abb. 1.7: Struktur der POU-Transkriptionsfaktoren und verschiedene DNA-Bindungsmotive

A) POU-Transkriptionsfaktoren setzen sich aus einem N- und C-terminalen Teil und einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) zusammen. Die DBD besteht aus einer spezifischen Domäne (POU_S) und einer Homöodomäne (POU_{HD}), die durch einen Linker verbunden sind. **B)** Diese flexible Linker-Region ermöglicht es den POU-Transkriptionsfaktoren an verschiedene Oktamer-Konsensussequenzen mitzubinden. Dabei erlaubt der Linker einen gewissen Grad an Reorientierung der Subdomänen untereinander. Basenpaarinsertionen innerhalb der Oktamer-Sequenz werden daher ebenfalls toleriert. **C)** POU-Transkriptionsfaktoren sind in der Lage an verschiedenen Ziel-Sequenzen (PORE-, MORE-Motive) als Monomer oder Homodimer zu binden oder mit anderen Transkriptionsfaktoren zu heterodimerisieren. H-T-H, Helix-turn-Helix-Motiv; Obf1, Oct binding factor 1 (adaptiert nach¹⁵²)

Oct4 (*octamer-binding transcription factor 4*, Pou5f1, Oct4A) gehört zur fünften Untergruppe der POU-Transkriptionsfaktorfamilie, der spezifisch während der Embryonalentwicklung, in Keimbahnzellen, in entarteten embryonalen Karzinomzellen sowie in ESCs exprimiert wird¹⁶⁰. Während der frühen Embryogenese beschränkt sich die Expression von Oct4 auf die totipotenten Blastomere und die pluripotenten Zellen der Inneren Zellmasse sowie den Epiblastzellen¹⁶¹. Mit voranschreitender Spezialisierung bzw. Differenzierung der Zellen kommt es zum stetigen Expressionsverlust von Oct4¹⁶². Die Erstbeschreibung von Oct4 als Hauptregulator der Pluripotenz erfolgte 1998. So konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Oct4 zum Verlust der Pluripotenz der Zellen der Inneren Zellmasse und zum Absterben des Embryos führte^{132, 163}. Des Weiteren führte die Reduktion der Oct4-Expression in ESCs um die Hälfte zur Differenzierung in Trophektoderm. Eine 2-fache Überexpression hingegen bedingt die Differenzierung der Zellen in primitives Endoderm und Mesoderm¹⁶⁴. Daher ist ein konstantes Oct4-Expressionsniveau ein entscheidendes Kriterium zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz. Die Kontrolle der Oct4-Expression erfolgt durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener regulatorischer Ebenen und wurde in der **Abb. 1.8**

zusammengefasst. So regulieren z.B. verschiedene Chromatin-modifizierende Proteine die Transkription von Oct4 durch die Remodulierung der Chromatinstruktur. Verschiedene Transkriptionsfaktoren steuern die Oct4-Menge in dem sie die Expression entweder aktivieren oder inhibieren. Zusätzlich wird die Oct4-Expression bzw. Stabilität auf Ebene der mRNA Expression und durch posttranslationale Modifikationen reguliert ¹⁶².

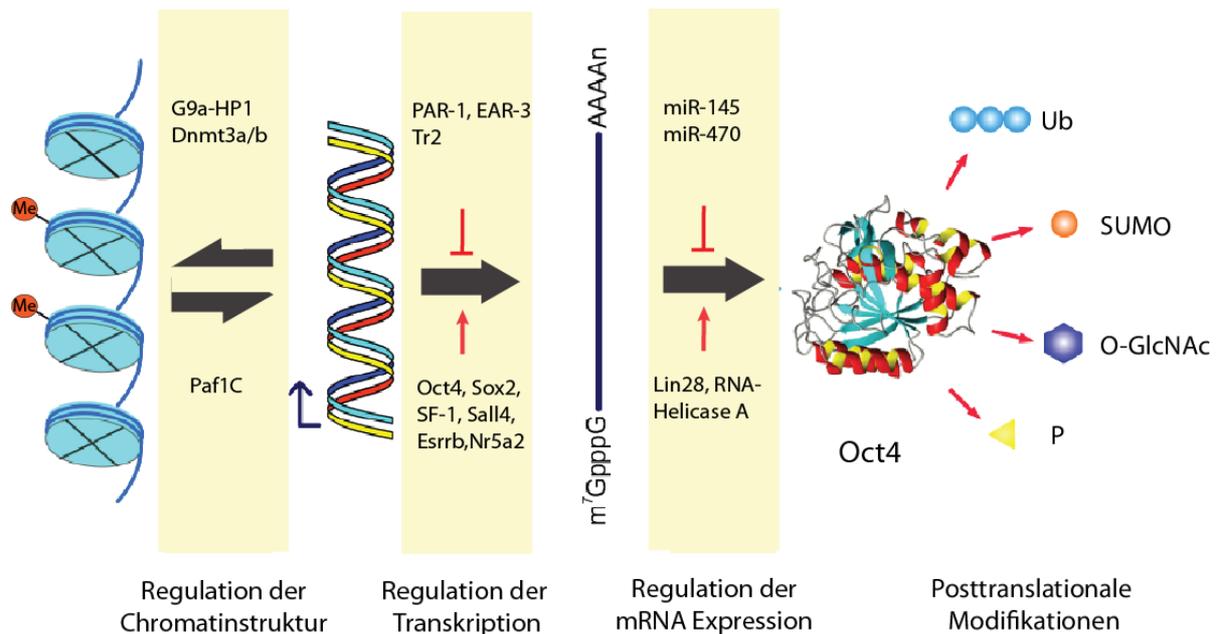


Abb. 1.8: Verschiedene regulatorische Ebenen der Oct4-Expression

Übersichtsdarstellung der verschiedenen regulatorischen Ebenen der Oct4-Expression, Stabilität und Funktion. Die Gesamtproteinmenge von Oct4 wird durch die Regulation der Chromatinstruktur, der Transkription und der mRNA Expression gesteuert. Auf posttranslatonaler Ebene wird die Stabilität und Funktion von Oct4 durch verschiedene Modifikationen reguliert. (Adaptiert nach ¹⁶²)

Vom humanen Oct4 existieren drei Transkript-Isoformen (*Oct4A*, *Oct4B*, *Oct4B1*) die als Produkt des alternativen Spleißens aus dem Gen *Pou5f1* hervorgehen ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Diese drei Transkript-Isoformen kodieren für vier verschiedene Protein-Isoformen (Oct4A, Oct4B-190, Oct4B-265, und Oct4B-164), wobei die Funktionen der drei Oct4B-Isoformen weitestgehend unbekannt sind. Die Existenz von murinen Oct4 Transkript-Isoformen wird ebenfalls diskutiert ¹⁶⁸. Innerhalb verschiedener Spezies ist ausschließlich die Aminosäuresequenz dieser Oct4A-Protein-Isoform konserviert (zu 87 % identisch zum murinen Oct4) (**Abb. 1.9**). Bei der Aufrechterhaltung und Induktion der Pluripotenz konnte bisher nur für die Oct4A-Isoform eine funktionelle Relevanz nachgewiesen werden ¹⁶². Das humane Oct4 umfasst eine Länge von 360 Aminosäuren (AS) und besteht aus der zweigeteilten POU-Domäne sowie einer N-terminalen (133 AS) und einer C-terminalen Transaktivierungsdomäne (71 AS) (TAD) ^{169, 170}. Die durch einen flexiblen Linker (17 AS) miteinander verbundene zweigeteilte POU-Domäne (POU_S 75 AS; POU_{HD} 60 AS)

ermöglicht es Oct4 an verschiedene Zielgene zu binden und so deren Expression zu regulieren ¹⁷¹. Innerhalb der POU_{HD} befindet sich als weiteres funktionelles Element ein Kern-Lokalisations-Signal (RKRKRTS) mit einer potenziellen PKA Phosphorylierungsstelle (**Abb. 1.9**) ¹⁷². Damit ein Transkriptionsfaktor mit der entsprechenden Ziel-DNA Sequenz interagieren kann, muss er sich im Kern der Zelle befinden. Manche Transkriptionsfaktoren befinden sich in einer stetigen Bewegung (*shuttle*) zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma und in vielen Fällen wird dieser Prozess durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung sogenannter Kern-Lokalisations-Signal (NLS) oder ein Kernexportsignal (NES) gesteuert ¹⁷³. Änderungen des Phosphorylierungszustandes haben dabei eine entscheidende Bedeutung, ob eine solche Signalsequenz von den Proteinen der Transkriptionsfaktor Kernimport- oder Kernexportmaschinerie erkannt werden kann ¹⁷³.

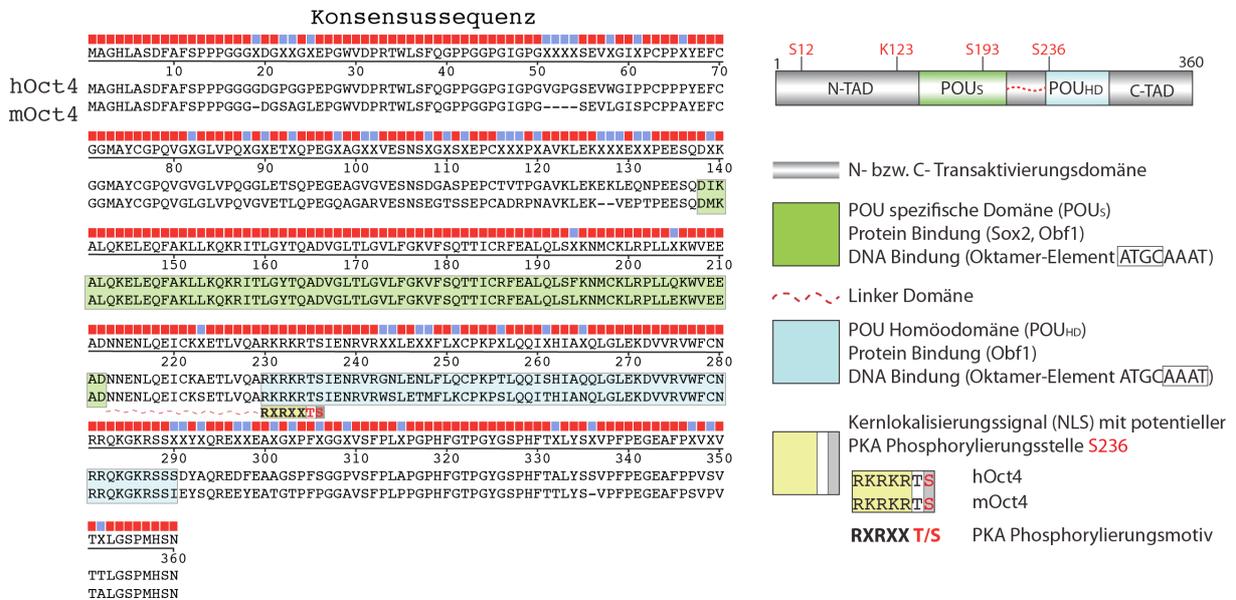


Abb. 1.9: Struktur von Oct4 mit bekannten Phosphorylierungsstellen

Die humane Oct4-Aminosäuresequenz ist hoch konserviert und ist zu 87 % mit der murinen Sequenz identisch. Es sind bereits mehrere posttranslationale Modifikationen des murinen Oct4 bekannt. Die korrespondierenden Aminosäuren dieser Modifikationen in der humanen Oct4 Sequenz wurden hervorgehoben (S12, K123, S193, S236).

Posttranslationale Modifikationen (PTM) nehmen bei der POU-Protein-vermittelten Transkriptionsregulation eine entscheidende Rolle ein und umfassen Oxidation, Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung und Glykosylierung ¹⁵². Unter posttranslationalen Modifikationen versteht man kovalente Veränderungen der Struktur eines Proteins, die durch den Transfer oder durch die proteolytische Abspaltung einer modifizierenden Gruppe, an die Aminosäuren des Proteins, bedingt wird ¹⁷⁴. Diese chemischen Veränderungen können unter anderem die Aktivität, Lokalisierung, und

Stabilität eines Proteins beeinflussen sowie die Interaktion mit anderen Proteinen regulieren¹⁷⁴. Eine der am häufigsten vorkommenden Modifikation der POU-Transkriptionsfaktorfamilie ist die Proteinphosphorylierung^{170, 175-178}. Ausgehend von veränderten extrazellulären Umwelteinflüssen regulieren verschiedene Signaltransduktionskaskaden die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren, transkriptionellen Koregulatoren und Chromatin-modifizierenden Proteine¹⁷³. Diese Modifikationen beeinflussen in der Folge die Transkriptionsfaktoraktivität entweder positiv oder negativ^{176, 179}. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die transkriptionelle Aktivität des murinen Oct4 neben der Gesamtproteinmenge ebenfalls von diversen posttranslationalen Modifikationen abhängig war (**Abb. 1.9**)^{147, 180-186}). Die Proteinkinase A (PKA) vermittelte Serin bzw. Threonin Phosphorylierung, innerhalb der POU Homöodomäne, scheint dabei eine zentrale Rolle bei der POU-Transkriptionsfaktorfamilie-vermittelten Genexpression einzunehmen (Pit-1, Oct1, Oct2, BRN2, Oct4)^{158, 176, 181, 187, 188}. Die Phosphorylierung des korrespondierenden Serins im humanen Oct4 wurde 2009 und 2011 nachgewiesen^{189, 190}. Bisher konnte jedoch noch nicht bestätigt werden, dass die Phosphorylierung des humanen Serin 236 auf die Aktivität von PKA zurückzuführen ist. Interessanterweise scheint der aktive PKA-Signalweg eine funktionelle Rolle bei der Überführung des „naiven“ in den „primed“ Stammzellzustand einzunehmen³⁶.

5.4.2.4.2 Sox2

Der Transkriptionsfaktor Sox2 (*SRY-related HMG-box*) gehört zu der Familie der HMG (High Mobility Group)-Proteine mit einer einzelnen HMG DNA-bindenden Domäne sowie einer Transaktivierungsdomäne¹⁹¹. Die Bindung der HMG-Proteine an die kleine Furche der Ziel-DNA Helix führt zu einer Krümmung der DNA wodurch die transkriptionelle Aktivität von Sox2 und verschiedener Koaktivatoren beeinflusst wird^{150, 192}. Sox2 wird in der IZM, den Epiblaststammzellen und den Keimbahnzellen exprimiert. Durch verschiedenen RNA Interferenz Studien und Deletionsmutationen konnte die entscheidende Rolle von Sox2 bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz in den ESC und während der frühen Embryogenese nachgewiesen werden⁹⁹. Im Gegensatz zu anderen Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren wie Oct4 und Nanog wird Sox2 zusätzlich in späteren Stadien der Embryonalentwicklung sowie in adulten neuronalen Stammzellen exprimiert⁹⁹. Mehrere Studien verdeutlichen die kooperative Wirkungsweise von Sox2 mit anderen Transkriptionsfaktoren bei der Regulation verschiedener Zielgene in unterschiedlichen Stadien der Embryonalentwicklung¹⁵⁰. Eine der am besten charakterisierten Kooperation von Sox2 ist dabei die Interaktion mit dem POU Transkriptionsfaktor Oct4¹⁹³. Die Transkriptionsfaktoren binden gemeinsam an Oct/Sox

Bindungssequenzen (z.B. TTTTGCAT/TACAATG) in diversen Promotorregionen und regulieren so ihre eigene Expression sowie die Expression verschiedener Zielgene^{99, 194}. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass während der frühen Phase der Embryogenese die Bindung des Oct4/Sox2-Komplex entscheidend für die Expression verschiedener Pluripotenz-assoziiierter Gene wie *Utf1*, *Fgf4*, *Lefty-A* und *Nanog* ist^{150, 194-196}. Es wird vermutet, dass die exakte Steuerung der Expression der Zielgene zum einen von der Gesamtmenge von Oct4 oder Sox2 abhängt oder zum anderen durch Sequenzunterschiede innerhalb der Oct/Sox-Bindungssequenz bedingt ist^{150, 164, 197}. Interessanterweise konnte der Sox2 RNA Interferenz bedingte Verlust der Selbsterneuerungskapazität der ESC durch eine vermehrte Oct4 Expression kompensiert werden⁷⁷. Man vermutete daraufhin, dass andere Sox Proteine wie Sox15, eine Sox2 redundante Wirkungsweise haben und kooperativ mit Oct4 die Zielgenexpression steuern¹⁹⁸. Die Funktion von Sox2 wird neben der Interaktion mit Oct4 von verschiedenen posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung und Sumoylierung reguliert¹⁹⁹.

5.4.2.4.3 Nanog

Die Erstbeschreibung von Nanog („Tir na nÓg“ = „Land der ewigen Jugend“) als wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Aufrechterhaltung des pluripotenten Zustandes in ESCs erfolgte im Jahre 2003^{131, 200}. Nanog gehört zur Gruppe der Homöodomänen-Proteine und zeigt eine gewisse Ähnlichkeit zu den Transkriptionsfaktoren der Nkx Familie¹⁹¹. Das humane Protein ist 305 Aminosäuren lang und besteht aus einer N-terminalen Domäne (NTD), einer Homöodomäne (HD) und einer C-terminalen Domäne (CTD). Die CTD unterteilt sich in zwei Transaktivierungsdomänen (CD1, CD2) und einer repetitiven Tryptophan Sequenz, welche für die transkriptionelle Aktivität von Nanog entscheidend sind²⁰¹. Nanog wird während der Embryonalentwicklung in den inneren Zellen der kompakten Morula sowie in der Inneren Zellmasse der frühen Blastozyste und den Epiblastzellen exprimiert²⁰⁰. Mit beginnender Spezialisierung/Differenzierung dieser Zellen kommt es zum Expressionsverlust von Nanog²⁰². Die ektopische Überexpression von Nanog stabilisiert den pluripotenten Zustand der ESCs und ermöglicht die Lif bzw. Kokultivierungszellen unabhängige Kultivierung der mESCs bzw. hESCs^{131, 200, 203}. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Expression von Nanog teilweise durch Lif bzw. Tgf- β /Aktivin/Nodal Signalweg reguliert wird^{108, 204, 205}. Neben der bereits erwähnten Funktion als Teil des zentralen Transkriptionsfaktorkomplexes beeinflusst Nanog direkt die Expression von Oct4 und moduliert bei der Induktion der Pluripotenz in somatischen Zellen den Übergang von unvollständig reprogrammierten pre-iPS Zellen zu vollständig reprogrammierten „naiven“ iPS Zellen^{118, 206, 207}. Des Weiteren wird vermutet, dass Nanog bei der Aufrechterhaltung des pluripotenten Zustandes eine untergeordnete

Rolle spielt und *in vivo* vornehmlich für die Etablierung der Inneren Zellmasse und der Keimbahnzellen entscheidend ist ¹⁵⁰. Ähnlich wie für Oct4 und Sox2 beschrieben, können posttranslationale Modifikationen die Funktion von Nanog beeinflussen ²⁰⁸.

5.5 Zielsetzung der Arbeit

Für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Zustandes in embryonalen Stammzellen ist eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Transkriptionsfaktoren verantwortlich. Die Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog agieren kooperativ und steuern über einen autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus die Pluripotenz der ESC. Die genaue Regulation dieses Transkriptionsfaktorenkomplexes ist nur teilweise verstanden, man vermutet jedoch, dass unabhängig von der Gesamtproteinmenge verschiedene Kofaktoren und posttranslationale Modifikationen die Funktionen dieser Faktoren zusätzlich beeinflussen.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob posttranslationale Modifikationen die Funktion des zentralen Transkriptionsfaktors Oct4 beeinflussen. Eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen ist die Phosphorylierung. Daher sollte überprüft werden, ob Oct4 in humanen embryonalen Stammzellen phosphoryliert wird und ob sich der Phosphorylierungszustand im Verlaufe der spontanen Differenzierung der ESCs verändert. Im Anschluss daran sollte die Funktion und die für die Phosphorylierung verantwortliche Kinase identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung könnten in der Folge dazu beitragen, die fundamentalen Prozesse der frühen Embryogenese und deren molekularen Regulation besser zu verstehen.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
8-Bromoadenosine 3',5' cyclic monophosphate	Sigma, St. Louis, MO, USA
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	BMA, Rockland, ME, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Bacto Agar	Difco/BD, Sparks, MD, USA
Bacto Trypton	Difco/BD, Sparks, MD, USA
β -Mercaptoethanol	Gibco BRL, Billings, MT, USA
Blasticidin	Calbiochem, LaJolla, CA, USA
Blocking Reagent	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Whitehouse Station, NJ, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroquin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, MO, USA
DAPI	Sigma, St. Louis, MO, USA
DEPC	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DTT	Sigma, St. Louis, MO, USA
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMEM/F12	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dynabeads® Protein G	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fgf2	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll	Sigma, St. Louis, MO, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
GlykoBlue™	Applied Biosystems, CA, USA
H-89, Dihydrochlorid	EMD Chemicals, Gibbstown, USA
Hefeextrakt	Difco/BD, Sparks, MD, USA
HEPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland
IGEPAL	Sigma, St. Louis, MO, USA
Imperial Protein Stain	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
KSR	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lithiumchlorid	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Matrigel®	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Mitomycin	Sigma, St. Louis, MO, USA
MOPS	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacid (NaN ₃)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Substanz	Hersteller
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin, Deutschland
Natriumorthovanadat	Sigma, St. Louis, MO, USA
NP40	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Optimem	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phalloidin	Sigma, St. Louis, MO, USA
PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA Marker GeneRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail I-II	Sigma, St. Louis, MO, USA
PMSF	Sigma, St. Louis, MO, USA
poly[d(I-C)]	Roche, Mannheim, Deutschland
Polybren	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Ponceau-Rot	Sigma, St. Louis, MO, USA
Protein-A-Sepharose	Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden
Protein-Assay (Bradford Reagenz)	BioRad, München, Deutschland
Proteaseinhibitorcocktail	Sigma, St. Louis, MO, USA
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Smart Ladder	Eurogentec, München, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	SERVA, Heidelberg, Deutschland
TRIZOL®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween®20	SERVA, Heidelberg, Deutschland

6.1.2 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp
129/Sv3	Maus embryonale Stammzelllinie (Labor S. Noggle, NYSCF)
BGN I	Humane embryonale Stammzelllinie (Novocell)
BGN II	Humane embryonale Stammzelllinie (Novocell)
H1	Humane embryonale Stammzelllinie (WiCell)
H9	Humane embryonale Stammzelllinie (WiCell)
HeLa	Humane Cervix-Karzinom Zelllinie (Labor W. Birchmeier)
MEFs	Primäre Fibroblasten aus murinen Embryonen (E 12,5-13,5)
Oct4-GFP MEF	Primäre Fibroblasten aus murinen Embryonen welche ein GFP Reporter Gen unterhalb des Exon 5 des endogenen Oct4 Locus besitzen (Stemgent ®)
Platinum-E (PlatE)	retrovirale Verpackungszelllinie zur Produktion ekotropher Viren (BioCat)

6.1.3 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Stratagene, Santa Clara, USA
<i>E. coli</i> XL1 blue	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>E. coli</i> XL10-Gold Ultracompetent Cells	Stratagene, Santa Clara, USA

6.1.4 Radioaktive Verbindungen

Verbindung	Hersteller
[γ - ³² P]dATP (3000 Ci/mmol, 10mCi/ml)	NEN, Boston, MA, USA
[α - ³² P]dCTP (3000 Ci/mmol, 10mCi/ml)	NEN, Boston, MA, USA

6.1.5 Antikörper

Spezifität (Experiment)	Isotyp	Hersteller	Produktnummer
hOct4 (WB)	Ziege	R&D Systems	#AF1759
hNanog (WB)	Ziege	R&D Systems	#AF1997
hSox2 (WB)	Ziege	R&D Systems	#AF2018
hOct4 N-19(WB,ChIP,IP)	Ziege	SantaCruz	#sc-8628
hOct4 H-134(WB,IF)	Kaninchen	SantaCruz	#sc-9081
PKAa Cat c-20 (WB)	Kaninchen	SantaCruz	#sc-903
FLAG M2 (WB)	Maus	Sigma Aldrich	#F3165
LaminA/C (WB)	Ziege	SantaCruz	#sc-20681
α -TUBULIN	Maus	Sigma Aldrich	#T6199
Anti-Human IgG (ChIP)	Ziege	Sigma Aldrich	#11886
α -Kaninchen-IgG/HRP	-	DAKO EnVision-Kit	#p0448
α -Maus-IgG/HRP	-	DAKO EnVision-Kit	#p0447
α -Ziege-IgG//HRP	-	DAKO EnVision-Kit	#p0449
α -Kaninchen-IgG Cy2	-	Jackson	#711-225-152
α -Maus-IgG Cy5	-	Jackson	#712-495-153

6.1.6 Enzyme

Enzym	Hersteller
AccuPrime™ Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
ERK2, Active	BIOZOL, Eching, Deutschland
Dispase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Klenow-Fragment	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PKA α , Active	BIOZOL, Eching, Deutschland
Platinum Pfx DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Reverse-Transkriptase	Promega, Madison, WI, USA
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison, WI, USA
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

6.1.7 Kits

Die verwendeten Kits wurden analog zu den Angaben des Herstellers eingesetzt und werden im nach folgenden nicht näher beschrieben.

Kit	Hersteller	Produktnummer
Signal CRE Reporter Assay Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	#CCS-002L
ECL	GE Healthcare, CA, USA	#RPN2132
Nucleobond Maxi Kit	Clontech, Palo Alto, CA, USA	#740417
Power SYBR® Green PCR	Applied Biosystems, Foster City, CA,	#4367659

Kit	Hersteller	Produktnummer
Master Mix	USA	
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	#27106
QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	#20021
QuikChange® Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, LaJolla, CA, USA	#200518
QuickTiter Retrovirus Quantitation Kit	BioCat, Heidelberg, Deutschland	#VPK-120-CB
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland	#79254
TOPO TA cloning® kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	#K4500-01

6.1.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
BD Falcon™ 100 mm Zellkulturplatten 6-Well-Platten, 5 ml Röhrchen mit Zellsieb	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Protein G Dynabeads	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PVDF Membran Polyvinylidenfluorid, Immobilon-P, 45µm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LumiNunc, F96 96 Well Platten, weiss	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, CA, USA
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris gels	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris ZOOM®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Quick Spin Column	Roche, Basel, Schweiz
Stericup-GP, PES, 0,22 µm	Millipore Billerica, MA, USA
Ultrafree-0.5 Biomax 10kDa 25/Pk	Millipore, Billerica, MA, USA
Whatmanpapier	Schleicher&Schuell Bio Science, Dassel
ZOOM® IPGRRunner™	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ZOOM® Strips pH4-7	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

6.1.9 Plasmide

Plasmid	Hersteller
3xOct/Sox-TK_Luc	erhalten von Takashi Tada ¹⁹⁶
pCR®2.1-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pExpress-hOct4	Imagenes, Berlin, Deutschland
pFLAG-CMV-2	Sigma Aldrich
pGEX-6P-1	GE Healthcare Europe, München, Germany
pMXS-mOct4	Addgene, Cambridge, MA, USA
pMXS-mSox2	Addgene, Cambridge, MA, USA
pMXS-mKlf4	Addgene, Cambridge, MA, USA
pMXS-mc-Myc	Addgene, Cambridge, MA, USA
pMXS-MCS	siehe Methoden
pMXS-hOct4 (sowie alle generierten Mutanten)	siehe Methoden
pFLAG-hOct4	siehe Methoden
pFLAG-hOct4 Mutanten	siehe Methoden
pExpress hOct4 Mutanten	siehe Methoden
pGEX-6P-hOct4 Wildtyp bzw. Mutanten	siehe Methoden

6.1.10 Synthetische Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen oder Biotex (Berlin-Buch) bezogen.

6.1.10.1 PCR

Gen	5'-Primer	3'-Primer	Anwendung
hp107 +2kb TSS	GATGTTCTGCTTCAGCCTCC	TGGGCAACATAGTCAGATACTATCTCCC	ChIP
hU2	TTTGCTCCCACTGCCGTC	CTGAGTCTTTCGGTGCCC	ChIP
hβ-Actin	CAAGGCGGCCAACGCCAAAACCTCT	GCCATAAAAGGCAACTTTCGGAAACG	ChIP
hOct4	TTGCAGCTGTGTTCACTTCTCG	TGTGGAGATTCCAGCCAAATCC	ChIP
hSox2	CCAGTTCCTCAATTCTAAGCAAGGC	TTTGAAGTGCCTCAAATTCGGGG	ChIP
hLefty-A	AGAAGCTGAGGCAAGAAGATCGCT	GCACCTTCTCACTTCCTTCATCTC	ChIP
hFgf4	AACGCCAAACAGCATGGAGACC	AAGAAGACACTTGCAAAGCCGC	ChIP
hβ-Actin	TGGCACCACACCTTCTACAATGAGC	GCACAGCTTCTCCTTAATGTCACGC	RT-PCR
hS18	TACTCAACACCAACATCGATGGGC	ATCTTGTACTGGCGTGGATTCTGC	RT-PCR
hGapdh	ACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG	AGCTTGACAAAGTGGTCTGTTGAGG	RT-PCR
hOct4	CCGCCGTATGAGTTCTGTGGG	TTTGCTCCAGCTTCTCCTTCTCC	RT-PCR
hNanog	TTGTCTTCAGGTTCTGTTGCTCGG	ATAACATGAGGCAACCAGCTCAGTCC	RT-PCR
hNodal	AGACATCATCCGCAGCCTACA	GACCTGGGACAAAGTGACAGTGAA	RT-PCR
hLefty-A	GGGAATTGGGATACCTGGAT	CTAAATATGCACGGGCAAGG	RT-PCR
hMSX2	AAATCTGGTTCCAGAACC GAAGGG	ATGGGAAGCACAGGTCTATGGAACG	RT-PCR
mβ-ACTIN	TCGTGCGTGACATCAAAGAGAAGC	ATGGATGCCACAGGATCCATACC	RT-PCR
mN-cad	TTGCTTCTGACAATGGAATCCCGC	AAGGAAAGATCAAACGCGAACGGC	RT-PCR
mNr5a2	ACACAGAAGTTCGCGTTCAACAACC	TAGTTGCAAACCGTGTAGTCCAGC	RT-PCR
mOct4	CTGAGGGCCAGGCAGGAGCACGAG	CTGTAGGGAGGGCTTCGGGCACTT	RT-PCR
mNanog	AACCAAAGGATGAAGTGCAAGCGG	TCTGGTTGTTCCAAGTTGGGTTGG	RT-PCR
mE-cad	TTGAGGCCAAGCAGCAATACATCC	AGATGTGATTTCTGACCCACACC	RT-PCR

Erläuterungen: Die Spezies der verwendeten Primer ist mittels kleiner Buchstaben vor dem jeweiligen Gen hervorgehoben (h=human; m=murin).

6.1.10.2 Mutations- und Kolonierungsoligonukleotide

Name		Sequenz (5'→3')
hOct4 Δ 230-234 DBD	fw	CAGAAACCCTCGTGCAGGCCGAACAGTATCGAGAACC GA
	rev	TCGGTTCTCGATACTGGTTCGGCCTGCACGAGGGTTTCTG
hOct4 T235A/S236A	fw	GCCCGAAAGAGAAAGCGAGCCGCTATCGAGAACCAGTGA
	rev	CTCACTCGGTTCTCGATAGCGGCTCGCTTCTCTTTCCGGG
hOct4 T235A	fw	GCCCGAAAGAGAAAGCGAGCCAGTATCGAGAACC
	rev	GGTTCTCGATACTGGCTCGCTTCTCTTTCCGGG
hOct4 S236A	fw	CGAAAGAGAAAGCGAACCCTATCGAGAACCAGTGA
	rev	CTCACTCGGTTCTCGATAGCGGTTCTCTTTCTCTTTCCG
hOct4 T235E/S236D	fw	GCAGGCCCGAAAGAGAAAGCGAGAGGATATCGAGAACCAGTGA
	rev	GCCTCTCACTCGGTTCTCGATATCCTCTCGCTTCTCTTTCCGGGCTGC
hOct4 T235E	fw	GCAGGCCCGAAAGAGAAAGCGAGAGAGTATCGACAACCCA
	rev	TCGGTTCTCGATACTCTCTGGCTTCTCTTTCCGGGCTGC
hOct4 T236D	fw	CCGAAAGAGAAAGCGAACCCTATCGAGAACCAGTGA
	rev	TCTCACTCGGTTCTCGATATCGGTTCTCTTTCTCTTTCCG
hOct4 S359A	fw	GGCTCTCCCATGCATGCAAACCTGAGGTGCCT
	rev	AGGCACCTCAGTTTGCATGCATGGGAGAGCC
FLAG-hOct4 wt	fw	AAGCTTGCGGGACACCTGGCTTCGGATTTT
	rev	AACTTCACCTTCCCTCCAACCACT
FLAG-hOct4 ND	fw	AAGCTTGCGGGACACCTGGCTTCGGATTTT
	rev	TTATCGTTGTGCATAGTCGCTGCTTG
FLAG-hOct4 DBD	fw	AAGCTTGACATCAAAGCTCTGCAGAAAGAACTC
	rev	TTATCGTTGTGCATAGTCGCTGCTTG
FLAG-hOct4 DC	fw	AAGCTTCAAGCAGCGACTATGCACAACGA
	rev	AACTTCACCTTCCCTCCAACCACT

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Immunoblot-Transferpuffer	verwendet 35 mM Tris, 40 mM Glycin, 0,04% SDS, 20% Methanol
Immunoblot-Blockierungspuffer LB Medium	PBS-T, 2,5% Trockenmilchpulver 10 g Bacto-trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1l H ₂ O
Immunfluoreszenz-Blocklösung	0,5% Blocking Reagent in PBS-X, 10% Pferdeserum
Oligo-Anlagerungspuffer	50 mM Hepes-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl
Phenylmethylsulfonylfluorid	100 mM in Isopropanol
Polybren (4mg/ml)	40 mg Polybren in 10 ml ddH ₂ O gelöst (Aliquots -20°C)
Phosphate buffered saline(PBS) (10x)	6,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 3 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4 (HCl)
PBS-T	PBS, 0,1% Tween-20
PBS-X	PBS, 0,1% TritonX-100
Protein-A-Sepharose Suspension	50% (vol/vol) Protein-A-Sepharose in H ₂ O
5xSDS-Laufpuffer	250 mM Tris, 2,5 M Glycin, 0,5% SDS
TBE	0,1 M Tris, 0,1 M Borsäure, 2,5 mM EDTA

6.1.13 Geräte

Gerät	Hersteller
Avanti Centrifuge J-25	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Centrifuge 5417R (Zentrifuge)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CENTRO XS3 LB 960	BERTHOLD, Bad Wildbad, Deutschland
Deconvolution-Mikroskop LAS AF 6000	Leica, Wetzlar, Deutschland
Einfrierboxen	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
FACSAria™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACSCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FUJIFILM FLA-7000	FUJIFILM, Düsseldorf, Deutschland
Gel-Dokumentationssystem INFINITY-3000	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
iQ5 Echtzeit-PCR-Detektions-System	BioRad, München, Deutschland
Nanodrop Spectrophotometer ND1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
PCR-Gerät Biometra T3	Biometra, Göttingen, Deutschland
XCell II™ Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ZOOM® IPGRRunner™ Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

6.1.14 Software

Software	Hersteller
Cell Quest Pro	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACS Diva	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACSAria II	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FlowJo	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Human Protein Reference Database	http://www.hprd.org/index_html
NetPhosK 1.0 NetPhos 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/
PhosphoSitePlus	http://www.phosphosite.org/homeAction.do

6.2 Methoden

6.2.1 Zellkultur

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurden die unter 2.1.2 angegebenen Zelllinien verwendet. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Zellkulturmedien wurde in der unten stehenden Tabelle zusammengefasst. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und einer absoluten Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Die zur Aktivierung und Inhibierung des PKA Signalwegs verwendeten Chemikalien wurden in den Konzentrationen zwischen 0,5 mM – 1 mM für Br-cAmp und 10 µM – 30 µM für H-89 eingesetzt.

HeLa/PlatE Medium	MEF-Medium	mESC-Medium	hESC-Medium	SILAC-Medium
450 ml DMEM/Glutamax 4,5 g/L Glucose	500 ml DMEM/Glutamax 4,5 g/L Glucose	500 ml DMEM/Glutamax 4,5 g/L Glucose	400 ml DMEM/F12	206,25 ml DMEM/F12 w/o Arginin, Lysin
10% FCS	10% FCS	15% FCS	20% KSR	15% KSR
1% Pen/Strep	1% Pen/Strep	1% Pen/Strep	1% Pen/Strep	1% Pen/Strep
-	1% NEAA	1% NEAA	1% NEAA	1% NEAA
-	0,1 mM β-Mercaptoethanol	0,1 mM β-Mercaptoethanol	0,1 mM β-Mercaptoethanol	0,1 mM β-Mercaptoethanol
-	-	1000 U/ml LIF	1 mM L-Glutamin	1 mM L-Glutamin
-	-	-	4 ng/ml Fgf2	4 ng/ml Fgf2
-	-	-	-	Arginin10 (84mg/L)
-	-	-	-	Lysin8 (146mg/L)
5 µg/ml Plasmocin	5 µg/ml Plasmocin	5 µg/ml Plasmocin	5 µg/ml Plasmocin	5 µg/ml Plasmocin

Tabelle der Zellkulturmedien

Allgemeine Zellkultur

Die unterschiedlichen Zelltypen wurden entsprechend der jeweiligen Wachstumsgeschwindigkeiten aller drei bis vier Tage in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:15 geteilt. Dafür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend durch eine zehnmünütige Trypsin-Behandlung bei 37°C von der Zellkulturschale gelöst. Anschließend konnten die Zellen mit frischem Medium von der Platte gespült und in der gewünschten Dichte erneut ausplattiert werden.

Auftauen der Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Um DMSO Reste des Einfriermediums zu entfernen wurden die Zellen mit 10 ml Medium gewaschen, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 4 Minuten bei 1000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und erneut ausplattiert.

Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden für die Langzeitlagerung wie oben beschrieben pelletiert und in Einfrierlösung 1 (80% Zelltyp entsprechendes Medium + 20% FCS) resuspendiert. Anschließend wurde tröpfchenweise die Einfrierlösung 2 (80% FCS + 20% DMSO) zugegeben und die Zellen in 2 ml Einfrier Röhrchen überführt. Um ein kontrolliertes Abkühlen der Zellen zu gewährleisten wurden Einfrierboxen (reproduzierbare Einfrierate von $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) über Nacht bei -80°C verwendet. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen am nächsten Tag in einen Flüssigstickstoff-Tank überführt.

6.2.1.1 Gewinnung von embryonalen Fibroblasten der Maus (MEFs)

Embryonen im Alter von E12.5-E13.5 wurden aus dem Uterus einer trächtigen Maus des Auszuchtstammes Cf1 entnommen. Anschließend wurden der Kopf und die innere Organe entfernt. Für die Generierung der Fibroblasten wurden die Reste der Embryonen zerkleinert, in PBS gewaschen und durch die zweimalige Zugabe von 15 ml bzw. 10 ml Trypsin (0,25%, EDTA) und Inkubation für 15 min bei 37°C weiter vereinzelt. Danach wurde die Zellsuspension in MEF-Medium gelöst und auf 15 cm Zellkulturschalen plattiert (ca. 1 Platte / Embryo). Die Fibroblasten wurden bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert und danach wie bereits beschrieben kryokonserviert.

Mitotische Inaktivierung der MEFs

Die aufgetauten Fibroblasten wurden auf eine 15 cm Zellkulturschale plattiert und bis zur Konfluenz in MEF-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit einer zweistündigen Mitomycin-Behandlung mitotisch inaktiviert. Danach wurden diese sogenannten INAKs zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin vereinzelt und zu 3 Millionen Zellen pro Einfrier Röhrchen tiefgefroren.

6.2.1.2 Produktion ekotropher Viren zur Herstellung von induzierten pluripotenten Mausstammzellen

2x HBS Puffer	50 mM HEPES, 1,5 mM Na_2HPO_4 , 280 mM NaCl, pH = 6,5 – 7,0
Chloroquin	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration
Polybren	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration

Virusproduktion

Die Verwendung von Retroviren ermöglichen es sich teilende Zellen mit einer hohen Effizienz zu transduzieren und dadurch genetisch zu manipulieren. Es handelt sich bei dieser Methode um ein zwei Komponenten System welches sich aus dem viralen Vektor und der Verpackungszelllinie zusammensetzt. Der retroviral Vektor verfügt über das Verpackungssignal Ψ sowie die, das zu übertragende Gen flankierende 5'- und 3'LTR Regionen. Als Verpackungszelllinie wurden PlatE Zellen verwendet, welche die für die Verpackung des Virus wichtigen retroviralen Proteine gag, pol und env zur Verfügung stellen.

Die PlatE Zellen wurden vor der Transfektion in PlatE Medium ohne Antibiotika kultiviert und für die Virusproduktion zu einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/10 cm Schale ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit der CaPO_4 Methode transfiziert. Hierzu wurden 9 μg der jeweiligen Plasmid-DNA mit 50 μl 2,5 M CaCl_2 vermischt und auf 500 μl mit sterilem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde diese Mischung tröpfchenweise mit 500 μl 2x HBS vermischt und vorsichtig auf die Zellen gegeben. Zur Inhibition von lysosomalen DNAsen wurde das Medium zusätzlich mit Chloroquin versetzt. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 10 ml neues Medium zugegeben. Einen Tag später wurde das Virus enthaltende Medium gesammelt und bei 4°C auf Eis gelagert. Danach wurde die Virusernte für 6 Stunden und über Nacht wiederholt. Die gesammelten Virusüberstände wurden vereinigt, filtriert (0,45 μm -Filter) und anschließend entweder direkt zur Infektion der Zielzellen verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert.

Induktion der Pluripotenz in den MEFs

Für die Generierung der induzierten pluripotenten Stammzellen wurden die Oct4-GFP MEFs sowie die Cf1 MEFs in den Passagen 1-4 verwendet. Es wurden 8×10^5 Zellen auf eine 10 cm Schale plattiert und 24 Stunden später mit den Virusüberständen der Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc infiziert⁶¹. Hierfür wurden die viralen Überstände im gleichem Verhältnis vermischt, mit Polybren (1:500) versetzt und in zwei aufeinanderfolgenden Infektionsrunden auf die Zielzellen gegeben. Anschließend wurden die infizierten Fibroblasten 4 Tage in MEF-Medium kultiviert und danach mit einer Dichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen auf INAKs ausplattiert. Nach etwa 20 Tagen konnten diverse induzierte pluripotente Stammzellenkolonien (iPS Zellen) anhand der Morphologie und/oder GFP Expression (FACS) selektioniert werden. Diese Klone wurden auf 12 Well Platten mit INAKs überführt. Durch mehrmaliges Teilen dieser Klone konnten diverse stabile iPS Zelllinien etabliert werden. Die verschiedenen iPS Zelllinien sowie die zum

Vergleichen herangezogene Maus embryonale Stammzelllinie wurden auf Gelatine (0,1% Gelatine in PBS) beschichteten Zellkulturplatten in mESC-Medium kultiviert.

Für die Analyse der potentiellen Phosphorylierungsstelle wurde für die Virusproduktion das murine Oct4 gegen das humane Oct4 (Wildtyp oder die entsprechenden Mutanten) ausgetauscht. Um eine quantitative Aussage über Unterschiede bei der IPS Induktion treffen zu können, mussten gleiche Mengen der Viren verwendet werden. Die Bestimmung des Virustiters war daher entscheidend für die Experimente und erfolgte mit dem QuickTiter Retrovirus Quantitation Kit.

6.2.1.3 Zellkultur der humanen embryonalen Stammzellen

Humane embryonale Stammzellen benötigen zum Wachstum entweder einen Monolayer von INAKs (*Feederlayer-Cells*) oder eine mit Matrigel beschichtete Zellkulturschale. Matrigel ist eine Mischung von extrazellulären Matrixproteinen die aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkomzellen isoliert wurden. Die Hauptbestandteile sind Laminin, Collagen IV, Entactin und Heparansulfat-Proteoglykan. Bei Raumtemperatur polymerisiert Matrigel und bildet biologisch aktives Matrixmaterial, ähnlich der zellulären Basalmembranmatrix von Säugetieren. Bei der sogenannten Feeder-Zellen unabhängigen Kultivierungsmethode wird zusätzlich zum Matrigel noch konditioniertes hESC-Medium (CM) benötigt.

Nach dem Auftauen der Stammzellen wurden diese auf eine mit Matrigel und INAKs beschichtete Zellkulturschale ausplattiert und aller drei Tage geteilt. Im späteren Verlauf der routinemäßigen Zellkultur wurde auf die Feeder-Zellen unabhängige Kultivierungsmethode in CM gewechselt. Dafür wurde das für 24 h von den Feeder-Zellen konditionierte Medium gesammelt, mit frischem Fgf2 (4 ng/ml) ergänzt, filtriert (0,2 µm-Filter) und auf die hESCs gegeben. Die spontane Differenzierung der Zellen wurde durch den Wechsel der Zellkulturbedingungen von konditioniertem hESC-Medium (CM) in nicht konditioniertes hESC-Medium (nCM) eingeleitet.

Für die Transfektion der hESCs wurden Matrigel beschichteten 6-Well Zellkultur und Lipofectamine 2000 verwendet. Es wurden pro Well 1,5 µg der jeweiligen DNA und 7 µl Lipofectamine 2000, den Angaben des Herstellers entsprechend, vermischt, auf die Zellen gegeben und für 6 h in nCM inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und unter den gewünschten Zellkulturbedingungen weiter kultiviert.

Metabolische Markierung der hESCs

Bei SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*) handelt es sich um eine *in vivo* Markierungsmethode von Zellen mit einer nachfolgenden Analyse der Zelllysate im Massenspektrometer. Das Prinzip dieser Technik beruht dabei auf dem metabolischen Einbau von „schweren“ Aminosäuren in das Proteom der Zelle. Bei diesen speziellen Aminosäuren wurde das natürlich vorkommende Isotop durch ein „schweres“ nicht-radioaktives Isotop ausgetauscht (z.B L-Lysin $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$; L-Arginin $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$). Auf diese Weise können Proteine unter verschiedenen Zellkulturbedingungen markiert und massenspektrometrisch analysiert werden. Der Einbau der schweren Isotope führt zu einem erhöhten Molekulargewicht der Proteine und zu einer damit verbundene Verschiebung des messbaren Signales im Massenspektrometer.

Für das SILAC Experiment wurde spezielles DMEM/F12 Medium ohne Arginin und Lysin verwendet. Dieses Medium wurde mit schweren Isotopen L-Arginin (Arg10) und L-Lysin (Lys8) supplementiert und für die Herstellung von „schweren“ konditionierten Medium (CM-H) verwendet. Die hESC Zelllinie H9 p50-100 wurde, wie bereits beschrieben, auf Matrigel beschichteten Zellkulturplatten (BD Falcon 100 mm Zellkulturplatten) unter Feeder-Zell freien Konditionen kultiviert. Für eine vollständige Markierung mit den „schweren“ Isotopen wurden die Zellen für 3-5 Passagen in CM-H gehalten. Parallel dazu wurde eine weitere Charge der Zellen mit „normalem“ CM behandelt, in welchem sich Aminosäuren mit natürlichen Isotopen befanden. Eine dieser beiden Zellpopulationen wurde anschließend für drei Tage, unter differenzierenden (hESC-Medium, nCM oder SILAC-Medium, nCM-L) und die andere unter undifferenzierenden (konditioniertes hESC-Medium, CM oder konditioniertes SILAC-Medium, CM-H) Bedingungen kultiviert.

6.2.2 Molekularbiologische Methoden

Die folgenden Standardmethoden Plasmidpräparation, Klonierungsmethoden, Agarose-Gelelektrophorese in TBE, Dephosphorylierung linearisierter DNA, Phenol-Chloroform-Extraktion zur DNA-Aufreinigung, Transformation von Bakterien usw. wurden nach Sambrook et. al. und Ausubel *et al.* oder nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma Invitex in Berlin durchgeführt.

6.2.2.1 Klonierungen

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung der pFLAG-hOct4 und pGEX-6P-hOct4 Expressionsplasmide wurde der pExpress-hOct4 Vektor der Firma Imagenes verwendet.

Die Amplifikation des entsprechenden DNA-Fragmentes erfolgte mit dem Accuprime Pfx Kit nach den Angaben des Herstellers. Die verwendeten Primer sind unter 2.1.10.2 aufgelistet.

Das PCR Produkt wurde in den TOPO TA Vektor subkloniert und anschließend mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NotI/EcoRI* (pFLAG-CMV-2) oder *BamHI/EcoRI* (pGEX-6P-1) in die entsprechenden Plasmide überführt.

Klonierung des retroviralen Expressionsvektor pMXS-MCS

Oligo-Anlagerungspuffer:	50 mM Hepes-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl
--------------------------	-------------------------------------

Der retrovirale pMXS-MCS Vektor wurde durch die Einführung einer artifiziellen *multiple cloning site* (MCS) in den *BamHI/NotI* linearisierten pMXS-mSox2 Vektor erzeugt.

Je 2,5 µl der beiden MCS Oligonukleotide wurden mit 45 µl Oligo-Anlagerungspuffer versetzt und in einer PCR-Maschine für 4 min bei 94°C denaturiert. Danach wurden die angelagerten Oligonukleotide bei Raumtemperatur heruntergekühlt. Die Ligation erfolgte in einem Ansatz von 20 µl (ü.N. bei 16°C), wobei 50 ng des linearisierten Vektors und 2 µl der Oligonukleotide verwendet wurden.

Punktmutagenese des hOct4

Für die Generierung der hOct4-Mutationsprimer (siehe 2.1.10.2) wurde das QuikChange® Primer Design Programm der Firma Agilent Technologies verwendet. Als Ausgangspunkt für die jeweiligen Oct4-Mutanten wurde der pExpress-hOct4 Vektor verwendet. Die einzelnen Mutanten wurden mit Hilfe des Platinum *Pfx* DNA Polymerase Kits hergestellt und durch die Restriktionsenzyme *NotI/EcoRI* in den retroviralen pMXS-MCS Vektor überführt. Durch punktuelle Modifikationen des Platinum *Pfx* Standardprotokolls konnte die Effizienz der Mutagenese gesteigert werden. Die vorgenommenen Veränderungen wurden nachfolgend aufgeführt.

PCR Ansatz

50 mM dNTP Mix
20 µM Primer
1x Enhancer
200 ng Plasmid DNA
0,5 µl *Pfx* Polymerase

PCR Programm

erste Denaturierung 2 min bei 95°C
weitere Denaturierung 30 sek. bei 95°C
Anlagerung 1 min bei 59°C
Elongation 1.5 min pro kb Plasmid bei 68°C
18 Zyklen

6.2.2.2 Synthese der cDNA für die Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR)

RNA Präparation

Für die RNA Präparation wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen entsprechend ihrer Dichte in 500 µl oder 1 ml Trizol gelöst. Die weitere Aufreinigung der RNA wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Um etwaige Verunreinigungen der RNA durch genomische DNA auszuschließen, wurde das Pellet in 10 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und anschließend mit DNase I behandelt.

Für den DNase Verdau wurde der folgende Ansatz gewählt:

- 2,5 µl 10X DNase Puffer (Invitrogen)
- 1,25 µl DTT (20 mM, Serva)
- 0,5 µl RNase-Out (40 U/µl, Invitrogen)
- 0,4 µl DNase I (1 U/µl, Invitrogen)
- 10,4 µl Nuklease-freies Wasser (Gibco)
- 10 µl RNA

35 µl Gesamt

Der Verdau der DNA erfolgte für 1,5 Stunden und wurde nach Zugabe von 0,5 µl DNase I für eine weitere Stunde fortgesetzt. Anschließend wurde Ansatz auf 100 µl aufgefüllt und mit 100 µl Phenol/ Chloroform (20 : 1) versetzt, gemischt und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (~90 µl) wurde separiert und die RNA durch Zugabe von 50 µl Ammoniumacetat (NH₄CH₃COO; 7,5 M) und 400 µl Ethanol (100%) für 5 min bei RT gefällt. Anschließend wurde die RNA durch eine zehninütige Zentrifugation (bei 4°C und 14000 rpm) pelletiert. Danach wurde die RNA mit Ethanol (75%) gewaschen, getrocknet und dann in 22 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert.

cDNA Synthese

Die Herstellung der cDNA erfolgte mit der M-MLV Reversen-Transkriptase von Promega und wurde mit 2-5 µg RNA nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Für die cDNA Synthese wurden Random Hexamer Primer (3 µg/µl) von Invitrogen genutzt.

Für die anschließende qRT-PCR wurden 0,5 µl der cDNA in 4,5 µl ddH₂O verdünnt und eingesetzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden danach zumeist über ein 2% Agarosegel aufgetrennt.

Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR)

Die verwendeten RT-PCR Primer wurden mit der PrimerQuest Software der Firma Integrated DNA Technologies kreiert.

Die Analysen wurden mit dem „Absolute QPCR SYBR® Green Mix“ und, wie im folgendem beschrieben, leicht modifizierten Angaben des Herstellers angefertigt.

5 µl Matrizen-DNA (0,5 µl ChIP-DNA oder cDNA in 4,5 µl ddH ₂ O)
10 µl SybrGreen 2x Mix
5 µl Primer-Mix (sense und antisense, 10 µM; 1:10 verdünnt)
mit ddH ₂ O auf 20 µl auffüllen

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

95°C	15 min		40-50 Zyklen
94°C	20 sec		
58°C	45 sec		
72°C	45 sec		

Für quantitative RT-PCRs (qRT-PCRs) wurde folgende Formel zur Berechnung der x-fachen Induktion (fold induction) im Vergleich zur Kontrolle berechnet. Zur Normalisierung wurden die Haushaltsgene *U2*, *Gapdh*, β -Aktin als Referenz verwendet:

$$CT^{\text{Gen}} - CT^{\text{Haushaltsgen}} = \Delta CT$$

$$\Delta CT^{\text{Probe}} - \Delta CT^{\text{Kontrolle}} = \Delta\Delta CT$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Bei den qChIPs wurde das Ergebnis als Prozent des Inputs (es wurden immer 1% Input als Referenz verwendet) mit Hilfe der CT-Werte durch folgende Formel berechnet:

$$\% \text{ des Inputs} = 2^{CT(1\% \text{ Input}) - CT(IP)} \times 1\%$$

6.2.3 Biochemische Methoden

6.2.3.1 Extraktion nukleärer Proteine

Puffer A	10 mM Hepes (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA
Puffer B	20 mM Hepes (pH 7,9), 256 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA 10% NP40
Frisch zugeben	Phosphatase Inhibitor Cocktail II, Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail

Für die Experimente wurden jeweils zwei konfluente 10 cm Zellkulturschalen verwendet. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden gewaschen und danach in 10 ml eiskaltem PBS von den Platten gekratzt. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 900 rpm pelletiert, in 1 ml PBS gelöst und anschließend für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett entfernt und das Pellet in einem Verhältnis von 1 Vol Pellet/2 Vol Puffer A aufgenommen und für 15 min inkubiert. Diese Lösung wurde in einem Verhältnis von 1:24 mit 10% NP40 versetzt für 10 sek. gevortext und 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt danach die zytoplasmatische Proteinfraction. Das Pellet wurde anschließend mit PBS gewaschen, in 30 µl eiskaltem Puffer C aufgenommen und 15 min bei 4°C geschüttelt. Nach einer abschließenden Zentrifugation für 5 min bei 3000 rpm wurde der Überstand mit den nukleären Proteinen abgenommen und bei – 80°C gelagert.

6.2.3.2 Dephosphorylierung von Proteinen mit Alkalischer Phosphatase

Für die Dephosphorylierung von hOct4 wurde *Calf-Intestine-Phosphatase* (CIP) verwendet und gemäß der Angabe des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden 30 µg Proteinlysate mit 1 x NEB Puffer 4 (1 µg Protein/ 10 µl Puffer) und 3 µl CIP (30 units) für 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die dephosphorylierte Proteinlösung über die Ultrafree-0.5 Biomax Zentrifugenfiltereinheit angereichert. Als Kontrolle wurden enzymfreie analog behandelte Proteinproben verwendet.

6.2.3.3 Immunopräzipitation

Co-Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation (IP) des hOct4 wurden Dynabeads® Protein G verwendet. Vor der IP wurden die Dynabeads® (30 µl / IP) für 1 h mit Blockierungspuffer (1,5% BSA in HNTG-Puffer) behandelt. Für eine Reduktion der unspezifischen Bindungen wurden 30 µl der geblockten Dynabeads® mit 1 mg Proteinlysate inkubiert (1 h bei 4°C auf dem Drehrad). Danach wurden die Proteinlysate mit dem Oct4 Antikörper (N-19, pro IP / 2

µg) versetzt und am nächsten Tag mit 30 µl der geblockten Dynabeads® vermischt und für weitere 2 h inkubiert. Anschließend wurde unspezifisch gebundene Proteine durch vier sich abwechselnde Waschschriffe mit HNTG Puffer entfernt und die immunpräzipitierte Proteine/Beads Mischung in 30 µl 2x Lämmli resuspendiert. Vor der anschließenden SDS – Gelelektrophorese wurden die Proben für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Der Nachweis der präzipitierten und Co-präzipitierten Proteine erfolgte durch den Oct4- (H-134) und den Sox2 Antikörper.

Immunopräzipitation für die SILAC Analyse

Saurer Waschpuffer sW	1 mM HCl
Waschpuffer W1	PBS, 5 mM MgCl ₂
Quenching Puffer Q	0,2 M Ethanolamin pH 8,0, 5 mM MgCl ₂
Waschpuffer Beads WB1	50 mM Hepes pH 7,9, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA 1% Triton X-100, 0,1% Na-deoxycholat, 0,1% SDS Proteaseinhibitorcocktail (1:1000 (v/v), 0,25 mM PMSF
Waschpuffer Beads WB2	20 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0,5% IGEPAL CA-630, 0,5% Na-deoxycholat Proteaseinhibitorcocktail (1:1000 (v/v), 0,25 mM PMSF
Waschpuffer pulldown WPD	50 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1% SDS, 50 mM NaHCO ₃
Waschpuffer pre Elution WPE	5 mg/ml BSA in PBS pH 8,0

Bei den SILAC Experimenten wurden für die Immunopräzipitation spezielle Sepharose Beads verwendet. Diese NHS-aktivierte Sepharose 4 *Fast Flow* ist eine voraktivierte Agarosematrix die über Succinimidestern und primäre Aminogruppen von Peptiden und Proteinen eine stabile Amidbindung ausbildet. Somit können Antikörper äußerst stabil an die Matrix gebunden werden um so Störungen nachfolgender massenspektrometrischer Analysen möglichst gering zu halten.

Ein zusammenhängendes Experiment bestand aus Proben (4 konfluente 10 cm Zellkulturschalen) die unter undifferenzierenden Bedingungen in CM-H und unter differenzierenden Bedingungen in nCM-L kultiviert und so markiert wurden (siehe 2.1.15.3). Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die Bedingungen in einem folgenden Experiment umgekehrt (CM-L, nCM-H). Die Proben wurden in 500 µl HNTG aufgenommen und ein Aliquot des Lysats als Input-Kontrolle der Effizienz der IP aufbewahrt.

Pro IP wurden 30 µl der NHS-Sepharose verwendet, zentrifugiert (1000 rpm, 2 min) und mit 10 x Volumen des sauren Waschpuffers (sW) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (1000 rpm, 2 min, 4°C) wurde zweimal mit 5 x Volumen des W1 gewaschen. Der pH Wert der Lösung sollte im Anschluss bei 7 – 7,5 liegen oder wurde gegebenenfalls mit W1 auf diesen Wert eingestellt. Die NHS-Sepharose (30 µl) wurde danach mit 3 µg des Antikörpers (Oct 4, N-19 oder IgG, Kontrolle) vermischt, mit W1 auf 100 µl aufgefüllt und für 2 h bei RT inkubiert. Um unspezifische Bindungen der

Proteinlysate an freie noch unbesetzte NHS-Ester zu verhindern wurden diese mit 500 µl Puffer Q abgesättigt (30 min bei RT). Danach folgten drei sich abwechselnde Waschschrte mit 800 µl der Waschpuffer WB1 und WB2 und zwei weiteren Waschgängen mit W1. Gleiche Mengen des Proteinlysats wurden danach mit den Sepharose-Antikörper Mischungen (Oct4, IgG) ü.N. bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand zur Kontrolle der IP abgenommen (sample out). Um experimentell bedingte Abweichungen in der massenspektrometrischen Analyse zu vermeiden wurde die NHS-Sepharose der zusammengehörenden Experimente vereinigt (z.B. CM-H, nCM-L der Oct4 IP und CM-H, nCM-L der IgG IP) und 4 mal gewaschen (3 x 800 µl WPD, 1 x WPE). Die NHS-Sepharose wurden danach in 60 µl 2x Lämmli resuspendiert, für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend über NuPAGE® 4-12% Gradientengele aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie gefärbt und sichtbare Proteinbanden extrahiert. Die folgende Nachbearbeitung der Proben und die massenspektrometrische Analyse wurden in Kooperation mit der AG Selbach durchgeführt²⁰⁹.

6.2.3.4 GST- Aufreinigung von rekombinanten Proteinen für den anschließenden *in vitro* Kinase Assay

Bakterienstamm	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
GSH-Elutionspuffer	50 mM Tris (pH 8), 120 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, Frisch zugeben: 0,5 mM DTT und 30 mM Glutathion
GST-Sonifizierungspuffer	50 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 5 mM EDTA pH 8,0 Proteaseinhibitorcocktail 1:1000 (v/v)
LB-Medium	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (LB ^{Amp})

Für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurde eine Bakterienkolonie oder Stücke eines Glycerolstocks mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 10-20 ml LB^{Amp} ü.N. bei 37°C in einem Wärmeschüttler kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Kultur 1:20 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 wachsen gelassen. Für spätere SDS-PAGE Analysen wurde ein 1 ml Aliquot abgenommen und der Rest der Kultur mit 1 mM IPTG induziert. Anschließend wurden 200 ml der Bakterienkultur für 3 h bei 37°C oder ü.N. bei 18°C inkubiert. Zur Kontrolle einer erfolgreichen induzierten Proteinexpression wurde ein 1 ml Aliquot abgenommen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C oder wurden auf Eis durchgeführt. Die Bakterien wurden für 15 min bei 8000 x g pelletiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in GSH-Sonifizierungspuffer (1/40 des Ausgangsvolumens der Bakterienkultur) resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien sechsmal für 15 sec sonifiziert (Stabsonifizierer bei 50 W, Branson 450 Sonifier). Zwischen den einzelnen Sonifizierungsschritte wurde die

Suspension für 1 min auf Eis gekühlt. Den aufgeschlossenen Bakterien wurde 1% Triton X-100 beigemischt und für 30 min auf dem Drehrad (4°C) inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 30 min bei 16000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein Falconröhrchen überführt.

Die für die Elution nötige GSH-Sepharose wurde in einem Verhältnis von 1/1 in PBS äquilibriert und 500 µl dieser PBS/Sepharose Mischung wurden danach zu dem Bakterienlysat gegeben. Anschließend diese Sepharose/Lysat Lösung für 30 min auf dem Drehrad bei RT inkubiert. Danach wurde die Sepharose für 2 min bei 2000 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Es wurde PBS hinzugegeben (10-faches Volumen der Sepharose) kurz invertiert und wie zuvor zentrifugiert. Insgesamt wurde die Sepharose auf diese Art und Weise viermal mit PBS gewaschen. Zur Elution der Proteine wurde die Sepharose in GSH-Elutionspuffer (1 Vol Puffer/1 Vol Sepharose) resuspendiert und für 15 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurde die Sepharose für 2 min bei 2000 x g pelletiert und der Überstand in ein Eppendorfgefäß überführt. Dieser Elutionsschritt wurde insgesamt viermal wiederholt. Um ausreichend hohe Proteinkonzentrationen (5µg/µl) für den Kinase Assays zu haben, wurden die Eluate mittels der Ultrafree-0.5 Biomax Zentrifugationsröhrchen angereichert.

***In vitro* Kinase Assay**

PKAcα (50 ng/Assay)	ERK2 (40 ng/Assay) Gsk3 (100 ng/Assay)	AKT1 (100 ng/Assay)
10 mM ATP Stock Lösung Kinase Verdünnungspuffer VII Kinase Assay Puffer I [γ- ³² P]dATP (10mCi/ml)	10 mM ATP Stock Lösung Kinase Verdünnungspuffer III Kinase Assay Puffer I [γ- ³² P]dATP (10mCi/ml)	10 mM ATP Stock Lösung Kinase Verdünnungspuffer V Kinase Assay Puffer I [γ- ³² P]dATP (10mCi/ml)

Mithilfe des *in vitro* Kinase Assays kann die Aktivität von Kinasen oder deren Spezifität zu einem Substrat bestimmt werden. Für die Phosphorylierungsstudien einzelner Oct4 Domänen und des gesamten hOct4 Proteins wurden die Protein Kinase A (PKA), die extrazellulär regulierte Kinase (ERK2), die Glykogensynthase-Kinase 3 (Gsk3) und die Proteinkinase B (AKT1) verwendet. Die Kinasen und Puffer wurden entsprechend der Angaben des Herstellers vermischt und mit den hOct4 Konstrukten für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach der anschließenden Auftrennung der Proben durch die SDS Gelelektrophorese wurde das Gel bei Unterdruck und 80 °C für 30 min auf Whatmanpapier transferiert. Die Dokumentation der Phosphorylierungsstudien erfolgte über die Intensitätsmessung der Radioaktivität mit dem Fuji Phosphoimager (FLA7000).

6.2.3.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Zweidimensionale Gelelektrophorese

HNTG-Puffer	50 mM Hepes (pH 7,4), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA (pH 8,0)
	1% Triton X-100, 10% Glycerol, 1x Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail / 10 ml, Phosphatase Inhibitor Cocktail I-II
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% NP40,
	0,25% Na-deoxycholate, 1 mM PMSF, 1x Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail / 10 ml
4x Laemmlipuffer	200 mM Tris-HCl (pH 6,8), 40% Glycerol, 16% SDS, 20% β -Mercaptoethanol, 0,22% Bromphenolblau
1 x MES Laufpuffer	50 mM MES, 50 mM Tris Base, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7,3

Die Präparation der Gesamtproteine erfolgte für die 1D Gelelektrophorese in HNTG-Puffer und für die 2D Gelelektrophorese in RIPA-Puffer.

Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in dem Lysepuffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und für weitere 10 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vom Pellet getrennt und bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte nach Bradford.

Anschließend wurden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen über die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dafür wurde die Proteinlösung in 1 x Laemmlipuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C inkubiert. In der Regel wurden pro Spur 25 μ g Protein auf vorgegossene NuPAGE® 4-12% Gradientengele aufgetragen und zusammen mit einem entsprechenden Größenmarker aufgetrennt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel entweder mit Imperial Protein Stain angefärbt oder auf eine PVDF Membran transferiert.

Zweidimensionale Gelelektrophorese

25 ml 1 x Rehydrierungspuffer	12 g Urea, 0,5 g CHAPS, 125 μ l Trägerampholyte pH 4-7 0,5 ml Bromphenolblau (0,1%) vor Verwendung DTT zu einer Endkonzentration von 20 mM zugeben
0,5% Agarose	0,5 g Agarose in 100 ml 1 x MES Laufpuffer

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DG) ermöglicht durch die Kombination der isoelektrischen Fokosierung (Trennung in der ersten Dimension) und der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Trennung nach den molekularen Massen in der zweiten Dimension) nahezu das gesamte Proteom einer Zelle auf einem Gel sichtbar zu machen²¹⁰. Der größte Nachteil dieser Technik, ist die starke Variation der Proteinbanden innerhalb verschiedener Gele. Aus diesem Grund wurden vorgefertigte Gele der Firma Invitrogen verwendet. Diese garantieren durch ihren neutralen pH Wert während der

Elektrophorese eine verbesserte Stabilität der Proteine und ermöglicht somit eine bessere Reproduzierbarkeit Auflösung.

Isoelektrische Fokussierung (IEF, 1. Dimension)

Jedes Protein besitzt eine Nettoeigenladung, die durch die Summe der negativen und positiven Ladungen der Aminosäureseitengruppen sowie durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierung und Acetylierung definiert wird. Die kovalente Modifikation von Proteinen durch eine Phosphatgruppe zum Beispiel bedingt eine Verschiebung des Molekulargewichts um 80-Da was eine Auftrennung von phosphorylierten und unphosphorylierten Proteinen mit der herkömmlichen SDS-PAGE unmöglich macht ²¹¹. Durch die Phosphatgruppe verändert sich jedoch der isoelektrische Punkt des Proteins was durch eine isoelektrische Fokussierung nachgewiesen werden kann. Bei der isoelektrischen Fokussierung wandert ein Protein in einem elektrischen Feld bis zu dem pH-Wert im Gel an dem seine Nettoladung null ist (pI, isoelektrischer Punkt). Wenn die Anzahl der negativen Seitengruppen die der positiven Seitengruppen übersteigt ist der entsprechende pI Wert des Proteins im niedrigen pH Bereich. In diesem Fall spricht man von einem Aziden Protein. Wenn die positiven Seitengruppen überwiegen spricht man entsprechend von basischen Proteinen. Die Trennung von Proteingemischen in einem elektrischen Feld wird also durch die einzelnen isoelektrischen Punkte der enthaltenen Proteine bestimmt.

Zunächst wurden 30 - 40 µg der in RIPA Puffer aufgenommenen Proteinproben mit 145 µl Rehydrierungspuffer vermischt auf die ZOOM® Strips pH4-7 gegeben und ü. N. bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine den Angaben des Herstellers entsprechende sechsstündige isoelektrische Fokussierung in der ZOOM® IPGRunner Kassette.

Trennung nach dem Molekulargewicht (2. Dimension)

Nach der IEF wurden die Streifen für 15 min bei RT in 1 x NuPAGE® LDS Puffer äquilibriert und in ein NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris ZOOM® IPG Gel überführt. Durch die Zugabe von 0.5% Agarose wurden die Streifen im Gel fixiert. Die Elektrophorese und der anschließende Proteintransfer auf eine PVDF Membran wurden wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt.

Nachweis von Proteinen durch Coomassiefärbung

Die Färbung der Polyacrylamidgele erfolgte nach dem Standardprotokoll der Firma Pierce. Das gefärbte Gel wurde anschließend auf Whatmanpapier gelegt und mit dem Gelrockner (Slab-Geldryer, GIBCO) fixiert.

6.2.3.6 Transfer von Proteinen (Western Blot)

Transferpuffer	35 mM Tris, 40 mM Glycin, 0,04% SDS, 20% Methanol NuPAGE® Transfer Buffer
Waschpuffer	PBS-T
Blockierungspuffer	PBS-T, 2,5% Trockenmilchpulver

Eine PVDF-Membran wurde für eine Minute in Methanol inkubiert und wurde anschließend 2 min im Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau des Semi-Dry Western Blots erfolgte entsprechend der Angaben von Biorad. Der Transfer erfolgt bei einer Stromstärke von 100 mA pro Gel für 1h. Für die 2 D Gele wurde das Nass-Blot System von Invitrogen verwendet und entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Membran für eine halbe Stunde in Blockierungspuffer geblockt und später mit dem Primärantikörper (1:1000 in Blockierungspuffer) ü. N. bei 4°C oder 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit Waschpuffer für 5 min auf dem Schüttler gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper für 1 h (1:5000 in Blockierungspuffer). Nach erneutem dreimaligem Waschen (5 min) wurde die Membran mit dem ECL-Kit behandelt, und anschließend mittels des Dokumentationssystems INFINITY-3000 und zugehöriger INFINITY-Capt Software (Vilber Lourmat, Eberhardzell) analysiert.

6.2.3.7 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Fixierungslösung	1% Formaldehyd in PBS
Hyptoner Lysepuffer	10 mM HEPES-KOH pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ 0,1% IGEPAL CA-630, 1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, Proteaseinhibitorcocktail (1:1000 (v/v))
ChIP-Sonifizierungspuffer	50 mM HEPES pH 7,9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA 1% Triton X-100, 0,1% Na-deoxycholat, Proteaseinhibitorcocktail (1:1000 (v/v)), 0,25 mM PMSF
ChIP-Waschpuffer A	50 mM HEPES pH 7,9, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA 1% Triton X-100, 0,1% Na-deoxycholat, 0,1% SDS Proteaseinhibitorcocktail (1:1000 (v/v)), 0,25 mM PMSF
ChIP-Waschpuffer B	20 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0,5% IGEPAL CA-630, 0,5% Na-deoxycholat Proteaseinhibitorcocktail (1:1000 (v/v)), 0,25 mM PMSF
ChIP-Elutionspuffer	50 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1% SDS, 50 mM NaHCO ₃
ChIP-Blockierungslösung	5 mg/ml BSA in PBS pH 8,0

Fixierung der Zellen und Isolation des Chromatins

Für die ChIP Experimente wurden Zellen von 4 bis 8 Zellkulturschalen (10 cm) verwendet (~ 5x10⁶-1x10⁷ Zellen pro Immunpräzipitation).

Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml Fixierungslösung für 10 min unter leichtem Schütteln inkubiert (RT). Die Fixierung wurde durch die Zugabe

von je 1 ml Glycin (1,25 M) abgestoppt und für weitere 5 min inkubiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders beschrieben, auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und in 2 ml PBS abgekratzt. Durch zehninütige Zentrifugation bei 1000 x g wurden die Zellen pelletiert und in hypotonem Lysepuffer (ca. 5 x Vol des Zellvolumens) resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch zwanzig Stöße im Dounce-Homogenisierer aufgeschlossen. Durch eine Zentrifugation für 5 min bei 800 x g wurden die Zellkerne pelletiert und der Überstand (Zytoplasma) verworfen. Die Zellkerne wurden in 1 ml Sonifizierungspuffer resuspendiert und in 15 ml Falconröhrchen sonifiziert. Die Stärke und Dauer der Sonifizierungszyklen musste an den Zelltyp angepasst werden, so dass DNA-Fragmente der Größe von 200-1000 bp entstanden (20 Zyklen, 10 sek. sonifizieren und 30 sek. Pause, Branson 450 Sonifier, Stufe 5). Nach der Sonifizierung wurde das Chromatin für 60 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (lösliches Chromatin) wurde in ein Eppendorfgefäß überführt.

Kopplung des Antikörpers an die Dynabeads Protein G

Es wurden 20 µl Dynabeads mit 2-4 µg Antikörper in einem Volumen von 500 µl ChIP-Blockierungslösung ü.N. bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Dynabeads gewaschen und in 1/10 des Chromatinvolumens in Blockierungslösung resuspendiert und zum Chromatin hinzugegeben.

Immunpräzipitation

Pro IP wurden 0,5 ml Chromatin verwendet und ü. N. mit den entsprechenden Dynabeads/Antikörper Mischungen auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Dynabeads wie unten beschrieben, gewaschen:

2x 1 ml ChIP-Sonifizierungspuffer

2x 1 ml ChIP-Waschpuffer A

2x 1 ml ChIP-Waschpuffer B

Nach jedem Waschschrift wurden die Dynabeads mittels eines Magneten sedimentiert, der Puffer abgenommen und neuer Puffer hinzugegeben. Jeder Waschschrift beinhaltete eine dreiminütige Inkubation auf dem Drehrad.

Elution und Aufreinigung der DNA

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Protein/DNA-Komplexe durch zwei aufeinanderfolgende fünfzehnminütige Inkubationen bei 65°C und unter starkem Schütteln mit je 200 µl ChIP-Elutionspuffer eluiert. Um die Kreuzvernetzung der DNA und der Proteine aufzuheben wurde anschließend das Eluat mit 16,8 µl 5 M NaCl vermischt und ü.N. bei 65°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 µl RNase A hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der nachfolgenden Zugabe von je 4 µl EDTA und 2 µl Proteinase K wurde für weitere 2 h bei 42°C inkubiert. Die DNA wurde durch eine anschließende Phenol-Chloroform Extraktion und durch eine Ethanol-fällung in Anwesenheit von 30 µg GlykoBlue™ präzipitiert. Das resultierende Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen und anschließend das Pellet luftgetrocknet und in 50 µl 10 mM Tris pH 7,4 aufgenommen. Für eine PCR wurden anschließend 1-2 µl der eluierten DNA verwendet.

6.2.3.8 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

10 x Shift-Hybridisierungspuffer	0,5 M Tris HCl (pH 8,0), 0,7 M NaCl
----------------------------------	-------------------------------------

Für die Hybridisierung der DNA wurden jeweils 10 µg der sense- und antisense Oligomere mit 5 µl des 10 x Shift-Hybridisierungspuffers vermischt und auf 50 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Die Anlagerung der Oligomere erfolgte danach bei 95°C für 20 min und anschließender Abkühlung über Nacht auf Raumtemperatur. Die radioaktive Markierung erfolgte über die AGCT Überhänge an den 5'-Ende der Oligomere, welche durch das Klenow-Enzyms mit dNTPs aufgefüllt wurden. Das dCTP wurde bei dieser Reaktion durch [α -³²P]dCTP ersetzt. Der Reaktionsansatz sah dabei wie folgt aus:

Shift Oligomer	1,25 µl
10x Klenowpuffer	2,5 µl
[α - ³² P]dCTP	4 µl
dNTPs (ohne CTP)	1 mM
Klenow-Enzym	1 µl
H ₂ O	Ad 25 µl

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und überschüssiges [α -³²P]dCTP wurde durch Größenausschlusschromatographie mit Hilfe von *Quick Spin*-Säulen nach Angaben des Herstellers entfernt.

10x TBE	1 M Tris, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA-Na ₂ x2H ₂ O
2x Shiftpuffer	40 mM Hepes (pH 7,9), 120 mM KCl, 8% Ficoll, 10 mM DTT, 1 mg/ml BSA, 0,2 µg/ml poly[d(I-C)]
Gel	1x TBE, 5% Acrylamid-Bisacrylamid, 0,4 ml 10% APS, 40 µl TEMED, ad 60 ml H ₂ O

Für den EMSA wurden 5 µg der nukleären Proteinfraction zusammen mit 10 µl 2x Shiftpuffer und 20000 cpm des radioaktiv markierten Oligomers (auf 20 µl mit H₂O aufgefüllt) für 10 min bei RT inkubiert worden. Die Proben wurden anschließend durch Gelelektrophorese (1x TBE als Laufpuffer, 180-240 V) aufgetrennt und danach bei Unterdruck auf Whatmanpapier transferiert (80°C für 30 min). Die Analyse des EMSAs erfolgte über die Intensitätsmessung der Radioaktivität mit dem Fuji Phosphoimager (FLA7000).

6.2.4 Reporterstudien

2x BLA (firefly)	150 mM Hepes (pH 8,0), 8 mM MgSO ₄ , 40 mM DTT 200 µM EDTA, 1,06 mM ATP (frisch zugeben: 270 µM CoA, 200 µM Luciferin)
2x BLQRLA (renilla)	15 mM NaAc, 30 mM Na ₄ PPI, 20 mM CDTA, 800 mM Na ₂ SO ₄ (pH 5,0) (frisch zugeben: 50 µM APMBT, 2,2 µM Coelenterazin)
5x Lyse Puffer	

Für die Reporterstudien wurden die Zellen analog den Angaben des Herstellers entsprechend transfiziert. Die Plasmidmengen für die Transfektionsansätze sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

Zelllinie	Reporter (Luciferase)	Reporter (Renilla)
H9	3xOct/Sox-TK_Luc (1,5 µg)	TK-Renilla (200 ng)
	CRE-Luc (1,5 µg)	
HeLa	3xOct/Sox-TK_Luc (50 ng)	SV40-Renilla (3 ng)
	CRE-Luc 100 ng	

Die Zellen wurden 36 h nach der Transfektion und den entsprechenden Behandlungen in PBS gewaschen und anschließend in 100-200 µl 1x Lysepuffer aufgenommen. Nach einer kurzen Zentrifugation (12000rpm, 1 min) wurden 10-20 µl des Überstands für die Messung mit dem CENTRO XS3 LB 960 eingesetzt. Es wurden 50 µl der jeweiligen Puffer (BLA, BLQRLA) nacheinander zu den Zelllysaten geben und die Lichtemission gemessen. Für die Auswertung sind für jeden Ansatz die Verhältnisse von Firefly zu Renilla Messwerten kalkuliert und die Mittelwerte sowie Standardabweichungen der Duplikate berechnet worden. Die Werte wurden dann jeweils auf den Ansatz mit dem entsprechenden Kontrollvektor bezogen.

6.2.5 Zellfärbung und Zellsortierung

6.2.5.1 Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenz-Blocklösung	0,5% Blocking Reagent in PBS-X, 10% Pferdeserum
PBS-X	PBS, 0,1% TritonX-100

Für die Immunfluoreszenz wurden HeLa und H9 Zellen auf 12-well Platten ausgesät und mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert (Lipofectamine 2000). Die Zellen wurden zwei Tage später mit PBS gewaschen und dann mit 500 µl PFA für 5 min fixiert (RT). Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS-X gewaschen und permeabilisieren. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit Immunfluoreszenz-Blocklösung (RT). Im Anschluss wurden die in Blockierungspuffer verdünnten Antikörper (anti-Oct4, H-134, anti-Flag) auf die Zellen gegeben (ü.N. bei 4°C). Am nächsten Tag wurde die primären Antikörper durch zweimaliges waschen mit PBS-X entfernt (5 min bei RT). Die sekundären Antikörper (Cy2-, grün und Cy5-, blau gekoppelt) wurden in Blockierungspuffer verdünnt (1:200) und für 1h mit den Zellen inkubiert (bei RT lichtgeschützt). Die Färbung der Zellkerne und des Zytoskeletts erfolgte parallel durch DAPI (1:1000/Blocklösung) und Phalloidin (1:500/Blocklösung). Anschließend wurde 2x mit PBS-X gewaschen und die Zellen in Immumount (Thermo Scientific) durch ein Deckgläschen versiegelt. Die Aufnahmen der gefärbten Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Leica LAS AF 6000 Dekonvolution unter Verwendung der 10x und 40x Objektive angefertigt.

6.2.5.2 Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS) und Durchflusszytometrie

Zur quantitativen Analyse der induzierten Pluripotenz anhand der GFP Expression wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde gewaschen und anschließend in 500 µl eiskaltem PBS aufbewahrt. Vor der durchflusszytometrischen Verwendung der Proben wurden grobe Zellrückstände durch ein Falcon-Röhrchen Zellsieb entfernt. Zur FACS-Analyse wurden der FACSAria II (BD) mit der Software CellQuestPro verwendet und durchflusszytometrische Analysen wurden mit dem FACScalibur (BD) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FlowJo.

7 Ergebnisse

7.1 Stabile Oct4-Proteinexpression während der frühen Phase der spontanen Differenzierung

Humane embryonale Stammzellen (hESCs) besitzen *in vitro* eine nahezu unbegrenzte Proliferationsfähigkeit, ohne ihr einzigartiges Differenzierungspotential zu verlieren. Diese Zellen werden routinemäßig in einem von embryonalen Fibroblasten konditionierten Medium kultiviert, wodurch der pluripotente Zustand der Zellen erhalten bleibt. Der Wechsel der Zellkulturbedingungen von konditioniertem (CM) in nicht konditioniertes Medium (nCM) leitet die spontane Differenzierung der ESCs in Derivate der drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und Mesoderm) ein. Während des Differenzierungsprozesses kommt es in wenigen Tagen zu einem signifikanten Expressionsverlust der Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Oct4, Nanog und Sox2⁸.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden hESCs, durch den Entzug von CM, spontan differenziert. Auffällig dabei war, dass die Expression von Oct4 auf Protein und mRNA Ebene in den ersten drei Tagen relativ stabil war (**Abb. 3.1 A, B**). Erst acht Tage nach Beginn der Differenzierung konnte ein signifikanter Verlust des *Oct4*-Transkriptes festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die Expression von Oct4-Zielgenen wie *Nanog* und *Lefty-A* weitaus schneller herunter reguliert wurden (**Abb. 3.1 B**). Die Nanog-Proteinexpression z.B. war bereits einen Tag nach Beginn der Differenzierung merklich verringert (**Abb. 3.1 B**). Mithilfe von qRT-PCR Experimenten wurde anhand der steigenden Expression des Differenzierungsmarkers *Msx2* zusätzlich der fortschreitende Verlust der Pluripotenz (d.h. Differenzierung) der Zellen bestätigt. Dieses Markergen ist eine Schlüsselkomponente des BMP Signalweges in humanen embryonalen Stammzellen und ist mit der Differenzierung dieser Zellen in einen Trophoblasten-ähnlichen Zelltyp assoziiert^{212 213}. Parallel zu den zuvor beschriebenen molekularen Veränderungen deuteten ebenfalls verschiedene morphologische Veränderungen der Zellkolonien auf einen fortschreitenden Differenzierungsprozess hin (**Abb. 3.1 C**). In konditioniertem Medium (CM) wachsende undifferenzierte hESCs zeichneten sich durch ihre typische Morphologie aus. Sie wuchsen in dicht gepackten Kolonien aus einer Vielzahl von runden Zellen, welche ein auffällig hohes Kern-*Zytoplasma*-Verhältnis aufwiesen. Differenzierende Zellen hingegen erschienen deutlich abgeflacht, hatten ein niedrigeres Kern-*Zytoplasma*-Verhältnis und bildeten auffällig diffusere Kolonien (nCM 3d). Es zeigte sich, dass die Zellen im Verlaufe der Differenzierung von einem homogenen, kompakten Zellverbund (3d CM) in einen eher losen unorganisierten Zellverbund übergingen (1d, 3d, 5d nCM) (**Abb. 3.1 C**). Die Kolonien der undifferenzierten Zellen zeichneten sich durch

einen scharf abgegrenzten Randbereich aus, während sich dieser Bereich mit beginnender Differenzierung auflöste und einzelne Zellen vermehrt sichtbar wurden (**Abb. 3.1 C**, nCM 5d). Nach fünftägigem Wachstum in nicht konditioniertem Medium, kam es im Verlauf weiterer Differenzierungsprozesse zur Ausbildung von epithelartigen Zellstrukturen (**Abb. 3.1 C**, gelber Pfeil nCM 5d). Um ausschließen zu können, dass es sich bei den beschriebenen Beobachtungen um ein Zelllinien-abhängiges Phänomen handelte, wurden drei weitere humane embryonale Stammzelllinien analysiert (H1, BGN II, BGN I). Die Untersuchung beschränkte sich auf die bereits beschriebenen Pluripotenz- bzw. mit differenzierungsassoziierten Markergene *Oct4*, *Nanog*, *Nodal*, *Lefty-A* und *Msx2*. Es wurde deutlich, dass die verschiedenen Stammzelllinien untereinander praktisch ein identisches *Nanog*, *Nodal*, *Lefty-A*, *Msx2* und *Oct4*-Expressionprofil aufwiesen. Dieses Ergebnis zeigte, dass die *Oct4*-Expression, unabhängig von der verwendeten Zelllinie, in den ersten drei Tagen der spontanen Differenzierung stabil war. Gleichzeitig konnte anhand dieser qRT-PCR Analyse bestätigt werden, dass die *Oct4*-Zielgenen wie *Nanog* und *Lefty-A* schneller herunter reguliert wurden. Daher schienen die beschriebenen Unterschiede der bei der Expression von *Oct4*-Zielgenen teilweise unabhängig von der *Oct4*-Gesamtproteinmenge zu sein.

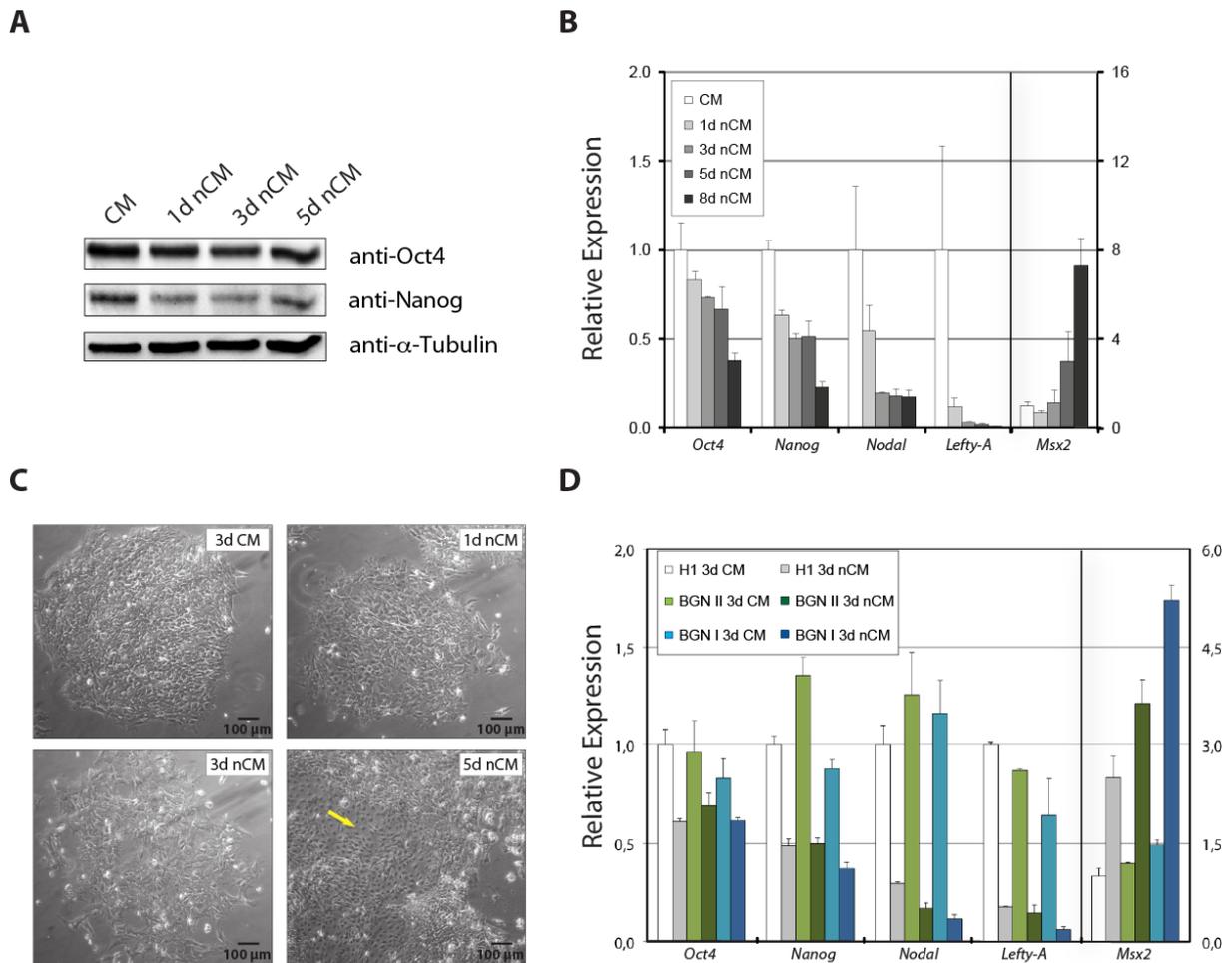


Abb. 3.1: Molekulare und zellmorphologische Veränderungen der hESCs während der spontanen Differenzierung

A) Proteinexpression von Oct4 und Nanog während der frühen Phase der Differenzierung. Tubulin diente als Ladekontrolle. **B)** Die humane embryonale Stammzelllinie H9 wurde über einen Zeitraum von 8 Tagen spontan differenziert. Danach wurde mithilfe der qRT-PCR die Expression von *Oct4* und verschiedenen *Oct4* Zielgenen analysiert. Zum Nachweis der beginnenden Differenzierung der Zellen wurde *Msx2* verwendet. **C)** Phasen-Kontrastaufnahmen zeigen die mit der Differenzierung der H9 Zellen einhergehenden morphologischen Veränderungen der Koloniestrukturen (gelber Pfeil, epithelartigen Zellstrukturen). **D)** Um Zelllinien abhängige Artefakte in der Genexpression (*Oct4*, *Nanog*, *Nodal*, *Lefty-A*, *Msx2*) auszuschließen, wurden mittels qRT-PCR drei weitere humane embryonale Stammzelllinien (H1, BGN II, BGN I) untersucht. CM-konditioniertes Medium; nCM-nicht konditioniertes Medium

7.2 Differenzierung führte zu Veränderung des Oct4-Phosphorylierungsprofils

Obwohl sich während der frühen Phase der spontanen Differenzierung (3d CM - 3d nCM) die Oct4-Expression in den hESCs kaum veränderte, kam es im selben Zeitraum zu den zuvor beschriebenen Unterschieden in der Zellmorphologie sowie der Gen- und Proteinexpression. Neben der Gesamtproteinmenge können verschiedene posttranslationale Modifikationen die Funktion eines Transkriptionsfaktors entscheidend beeinflussen. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die differenzierungsassoziierten morphologischen und molekularen Veränderungen der hESCs teilweise unabhängig von der Oct4-Gesamtproteinmenge waren und durch eine Änderung des Oct4-Phosphorylierungszustandes hervorgerufen wurden.

Derzeit sind keine kommerziell erwerblichen phosphorylierungsspezifischen Oct4 Antikörper verfügbar, daher wurde für den Nachweis der potentiellen Oct4-Phosphorylierung die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DG) verwendet. Mit dieser Methode ist es möglich, auch geringfügige Veränderungen der Protein-Phosphorylierung zu detektieren²¹¹. Die Änderung des Phosphorylierungszustandes führt zu einer Veränderung der Proteinladung, welche eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes des Proteins verursachen. Diese Verschiebung wird mithilfe der 2-DG detektiert.

Proben von undifferenzierten Stammzellen (CM 3d) und differenzierenden Stammzellen (nCM 1d, nCM 2d, nCM 3d) wurden über die 2-DG aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis von Oct4 erfolgte durch einen spezifischen Antikörper (anti-Oct4). In den Proben der undifferenzierten hESCs (CM 3d) konnten drei distinkte Signale detektiert werden (**Abb. 3.2 A**). Hierbei handelte es sich vermutlich um Oct4 in unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei dem mit 1 markierten Signal um unphosphoryliertes Oct4 und bei den mit 2 und 3 markierten Signalen um die hypophosphorylierte bzw. hyperphosphorylierte Form von Oct4 handelt (**Abb. 3.2 A**). In undifferenzierten hESCs schien Oct4 vermehrt als hypophosphorylierte oder unphosphorylierte Form vorzuliegen (**Abb. 3.2 A** Markierung 1 und 2). Ein signifikanter Anteil des Proteins war jedoch hyperphosphoryliert (Markierung 3). Im Verlauf des Differenzierungsprozesses kam es zu einer deutlichen Verringerung dieser hyperphosphorylierten Form. Des Weiteren konnten Verschiebungen in den Mengenverhältnissen zwischen der hypophosphorylierten und der unphosphorylierten Form festgestellt werden. Im Vergleich zum undifferenzierten Zustand (CM 3d) war am dritten Tag der Differenzierung (nCM 3d) der größte Teil des Oct4-Proteins unphosphoryliert (1), während die hyperphosphorylierte Form (3) kaum noch detektierbar war. Die rechts neben den 2-DG Bildern abgebildeten Skizzen verdeutlichen die geschilderten Ergebnisse. Eine parallel durchgeführte Detektion von Oct4 per

Immunoblot nach konventioneller SDS-Gelelektrophorese (**Abb. 3.2 B**) verdeutlichte, dass die beschriebenen Ergebnisse nur durch die 2-DG nachweisbar waren und diente gleichzeitig als Ladekontrolle.

Da neben Phosphorylierungen auch andere posttranslationale Modifikationen das Laufverhalten eines Proteins im 2-DG beeinflussen können, wurde das Proteinlysat von undifferenzierten Zellen mit alkalischer Phosphatase (CM 3d + CIP) behandelt und mit unbehandelten Proben (CM 3d) verglichen (**Abb. 3.2 C**). Nach der Phosphatase-Behandlung konnte nur noch unphosphoryliertes Oct4 nachgewiesen werden. Die phosphorylierten Oct4-Formen waren hingegen nicht mehr detektierbar (**Abb. 3.2 C**).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die in der 2-DG detektierten Oct4-Signale tatsächlich auf Phosphorylierungsunterschiede von Oct4 zurückzuführen waren, und dass es während der spontanen Differenzierung zu einer Verschiebung dieses Phosphorylierungsmusters kam.

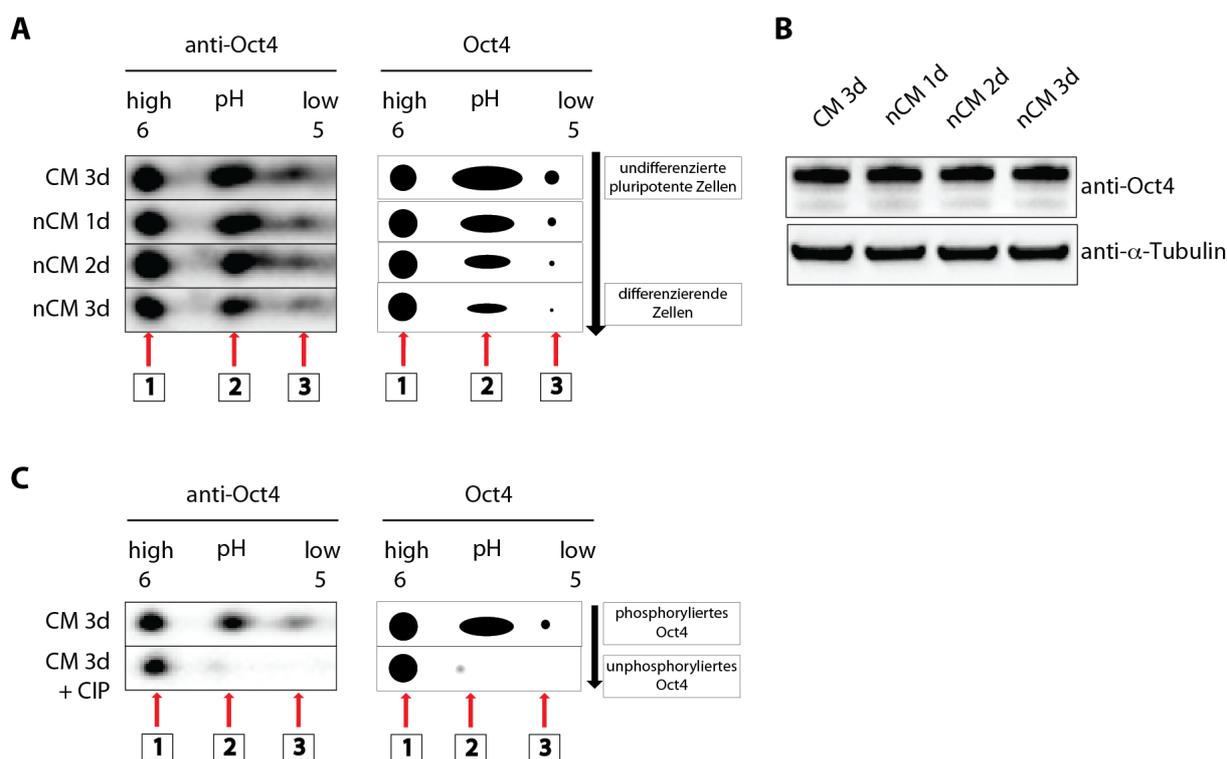


Abb. 3.2 Differenzierungsbedingte Unterschiede der Oct4-Phosphorylierung

A) Die Proteinlysate der humanen embryonalen Stammzelllinie H9 wurden über eine zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die transferierten Proteine wurden durch einen Oct4-spezifischen Antikörper detektiert. Zur vereinfachten Visualisierung wurden die Ergebnisse zusätzlich in einer graphischen Darstellung zusammengefasst. **B)** Die Proben wurden parallel über die konventionelle SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend zur Kontrolle der Proteinladung mit den Antikörpern gegen Oct4 und α -Tubulin entwickelt. **C)** Zum Nachweis der potentiellen Phosphorylierung wurden Probenlysate undifferenzierter Zellen mit alkalischer Phosphatase (CM 3d + CIP) dephosphoryliert und mit unbehandelten Proben (CM 3d) verglichen.

[1] unphosphoryliertes Oct4, [2] hypophosphoryliertes Oct4, [3] hyperphosphoryliertes Oct4 CM-konditioniertes Medium, nCM-nicht konditioniertes Medium

7.3 Identifikation potentieller Phosphorylierungsmotive von Oct4

Um die potentiellen Phosphorylierungsstellen zu identifizieren, wurde die Aminosäuresequenz von Oct4 mithilfe bioinformatischer Software analysiert. Dafür wurde die Sequenz nach bekannten Phosphorylierungsmotiven verschiedenster Kinasen abgesucht. Der Grenzwert für potentielle Phosphorylierungsstellen wurde bei 0.6 festgelegt, wobei der Wert 1 der höchsten Wahrscheinlichkeit einer Phosphorylierung entspricht. Die Analysen ergaben, dass über die gesamte Sequenz von Oct4 Serin, Threonin und Tyrosin Phosphorylierungsstellen verteilt sind (**Abb. 3.3 A**). Ein Auszug der möglichen Serin, Threonin Kinasen und der entsprechenden Motive ist in der Abbildung **3.3 B** zusammengefasst. Ein Phosphorylierungsmotiv ($_{230}\text{RKRKRTSIENR}_{240}$) wurde dabei besonders häufig und mit einer hohen Wahrscheinlichkeit detektiert. Interessanterweise war dieses Motiv gleichzeitig Substrat verschiedenster Kinasen (**Abb. 3.3 B**, rote Markierung). Mithilfe einer weiteren Analysesoftware (NetPhos K 1.0) wurden die für die Phosphorylierung infrage kommenden Kinasen weiter eingegrenzt (**Abb. 3.3 B**, PKA, AKT und PKG). Der identifizierten Phosphorylierungssequenz geht ein arginin- und lysinreiches Kern-Lokalisations-Signal (NLS) voraus, welches innerhalb der Familie der POU Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel hOct1/2/6/4 hoch konserviert ist (**Abb. 3.3 C**)¹⁷². Evolutionär scheint dieses Motiv ebenfalls eine entscheidende funktionelle Rolle einzunehmen, da es auch über Speziesgrenzen hinweg erhalten blieb (**Abb. 3.3 C**). Für die murinen und humanen POU-Transkriptionsfaktoren mPit-1, mOct-1, mOct4 und hOct1, hBrn-2 wurde die direkte Regulation der besprochenen Phosphorylierungsstellen durch PKA bereits nachgewiesen^{147, 153, 158, 176, 181, 187}. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob eine ähnliche Regulation die frühe Phase der spontanen Differenzierung in humanen embryonalen Stammzellen beeinflusst.

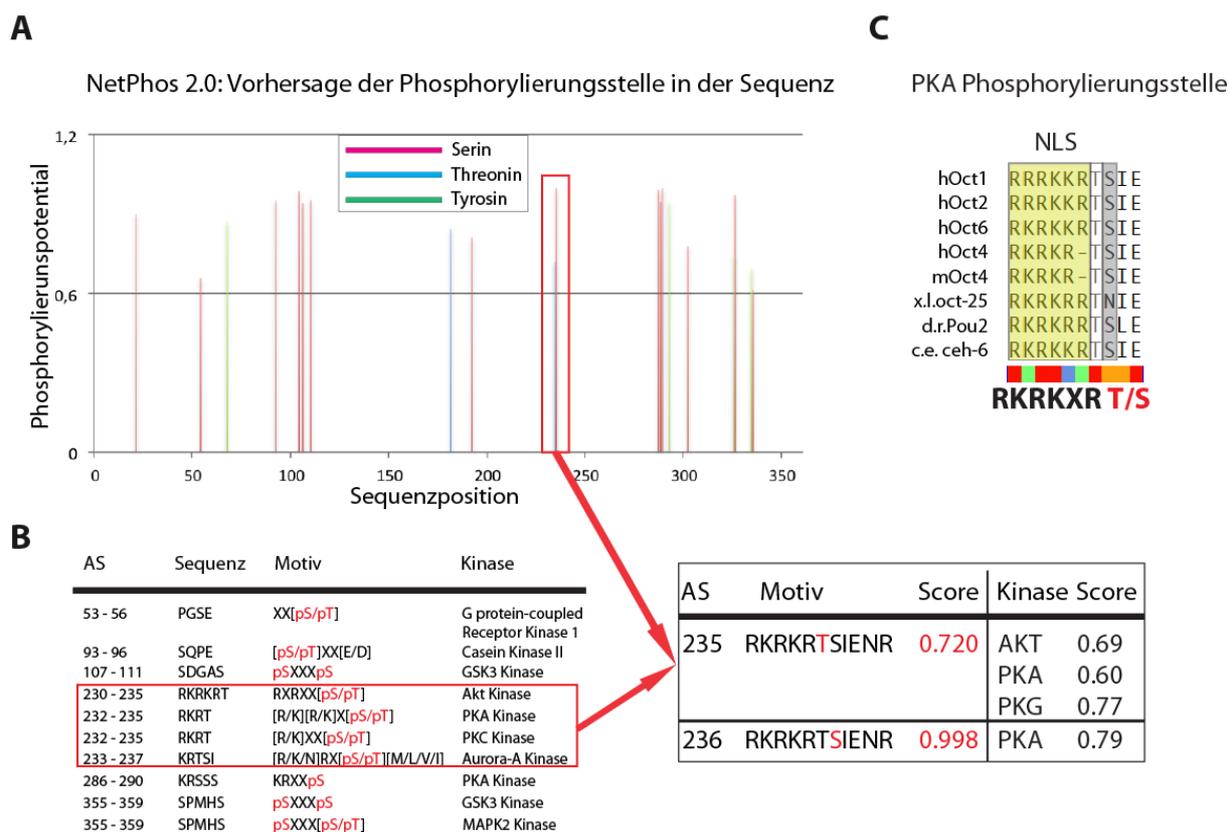


Abb. 3.3: Bioinformatische Analyse der humanen Oct4-Proteinsequenz zur Detektion von putativen Phosphorylierungsstellen

A) Über die gesamte Länge der Oct4-Proteinsequenz konnten mögliche Serin-, Threonin- und Tyrosinphosphorylierungsstellen identifiziert werden. Der Grenzwert für einen positiven Nachweis wurde auf 0.6 festgelegt. **B**) Zusammenfassung der für die Phosphorylierung infrage kommenden Kinasen. Des Weiteren sind die involvierten Aminosäuresequenzen (AS) und ihre Position im Oct4-Protein vermerkt. Besonders hervorgehoben wurde eine Sequenz, die ein potentielles Substrat mehrerer Kinasen war und eine besonders hohe Wahrscheinlichkeit für eine Phosphorylierung aufwies (roter und schwarzer Kasten). **C**) Mithilfe eines Sequenzvergleiches konnte gezeigt werden, dass diese potentiellen PKA-Phosphorylierungsstelle hoch konserviert ist.

7.4 *In vitro* Phosphorylierungsstudien von Oct4

Die durch die bioinformatische Analyse identifizierten Kinasen (**Abb. 3.3 B**) wurden in einem *in vitro* Kinase Experiment auf ihre potentielle Phosphorylierungsaktivität am Oct4-Protein überprüft. Neben des gesamten Oct4-Proteins (AS 1-360, Wildtyp) wurden auch verschiedene trunkeierte Oct4-Proteinfragmente auf ihre Phosphorylierung untersucht. Zu den analysierten Fragmenten von Oct4 gehörten der N-Terminus (Aminosäuren 1-137, NTD), die DNA Bindungsdomäne (Aminosäuren 138-289, DBD) und der C-Terminus (Aminosäuren 290-360, CTD). Für die Phosphorylierungsstudien wurden die Kinasen AKT, PKA, Gsk3 β und ERK2 verwendet. Von besonderem Interesse waren dabei AKT und PKA, weil sich innerhalb der Aminosäuresequenz der DNA Bindungsdomäne von Oct4 das unter 1.3 angesprochene Phosphorylierungsmotiv dieser Kinasen befindet. AKT und PKA phosphorylieren Substrate mit der Erkennungssequenz: [R/K][R/K]XpS/pT wobei X eine

beliebige Aminosäure darstellt. Die Aminosäuresequenz (230-236) der DBD von Oct4 ist ${}_{230}\text{RKRKRTS}_{236}$. Obwohl die Erkennungssequenz nicht exakt mit dem hochkonservierten potentiellen Phosphorylierungsmotiv innerhalb der DBD von Oct4 übereinstimmte, zeigten die Ergebnisse, dass sowohl PKA als auch AKT in der Lage sind, die DBD von Oct4 *in vitro* zu phosphorylieren (**Abb. 3.4 B, C**). In Anwesenheit von ${}^{32}\text{P}$ -ATP konnte ein Phosphateinbau mittels Autoradiogramm nachgewiesen werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass PKA eine weitaus höhere Affinität für das potentielle Phosphorylierungsmotiv hatte als AKT (**Abb. 3.4 B, C**). Der C- und N-terminale Teil des Oct4 Proteins wurde hingegen vornehmlich von Gsk3 β und ERK2 phosphoryliert (**Abb. 3.4 C**). Auch das Wildtyp Oct4-Protein wurde von den Kinasen phosphoryliert, wobei jedoch die Intensitäten der Phosphorylierung deutlich gegenüber der Intensität der trunkierten Oct4-Konstrukte abfiel. In der Coomassie Färbung der aufgetrennten GST-Oct4-Proteine war zu erkennen, dass das Wildtyp Oct4-Protein und der C-Terminus (CTD) degradiert vorlagen und daher eventuell weniger stark phosphoryliert werden konnten (**Abb. 3.4 B**).

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde sich überwiegend auf die Phosphorylierungsstelle in der DNA-Bindungsdomäne und auf die Kinase PKA konzentriert. Am Ende der Arbeit wird kurz auf die Phosphorylierung am C-Terminus und der daraus resultierenden Auswirkung auf die Funktion von Oct4 eingegangen.

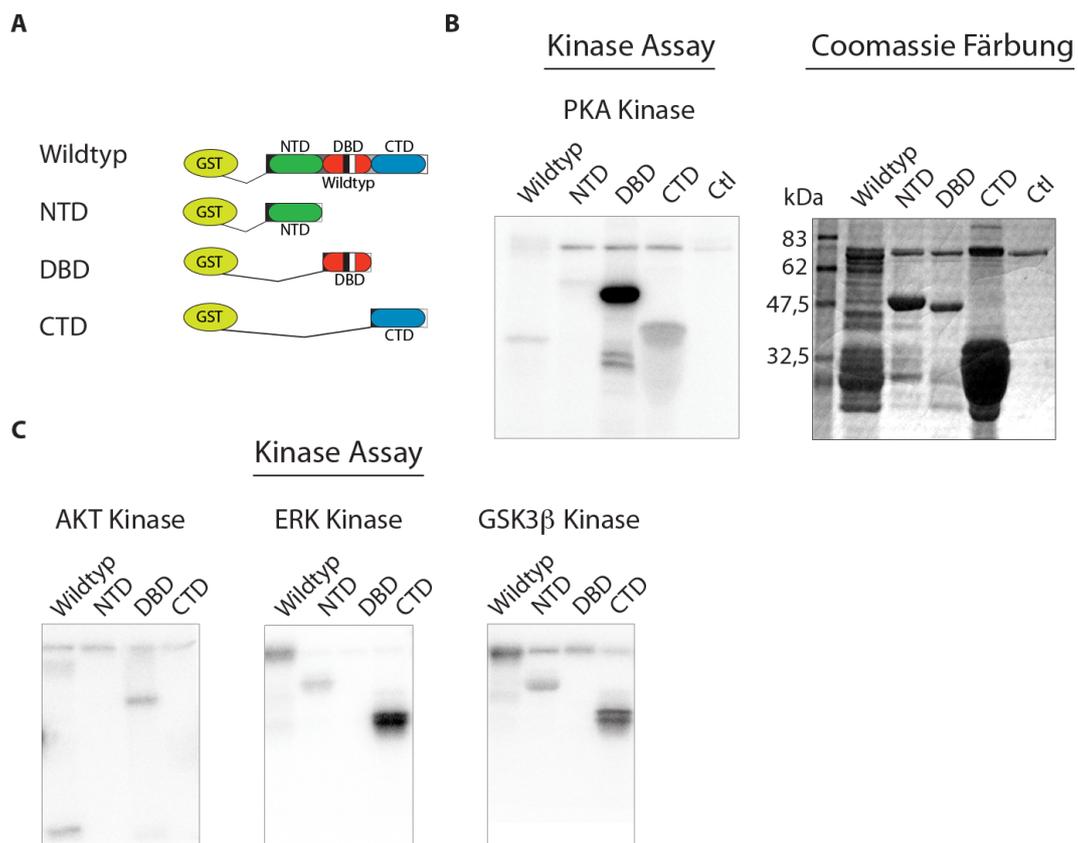


Abb. 3.4: Oct4 Phosphorylierungsstudien mithilfe von *in vitro* Kinase Experimenten

A) Für die Phosphorylierungsstudien wurde das Wildtyp Oct4 Protein sowie diverse trunkeierte Oct4-Konstrukte (NTD, DBD, CTD) eingesetzt. **B)** Die verschiedenen Oct4-Konstrukte sowie das Wildtyp Oct4 Protein wurde im *in vitro* Kinase Assay mit PKA eingesetzt. Zum Nachweis der Phosphorylierung wurden radioaktivmarkierte Proteine mithilfe eines Autoradiogramms nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass fast ausschließlich die DBD von PKA phosphoryliert wurde. Mit einer Coomassie Färbung wurde überprüft ob ausreichende Proteinmengen für die Phosphorylierungsexperiment eingesetzt wurden. **C)** Drei weitere Kinasen (AKT, ERK2, Gsk3 β) wurden auf ihre potentielle Phosphorylierungsaktivität am Oct4 Protein untersucht. AKT phosphoryliert ebenfalls die DBD, wenn auch weitaus schwächer als PKA. ERK und Gsk3 β phosphorylieren überwiegend den N- und C-Terminus. NTD, N-terminale Transaktivierungsdomäne; DBD, DNA Bindungsdomäne; CTD, C-terminale Transaktivierungsdomäne; Ctl-Leerkontrolle

7.5 Die PKA Signaltransduktionskaskade und Oct4-Phosphorylierung

Anhand der bereits beschriebenen Experimente konnte gezeigt werden, dass Oct4 *in vitro* von PKA phosphoryliert wurde und dass sich *in vivo* der Phosphorylierungsstatus von Oct4 während der spontanen Differenzierung veränderte. Durch die bioinformatische Analyse der Oct4-Proteinsequenz konnten die potentiellen PKA-Phosphorylierungsstellen eingegrenzt werden. In weiteren Experimenten sollte getestet werden, ob eine Modulation der PKA-Aktivität oder eine Mutation der Oct4-Phosphorylierungsstellen Einfluss auf das zuvor beschriebene differenzierungsabhängige Verteilungsmuster von Oct4 in der 2D Gelelektrophorese hatte.

Zur Steigerung der PKA-Aktivität wurde das zellpermeable cAMP-Analogon 8-Br-cAMP eingesetzt. Dabei handelt es sich um die stabilisierte Form des natürlich vorkommenden Signalmoleküls zyklisches AMP (cAMP), bei dem ein Wasserstoffmolekül durch ein Brommolekül ersetzt wurde, wodurch 8-Br-cAMP deutlich vor der Hydrolyse durch Phosphodiesterasen geschützt wird. Zur Inhibition des PKA Signalweges wurde H-89 genutzt. Dabei handelt es sich um einen kompetitiven Inhibitor der mit ATP um die PKA Bindungsstelle konkurriert.

Lysate von undifferenzierten und differenzierenden Zellen wurden mit Lysaten von 8-Br-cAMP (1mM) und H-89 (10 μ M) behandelten Zellen in der 2-DG verglichen (**Abb. 3.5 A**). Wie bereits unter 3.2 beschrieben, konnte ein differenzierungsbedingter Ladungsunterschied von Oct4 im 2-D Gel detektiert werden. Die hyperphosphorylierte Form von Oct4 war deutlich in der Probe von undifferenzierten Zellen zu erkennen und nahm im Verlauf des Differenzierungsprozesses signifikant ab (**Abb. 3.5 A** Markierung **3**). Des Weiteren änderten sich die Mengenverhältnisse der hypophosphorylierten und der unphosphorylierten Form des Oct4-Proteins untereinander. In undifferenzierten Zellen war die hypophosphorylierte Form des Oct4-Proteins am stärksten zu detektieren, während in differenzierenden Zellen die unphosphorylierte Form vermehrt festgestellt wurde (**Abb. 3.5 A**, CM 3d und nCM 3d, **1** und **2**). Nach der Behandlung der Zellen mit dem Aktivator des PKA Signalweges 8-Br-cAMP konnte ein deutlicher Anstieg der hyperphosphorylierten und der hypophosphorylierten Form des Oct4-Protein nachgewiesen werden (**Abb. 3.5 A** CM 3d + Br-cAMP, **2** und **3**). In der **Abb. 3.2 A** war bereits zu erkennen, dass vergleichbare Menge der unphosphorylierten Form von Oct4 in undifferenzierten Zellen und in differenzierenden Zellen vorhanden war. Demnach ist zu vermuten, dass der mengenmäßige Unterschied des unphosphorylierten Oct4 in den Proben CM 3d und CM 3d + Br-cAMP vermutlich eine Proteintransfer-bedingte Varianz darstellt (siehe vergleichend **Abb. 3.2 A CM 3d** Markierung **1**). Im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen führte die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor des PKA Signalweges H-89 zur mengenmäßigen Reduzierung des hypophosphorylierten und des hyperphosphorylierten Oct4 (**Abb. 3.5 A**). Des Weiteren wurde Oct4 in den H-89 behandelten Zellen hauptsächlich in der unphosphorylierten Form detektiert (**Abb. 3.5 A**).

Die bisher beschriebenen Unterschiede im 2-D Gel Laufverhalten von Oct4 konnten bis dahin noch keinem bestimmten Aminosäuremotiv in der Proteinsequenz von Oct4 zugeordnet werden. Aus diesem Grund wurde das unter 3.3 identifizierte potentielle PKA-Phosphorylierungsmotiv in der Oct4-Sequenz mutiert. Dafür wurden jeweils das Threonin (TA) oder das Serin (SA) oder beide Aminosäuren (TA/SA) gleichzeitig durch Alanin ersetzt. Alanin ist strukturell mit Threonin und Serin vergleichbar, wobei Alanin aufgrund

einer nicht vorhandenen Hydroxylgruppe nicht phosphoryliert werden kann. Das in HeLa Zellen exprimierte und Flag-markierte Wildtyp Oct4 wurde mithilfe eines Flag-Antikörpers nachgewiesen und zeigte ein Stammzellen ähnliches Phosphorylierungsprofil von Oct4 (**Abb. 3.5 B**). Bei der Analyse der Flag-markierten Oct4-Mutanten fiel auf, dass das hyperphosphorylierte Oct4-Protein in der Doppelmutante nicht mehr nachweisbar war. Bei den Einzelmutanten zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Verlust dieser hyperphosphorylierten Oct4 Form (**Abb. 3.5 B**). Interessanterweise konnte bei der SA Einzelmutante vermehrt hypophosphoryliertes Oct4 nachgewiesen werden. Ein vergleichbares Experiment wurde in Stammzellen durchgeführt, wobei ausschließlich Wildtyp Oct4 und die Doppelmutante TA/SA zum Einsatz kamen. Das Flag-markierte Oct4-Protein konnte dabei in einem dem endogenen Oct4-Protein entsprechenden Phosphorylierungsprofil nachgewiesen werden (**Abb. 3.5 C**). Das Wildtyp Flag-Oct4-Protein zeigte wieder die typische Verteilung in Form von 3 distinkten Signalen, wobei das Signal des hyperphosphorylierten Oct4-Proteins nur äußerst schwach detektierbar war (**Abb. 3.5 C**). Bei der Doppelmutante war fast ausschließlich die unphosphorylierte Form des Oct4-Proteins und nur noch geringe Mengen der hypophosphorylierten Form vorhanden (**Abb. 3.5 C**). Dieses Experiment lässt vermuten, dass Oct4 zusätzliche Phosphorylierungsmotive enthält. Die beschriebenen Ergebnisse konnten nur mit einem Flag-Antikörper nachgewiesen werden, da bei der Entwicklung mit einem Oct4-spezifischen Antikörper das endogene Oct4-Protein das Proteinsignal der Flag-Oct4-Mutanten überdecken würde (**Abb. 3.5 C**). Mit der **Abb. 3.5 D** sollte verdeutlicht werden, dass sich die Oct4-Gesamtproteinmenge durch die einzelnen Behandlungen nur geringfügig veränderte und diente als Expressionskontrolle der unter **Abb. 3.5 A** und **C** beschriebenen Experimenten.

Weiterführende 2-DG Studien mit verschiedenen trunkierten Flag-markierten Oct4 Fragmenten zeigten erstaunlicherweise einen Einfluss der N- oder C- terminalen Domäne auf die Phosphorylierung der DNA Bindungsdomäne. Während das Wildtyp Oct4-Protein das typische Phosphorylierungsmuster von 3 distinkten Signalen aufwies, konnte eine ähnliche Protein Verteilung nur bei den DBD Konstrukten in Verbindung mit der N-oder C-terminalen Transaktivierungsdomäne festgestellt werden (**Abb. 3.5 E**). Die N-terminale Domäne hatte dabei anscheinend einen größeren Einfluss auf die Phosphorylierung der DNA-Bindungsdomäne (**Abb. 3.5 E**). Diese Annahme ist jedoch spekulativ, da es bei diesen Flag-markierten Oct4-Fragmenten zu einer signifikanten Veränderung des isoelektrischen Punktes kam und so die detaillierte Auftrennung des Proteins nur mit ZOOM® Strips eines anderen pH Bereiches möglich gewesen wäre. Weitere posttranslationale Modifikationen am N- und C-Terminus, die das Proteinlaufverhalten zusätzlich beeinflussen, können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

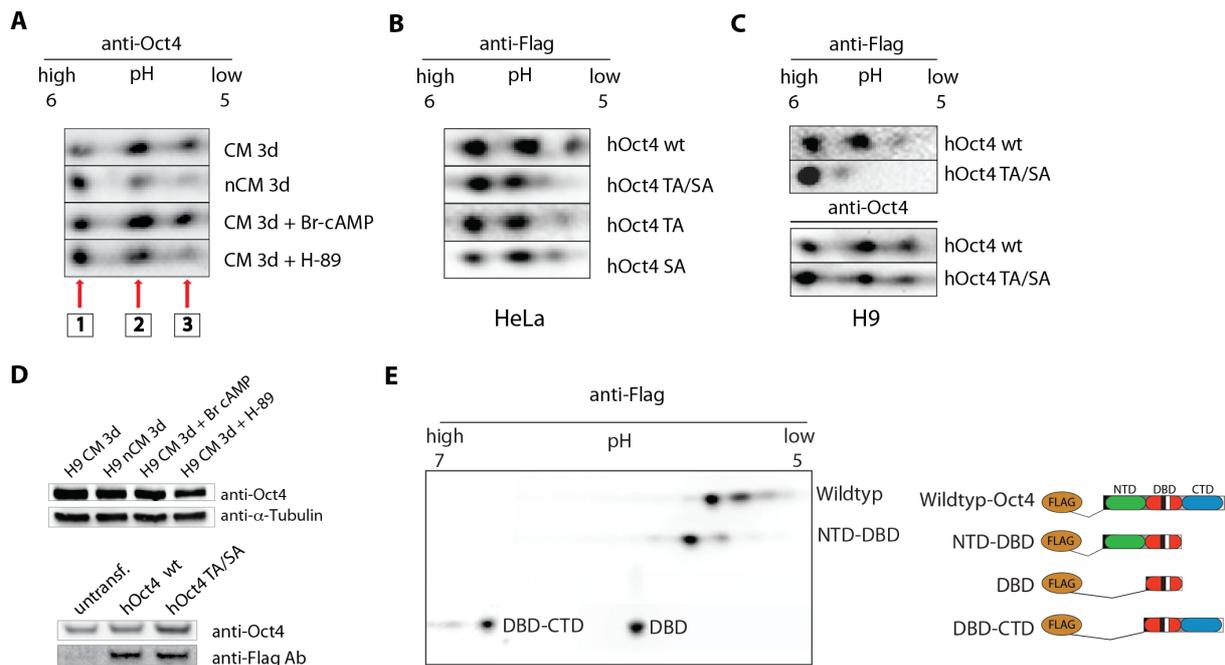


Abb. 3.5: Modulation des PKA Signalweges verändert die Auftrennung von Oct4 in der zweidimensionalen Gelelektrophorese

A) Proteinlysate von undifferenzierten (CM 3d) und differenzierenden Zellen (nCM 3d) wurden mithilfe der 2-DG aufgetrennt und mit Probenlysaten von Zellen verglichen, bei denen der PKA Signalweg aktiviert (CM 3d + Br-cAMP) oder inhibiert (CM 3d + H-89) wurde. Die Markierungen **1**, **2** und **3** bedeuten entsprechend unphosphoryliertes, hypophosphoryliertes und hyperphosphoryliertes Oct4-Protein. Der Nachweis von Oct4 erfolgte mit einem Oct4-spezifischen Antikörper. **B)** Flag-markiertes Wildtyp Oct4-Protein und verschiedene Flag-Oct4 Mutanten der potentiellen PKA Phosphorylierungsstelle (TA/SA, TA, SA) wurden in HeLa Zellen exprimiert, mithilfe der 2-DG aufgetrennt und durch einen Flag-spezifischen Antikörper nachgewiesen. **C)** In hESCs exprimiertes Wildtyp Flag-Oct4 sowie die Flag-Oct4 TA/SA Doppelmutante wurden nach der 2-DG mit Flag- und Oct4-spezifischen Antikörper detektiert. **D)** Zur Transfektions- und Expressionskontrolle der unter A) und C) verwendeten Proben wurden die Proteinlysate der humanen Stammzellen mithilfe eines Immunoblots und Oct4- und Flag-spezifischen Antikörpern analysiert. **E)** Weiterführende 2-DG Studien in HeLa Zellen lassen einen Einfluss des N-Terminus bei der Phosphorylierung der DBD vermuten. (WT- Wildtyp, NTD-DBD, N-terminale Transaktivierungsdomäne+DNA Bindungsdomäne, DBD- DNA Bindungsdomäne, DBD-CTD, C-terminale Transaktivierungsdomäne+DNA Bindungsdomäne)

7.6 Potenzielle Funktion der Oct4-Transkriptionsfaktor Phosphorylierung

Durch Proteinphosphorylierung und Dephosphorylierung können verschiedenste Transkriptionsfaktorfunktionen, wie z.B. die subzelluläre Lokalisation, die Proteininstabilität, die Protein-Protein Interaktion und die DNA-Bindung, direkt beeinflusst werden ¹⁷³. Mit den folgenden Experimenten wurden die phosphorylierungsbedingten Auswirkungen auf die Regulation der biologischen Funktion von Oct4 untersucht.

7.6.1 Subzelluläre Lokalisation von Oct4

Interessanterweise befindet sich das in dieser Doktorarbeit beschriebene Phosphorylierungsmotiv direkt unterhalb des Oct4 Kernlokalisationsignal. Diese räumliche Nähe ließ einen direkten Zusammenhang zwischen einer Phosphorylierung und der subzellulären Lokalisation von Oct4 in der Zelle vermuten. Aus diesem Grund wurden durch Immunfluoreszenzexperimente die Lokalisation von Oct4 in den hESCs in Abhängigkeit von der Modulation des PKA Signalweges untersucht. Der Nachweis von endogenem hOct4 erfolgte mit Oct4-spezifischen Antikörpern. Exogen exprimiertes hOct4 wurde anhand der Flag-Markierung dieser Proteine detektiert.

Zur Kontrolle der Oct4-Verteilung wurden undifferenzierte Stammzellen (CM 3d) mit Flag-markiertem hOct4 transfiziert (Wildtyp und hOct4 Δ 230-234 NLS). In der **Abb. 3.6.1** kann man zwischen den Phalloidin-markierten Anteilen des Zytoskeletts (rot) und der DAPI-markierten Kernfraktion (hell blau) unterscheiden. Die Färbung des endogenen hOct4 wurde teilweise von der starken DAPI Färbung überlagert (siehe **Abb. 3.6.1 Dapi/Oct4**). Die Kernlokalisierung des FLAG-markierten Wildtyp-Oct4-Proteins in den undifferenzierten Stammzellen war hingegen deutlich zu erkennen (**Abb. 3.6.1 A** Cyanfärbung des Kerns). Die Deletion des NLS führte zu einer Oct4 Anreicherung im Zytoplasma (**Abb. 3.6.1 B**). Während der spontanen Differenzierung der hESCs kam es zu keiner Änderung der Oct4 Lokalisation innerhalb der Zelle (**Abb. 3.6.1 C**). Weder die Aktivierung noch die Inhibierung des PKA Signalweges oder Mutationen des potentiellen PKA-Phosphorylierungsmotives hatten Auswirkungen auf die zelluläre Verteilung von Oct4 (**Abb. 3.6.1 D, E, F**). Zusätzlich zu der zuvor beschriebenen negativen Phosphorylierungsdoppelmutante (TA/SA) des PKA-Motives, wurde eine Phosphorylierung-imitierende Mutante (TE/SD) verwendet. Aber auch bei dieser Oct4-Mutante gab es keine Unterschiede in der subzellulären Verteilung des Proteins (**Abb. 3.6.1 G**). Die Ergebnisse verdeutlichten, dass die Modulation der Oct4 PKA-Phosphorylierungsstelle keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors hatte.

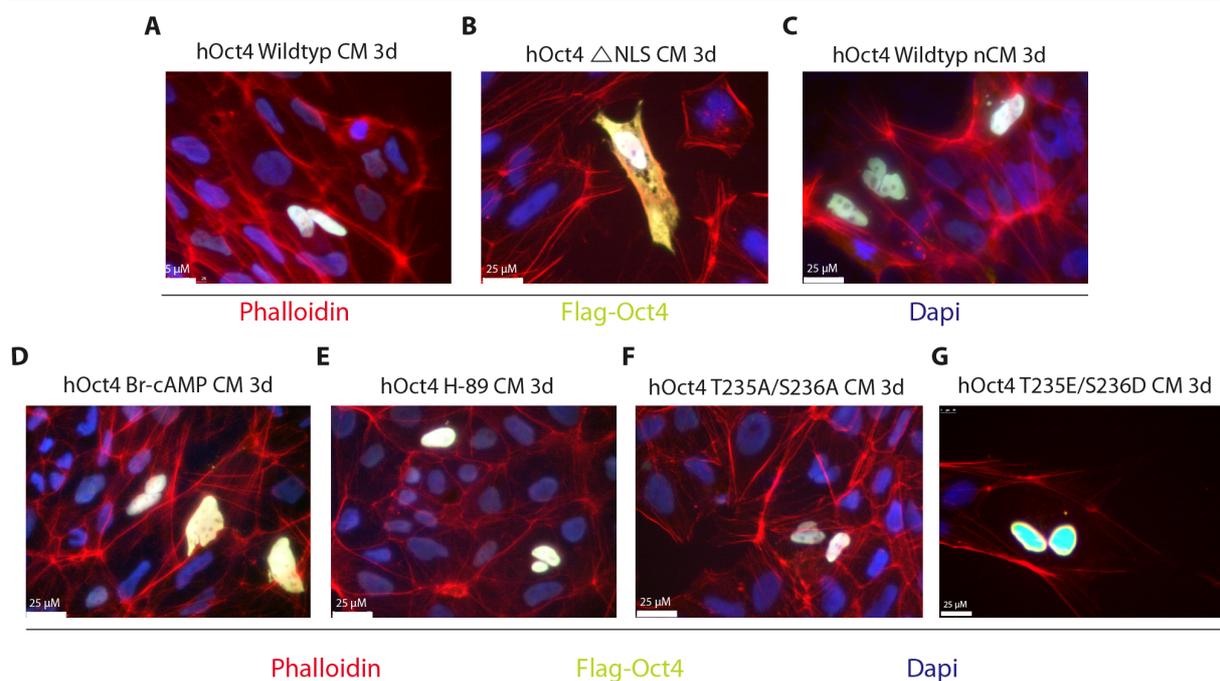


Abb. 3.6.1: Analyse der subzellulären Verteilung von Oct4 während der Differenzierung und der Modulation des PKA Signalweges

Die hESCs wurden mit den entsprechenden Flag-markierten Oct4 Konstrukten transfiziert und anschließend für 3 Tage unter den angegebenen Bedingungen kultiviert. Der Nachweis von FLAG-Oct4 und endogenem Oct4 erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Der Zellkern und das Zytoskelett wurden mit DAPI und Phalloidin angefärbt. In undifferenzierten **A**) und in differenzierenden Zellen **C**) befindet sich Oct4 fast ausschließlich im Zellkern. Die Einflussnahme auf den PKA Signalweg veränderte die Kernlokalisation von Oct4 ebenfalls nicht (**D**, **E**, **F**, **G**). Mutationen im NLS führten zu einer Anreicherung von Oct4 im Zytoplasma.

7.6.2 Oct4/Sox2 Interaktion ist unabhängig von der Oct4-Phosphorylierung

Der am besten charakterisierte Bindungspartner von Oct4 ist Sox2. Diese beiden Transkriptionsfaktoren interagieren an vielen Promotorregionen ihrer gemeinsamen Zielgene und steuern so deren Expression¹⁹³. In den nachfolgenden Experimenten wurde geprüft, ob sich die Bindung zwischen Oct4 und Sox2 während der spontanen Differenzierung (CM 3d, nCM 1d, nCM 2d, nCM 3d) verändert und welchen Einfluss die Behandlung der Zellen mit einem Aktivator und einem Inhibitor des PKA Signalweges auf die Oct4/Sox2 Interaktion hatte. Zelllysate dieser Proben wurden für eine Immunpräzipitation (IP) mit Oct4-Antikörpern eingesetzt. Nach der IP wurden die präzipitierten Proteine durch Immunoblot nachgewiesen. Das Oct4-Protein wurde erfolgreich präzipitiert, jedoch veränderte sich die Sox2-Bindung im Verlaufe des Experiments nicht (**Abb. 3.6.2 A**). Die entsprechenden Kontrollexperimente wurden in der **Abb 3.6.2 B** zusammengefasst und verdeutlichen das bei der IP nahezu das gesamte Oct4- und Sox2-Protein qualitativ aus der Probe präzipitiert werden konnte (siehe

vergleichend Input versus nach IP). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Änderung des Phosphorylierungszustandes von Oct4 keine Auswirkung auf die Bindung mit Sox2 hatte.

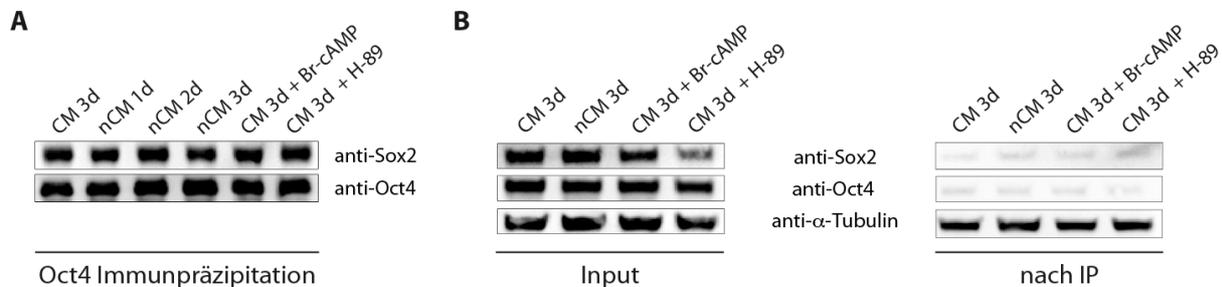


Abb. 3.6.2: Keine Bindungsunterschiede zwischen Oct4 und Sox2 nach Ko-Immunpräzipitation

A) Endogenes Oct4 wurde aus Zelllysaten von undifferenzierten (CM 3d), differenzierenden Zellen (nCM 1d-3d) und mit Br-cAMP und H-89 behandelten Zellen immunpräzipitiert. Nach Auftrennung durch eine SDS-PAGE wurde Oct4 und kopräzipitiertes Sox2 per Western Blot detektiert. **B)** Zur Kontrolle der Experimente wurden die Proben vor und nach der Immunpräzipitation mittels SDS-PAGE überprüft. Alpha-Tubulin diente als Ladekontrolle. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Autoradiographie.

7.6.3 Regulierung der DNA-Bindung

Proteinphosphorylierungen können zu Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur des jeweiligen Proteins führen²¹⁴. Diese Strukturänderungen können die DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren entscheidend beeinflussen. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob sich die DNA-Bindung von Oct4 im Verlaufe der spontanen Differenzierung oder nach der Modulation der PKA-Signalkaskade veränderte. Dafür wurden Oct4-DNA-Bindungsstudien mithilfe eines *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) Experiments an artifiziellen POU-DNA-Bindungsmotiven (PORE, MORE) durchgeführt.

7.6.3.1 Oct4 und andere POU-Domänen Transkriptionsfaktoren binden an artifizielle DNA-Bindungsmotive

Zunächst erfolgte die Etablierung eines EMSA mit Zellkernextrakten von HeLa- und H9-Zellen. Dabei wurde die DNA-Bindungsaktivität von Oct4 an das artifizielle DNA-Motive MORE analysiert (**Abb. 3.6.3.1**). Die Kernfraktionen von untransfizierten und mit hOct4 transfizierten HeLa Zellen wurden mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden (MORE Motiv) inkubiert. Die Bindung der Proteine an die markierte DNA Sequenz führte zu einer nachweisbaren Veränderung des Laufverhaltens der DNA während der elektrophoretischen Auftrennung. In den Kernlysaten der untransfizierten HeLa Zellen konnten diverse DNA-Proteininteraktion detektiert werden. Vermutlich handelte es sich

dabei um die Oct1 bzw. Oct6 Proteinbindung an das MORE DNA-Motiv ¹⁵⁷. Nach der Transfektion der Zellen mit Oct4 wurden verschiedene Oct4 spezifische Banden sichtbar (**Abb. 3.6.3.1**). Dabei bestätigte sich, dass Oct4 als Monomer (4), Homodimer (4/4) oder Heterodimer (1/4) binden konnte. Die Spezifität dieser Oct4-DNA -Interaktion wurde anschließend mithilfe eines Oct4 Antikörpers nachgewiesen. Die Bindung des Antikörpers führt entweder zu einer Verschiebung des Oct4 spezifischen Bandenmusters oder wie in diesem Fall zur Inhibierung der Oct4-DNA-Interaktion. Ein ähnliches Testexperiment wurde in H9 Zellen mit dem MORE Motiv durchgeführt und undifferenzierte (CM 3d) und differenzierende Zellen (nCM 3d) miteinander verglichen. Auch bei diesem Experiment wurde die Oct4-DNA-Interaktion durch den Antikörper verhindert. Des Weiteren zeigte sich eine unterschiedlich starke Bindung von Oct4 an das MORE Motiv in Abhängigkeit vom Differenzierungszustand der Zellen (**Abb. 3.6.3.1**). Diese divergente DNA-Bindungsaktivität war nicht auf Oct4-Proteinexpressionsunterschiede zurückzuführen (**Abb. 3.6.3.1**, Immunoblot). In HeLa Zellen wurde Oct4 nur in der Kernfraktion der transfizierten Zellen nachgewiesen. In den H9 Zellen wurde der überwiegende Teil von Oct4 in der Zellkernfraktion detektiert. Der Nachweis von geringen Oct4-Mengen im Zytoplasma wurde vermutlich durch Verunreinigungen während des Anreicherungsprozesses bedingt.

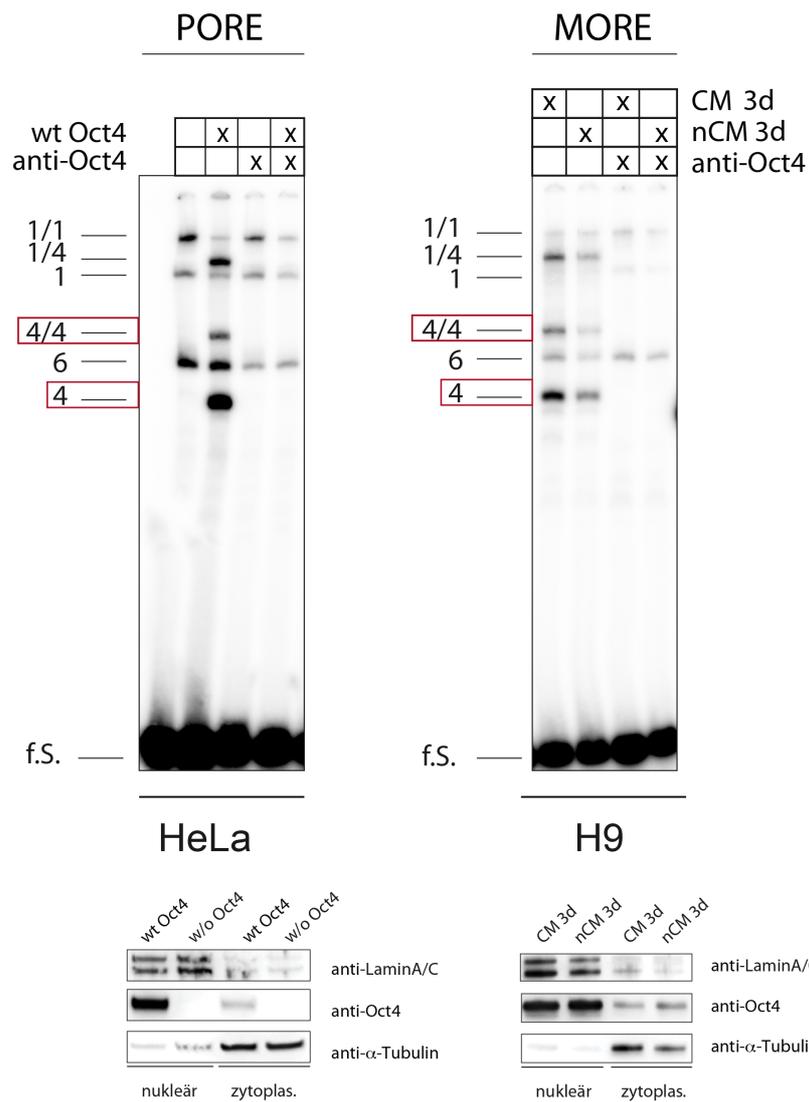


Abb. 3.6.3.1 Oct4 Bindung an artifizielle DNA Sequenzen (PORE und MORE)

Die DNA Bindungsaktivität von Oct4 in HeLa und H9 Zellen wurde mittels EMSA analysiert. Dazu wurden 5 μ g Proteinlysate mit radioaktiv markierten DNA Oligomeren (PORE oder MORE DNA-Bindungsmotiv) inkubiert, elektrophoretisch aufgetrennt und DNA-Protein Komplexe autoradiographisch sichtbar gemacht. Die roten Markierungen heben die Bindung von Oct4 als Monomer (4) oder als Homodimer (4/4) hervor. Die Bindung weiterer POU-Transkriptionsfaktoren (Oct6, Oct1) als Monomer, Homodimer oder, in Verbindung mit Oct4, als Heterodimer wurden ebenfalls markiert. Gesamteinlysate von HeLa und H9 Zellen wurden in zytoplasmatische- und nukleäre Fraktion getrennt. Mithilfe der Antikörper gegen LaminA/C und α -Tubulin wurden die erfolgreiche Trennung der Fraktionen des Zytoplasmas und des Kerns nachgewiesen. f.S. -freie DNA Sonde

7.6.3.2 Modulation des PKA Signalweges veränderten die Oct4-DNA-Bindung

Anhand der zuvor ermittelten optimalen Bedingungen des EMSA wurden weitere Oct4-DNA-Bindungsmotive untersucht. Dabei handelte es sich um die bereits erwähnten Bindungsmotive PORE und MORE. Zur Kontrolle der spezifischen Oct4-Bindung an die genannten Motive wurde ein POLY-GpC-reiches DNA-Bindungsmotiv verwendet.

Die Bindung an das PORE-Motiv von Oct4 erfolgt überwiegend als Monomer (**Abb. 3.6.3.2 A, B** PORE). Die Oct4 Homodimerisierung an diesem Motiv in H9 Zellen war äußerst schwach und konnte nur nach längerer Belichtung des Films autoradiographisch detektiert werden (**3.6.3.2 A** PORE). Bei der Verwendung von rekombinantem Protein in den HeLa-Zellen war die Bildung von Oct4 Homodimeren jedoch deutlich nachweisbar (**3.6.3.2 B** PORE). Die Monomerbindung verringerte sich im Verlauf des Differenzierungsprozesses der Zellen. Die PKA Stimulierung mit 8-Br-cAMP führte zu einer erhöhten Bindungsaktivität von monomeren Oct4 am PORE-Motiv (**Abb. 3.6.3.2 A**). Die Behandlung der Zellen mit dem PKA Inhibitor H-89 hatte nahezu keinen Effekt auf die DNA Bindung. Auffällig war jedoch, dass eine weitere Bande unterhalb der Monomerbande von Oct4 sichtbar wurde. Dabei könnte es sich um die PORE-Motiv-Bindung des POU Transkriptionsfaktoren Pit-1 oder Abbauprodukte der bereits erwähnten POU Proteine handeln (**Abb. 3.6.3.2 A** PORE). Im Gegensatz zu der beschriebenen Oct4-PORE-Bindung erhöhte sich Oct1 Monomerbindung nach Behandlung mit H-89.

Oct4 konnte das MORE-Motiv sowohl als Monomer (4), Homodimer (4/4) oder, in Verbindung mit anderen Transkriptionsfaktoren, als Heterodimer (1/4) binden. Die Stärke der Bindung war wiederum differenzierungsabhängig (**Abb. 3.6.3.2 A** MORE). In differenzierenden Zellen (nCM 3d) verringerte sich die Bindung von Oct4 als Monomer und Homodimer an dem beschriebenen DNA-Bindungsmotiv. Die Behandlung der Zellen mit 8-Br-cAMP führte zu einer erhöhten Bindung von Oct4 an die artifizielle DNA Sequenz. Die Behandlung der Zellen mit H-89 hatte nahezu keinen Einfluss auf die Bindung von Oct4 an das MORE-Motiv (**Abb. 3.6.3.2 A**). Interessanterweise kam es zu einer deutlich erhöhten Heterodimerisierung von Oct1 mit Oct4 nach H-89 Behandlung (**Abb. 3.6.3.2 A** MORE). Unklar blieb nach diesen Experimenten, warum die Stimulation von PKA zu einer erhöhten Oct4-DNA-Bindung führte, während die Inhibierung von PKA mit H-89 nahezu keinen Effekt hatte.

Wie erwartet, kam es zu keiner Proteinbindung an dem unspezifischen DNA Motiv (**Abb. 3.6.3.2 A** POLY GpC). Die nicht gebundenen, freien DNA Oligomere wurden als freie DNA-Sonde markiert (f.S.).

Durch die Analyse verschiedener Oct4-Mutanten sollte überprüft werden, inwieweit sich die bereits beschriebenen DNA-Bindungsunterschiede auf ein bestimmtes

Aminosäuremotiv eingrenzen lassen. Dafür wurden Einzelmutanten (T235A, S236A) und eine Doppelmutante (T235A/S236A) von der Oct4 Phosphorylierungsstelle generiert und mithilfe des EMSA untersucht. Als Negativkontrolle wurde die Kernlokalisationsmutante Oct4 Δ NLS verwendet. Wie erwartet, war diese Mutante kaum in der Kernproteinfraktion nachweisbar (**Abb. 3.6.3.2 C**, HeLa). Da für die EMSA Untersuchungen ausschließlich diese Protein-Fractionen eingesetzt wurden, konnte dementsprechend keine Oct4 Bindung an das PORE oder MORE Motiv festgestellt werden (**Abb. 3.6.3.2 B**, Oct4 Δ NLS PORE und MORE). In den HeLa Zellen war neben der Oct4-Monomerbindung an das PORE-Motiv auch die Bindung als Homodimer deutlich erkennbar (**Abb. 3.6.3.2 B**). Es ist anzunehmen, dass aufgrund der starken Oct4 Überexpression dieser Homodimerkomplex stärker sichtbar wurde als in den Stammzellen. Die Einzelmutanten zeigten mit dem Wildtyp Oct4-Protein vergleichbare Bindungsaffinitäten zum PORE-Motiv. (**Abb. 3.6.3.2 B**) Bei der Doppelmutante war jedoch die Oct4-Bindung als Monomer (4) und insbesondere als Homodimer (4/4) reduziert (**Abb. 3.6.3.2 B**, Oct4 T235A/S236A).

Das MORE-Motiv wurde in HeLa Zellen überwiegend als Homodimer (4/4) gebunden. Die Interaktion der Oct4 Doppelmutante und der S236A Einzelmutante mit dem MORE-Motiv war im Vergleich zum Wildtyp Oct4-Protein deutlich schwächer ausgeprägt (**Abb. 3.6.3.2 B**, MORE Oct4 T235A/S236A, Oct4 S236A). Im Gegensatz dazu hatte der Austausch des Threonins keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung von Oct4 an das artifizielle DNA-Motiv (**Abb. 3.6.3.2 B**, MORE Oct4 T235A). Daher schien das Serin an Position 236 eine dominante Rolle bei der Oct4 Homodimerisierung an der DNA einzunehmen. Die Phosphorylierung-imitierende Oct4-Mutante T235E/S236D konnte erstaunlicherweise an keine der artifiziellen DNA-Motive binden.

Die **Abb. 3.6.3.2 C** dienten zur Kontrolle der Kernproteinextraktion und zeigen, dass vergleichbare Proteinmengen in den beschriebenen Versuchen eingesetzt wurden. Interessanterweise konnte nach der Behandlung der Zellen mit H-89 eine weitere Oct4-Antikörper spezifische Bande detektiert werden (**Abb. 3.6.3.2 C**, H9 Zellen * Markierung). Ob es sich dabei um ein Degradationsprodukt oder die dephosphorylierte Form von Oct4 handelte, blieb unklar.

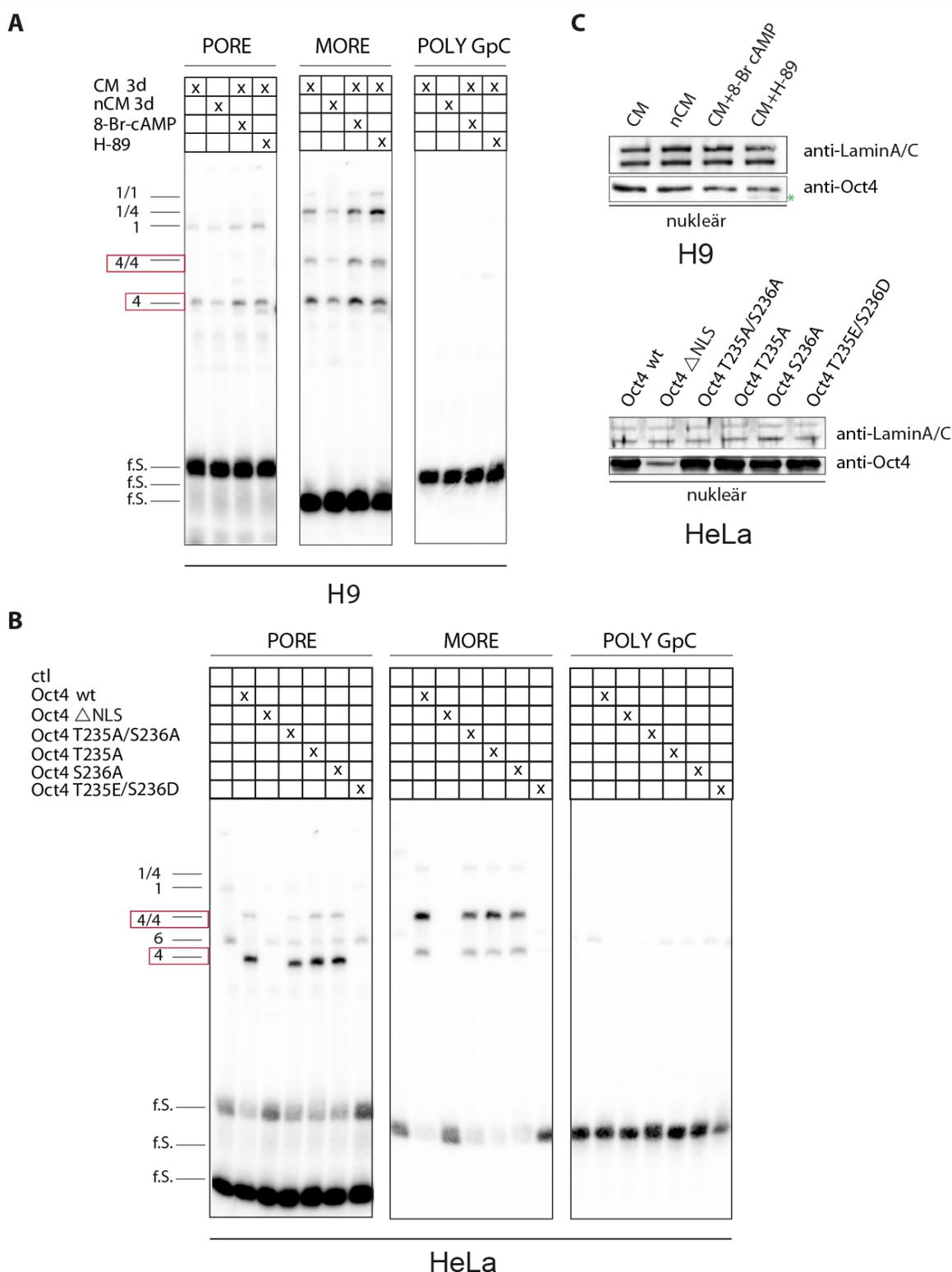


Abb. 3.6.3.2 Die Oct4-DNA-Bindung wird teilweise vom PKA Signalweg reguliert

A, B) Lysate von H9 und HeLa Zellen wurden nach einer spezifischen Behandlung auf die DNA Bindungsaktivität von Oct4 im EMSA analysiert. Dazu wurden 5 μ g der Kernproteinextrakte mit radioaktiv markierten DNA Oligomeren (PORE oder MORE) inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte autoradiographisch. Die Markierungen zeigten sowohl (rote Box) die Bindung von Oct4 als Monomer (4) oder als Homodimer (4/4) als auch die Bindung von Oct6 und Oct1 an das jeweilige DNA-Motiv an. **C**) Der Nachweis von Lamin A/C und Oct4 erfolgte mit spezifischen Antikörpern und diente als Ladekontrolle. *nach H-89 Behandlung detektierte Oct4-Antikörper spezifische Bande, f.S.-freie DNA Sonde, ctl.-Kontrolle

7.7 Phosphorylierungsabhängige Bindung von Oct4 an verschiedenen Promotorregionen

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass sich der Oct4 Phosphorylierungszustand während der spontanen Differenzierung verändert und dass sich daraufhin keine Unterschiede in der subzellulären Verteilung sowie der Kofaktor-Bindung Oct4 ergeben. Durch *in vitro* DNA-Bindungsstudien konnte ein möglicher Zusammenhang von Oct4-Phosphorylierung und Oct4-DNA-Bindung hergestellt werden. Anhand der Ergebnisse dieser Studien ließen sich jedoch keine exakten Aussagen treffen, daher wurde zusätzlich die Oct4-DNA-Bindung *in vivo* durch Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) und Reporterstudien untersucht.

7.7.1 Oct4-DNA-Bindung während der spontanen Differenzierung

Die im EMSA Experiment verwendeten artifiziellen DNA-Motive sind optimierte Bindesequenzen für Oct4. Daher sollte mithilfe einer Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) *in vivo* untersucht werden, ob sich die Oct4-DNA-Bindung an verschiedene Zielgen-Promotoren im Verlaufe der spontanen Differenzierung veränderte.

Die Differenzierung der Zellen führte zu einer verringerten Bindung von Oct4 an die Promotorregion der Zielgene *Lefty-A* und *Fgf4*. Andere Zielgenpromotoren wie zum Beispiel *Oct4* und *Sox2* wurden hingegen unverändert stark gebunden (**Abb. 3.7.1 A**). Um die Ergebnisse der ChIP besser quantifizieren zu können, wurden die Proben mithilfe einer qRT-PCR analysiert. Dabei bestätigte sich das Oct4 in Abhängigkeit des Differenzierungszustandes unterschiedlich stark an die Promotorregion von *Lefty-A* und *Fgf4* bindet. Die Bindung an den *Sox2* Promotor blieb, wie bereits erwähnt, unverändert (**Abb. 3.7.1 B**).

Während der spontanen Differenzierung der hESCs kommt es demnach unabhängig von Oct4-Proteinmenge *in vitro* und *in vivo* zu einer verringerten DNA-Bindung von Oct4.

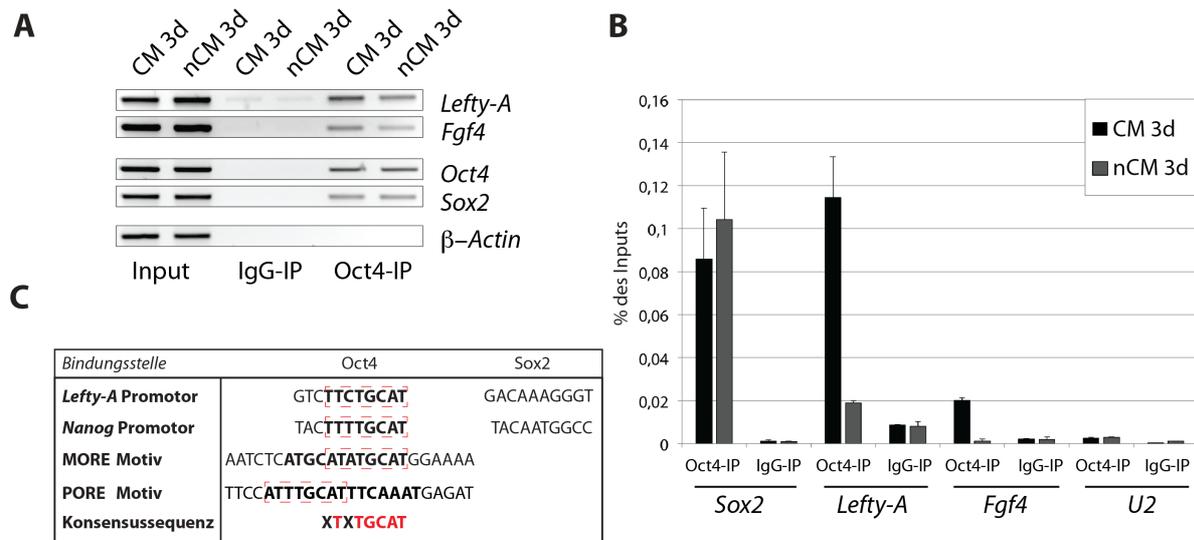


Abb. 3.7.1 Unterschiede in der Oct4-DNA-Bindung während der spontanen Differenzierung

A) Formaldehydfixiertes Chromatin von undifferenzierten (CM 3d) und differenzierenden (nCM 3d) hESCs (H9) wurde mit Antikörpern gegen Oct4 oder unspezifischem IgG (als Kontrolle) immunpräzipitiert. Die präzipitierte und aufgereinigte DNA wurde anschließend per PCR mit Primern amplifiziert, die in den Promotorregionen der angegebenen Oct4-Zielgene binden. Die Promotorregionen von β -ACTIN und *U2* dienen als Negativkontrollen. **B)** Zur besseren Quantifizierung der Ergebnisse wurde eine Real-Time PCR durchgeführt. **C)** Ein Sequenzvergleich zwischen dem künstlichen Oct4-DNA-Bindungsmotiven PORE, MORE und der Oct4-Bindungsstellen innerhalb des *Lefty-A* Promotors und des *Nanog*-Promotors zeigten einen gewissen Grad an Homologie (Konsensussequenz).

7.7.2 Unabhängige Verifizierung der EMSA Studien durch ChIP und Real-Time PCR

Zur weiteren Überprüfung der EMSA Ergebnisse wurden hESCs den entsprechenden Behandlungen unterzogen und Promotorstudien per Chromatin-Immünpräzipitation durchgeführt. Untersucht wurden dabei die bereits zuvor beschriebenen Promotorsequenzen der Oct4-Zielgene *Oct4*, *Fgf4* und *Lefty-A*. Dabei konnten für die Promotorregionen von *Oct4* und *Fgf4* keine signifikanten Unterschiede in der Bindungsaktivität von Oct4 festgestellt werden (**Abb. 3.7.2 A**). Die Anreicherung der *Fgf4*-Promotorregion war jedoch äußerst schwach, so dass eventuelle Bindungsunterschiede nicht eindeutig detektiert oder bestätigt werden konnten (**Abb. 3.7.2 A**). Im Gegensatz dazu verringerte sich die Oct4-Bindung am *Lefty-A*-Promotor im Verlaufe der Differenzierung deutlich (**Abb. 3.7.2 A, B**; CM 3d, nCM 3d). Die Stimulation der Zellen mit 8-Br-cAMP (Induktion von PKA) führte zu einer weiteren Steigerung der Oct4-Bindung am *Lefty-A*-Promotor (**Abb. 3.7.2 A, B**). Nach der Inhibierung von PKA mit H-89 wurde hingegen signifikant weniger DNA Oct4-spezifisch präzipitiert (**Abb. 3.7.2 B**). Dabei reduzierte sich die Oct4 Promotorbindung der undifferenzierten H-89

behandelten Zellen (CM 3d+H-89) auf ein den differenzierenden Zellen (nCM 3d) entsprechendes Niveau.

Zusätzlich zu den Promotorbindungsstudien wurde die Expression verschiedener Oct4-Zielgene (*Oct4*, *Nanog*, *Fgf4*, *Lefty-A*) per qRT-PCR untersucht. Wie erwartet, kam es während der frühen Phase der spontanen Differenzierung zu einer nachweisbaren Expressionsverringering verschiedener Pluripotenz-assoziiierter Oct4-Zielgene. (**Abb. 3.7.2 C**; nCM 3d, *Oct4*, *Nanog*, *Fgf4*, *Lefty-A*). Die Behandlung der Zellen mit 8-Br-cAMP und H-89 hatte keinen, beziehungsweise nur marginalen Einfluss auf die Expression der Oct4-Zielgene *Oct4*, *Nanog* und *Fgf4*. Die Expression von *Lefty-A* hingegen erhöhte sich in Abhängigkeit der 8-Br-cAMP Behandlung signifikant (**Abb. 3.7.2 C**). Wider Erwarten führte die Inhibierung der PKA Aktivität mit H-89 nicht zu einer verringerten *Lefty-A* Expression. Da sich zeitgleich die Oct4-Bindung am *Lefty-A* Promotor deutlich verringerte, ist anzunehmen, dass andere Transkriptionsfaktoren diesen Expressionsunterschied kompensatorisch auffangen.

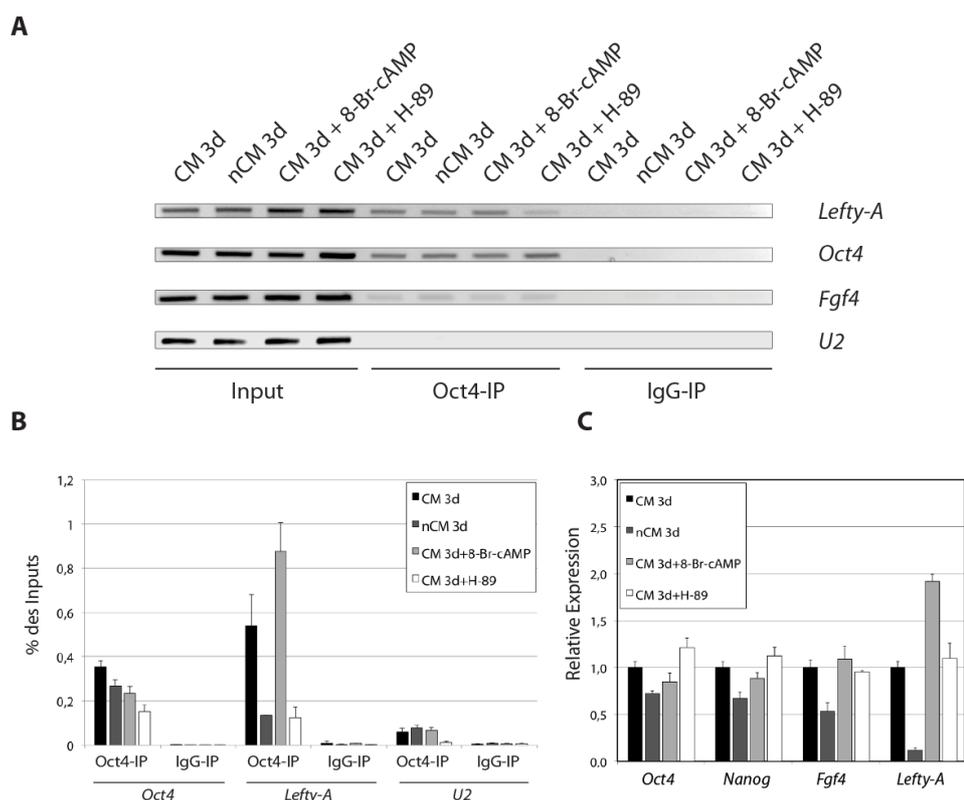


Abb. 3.7.2 Unabhängige ChIP Promotorstudien konnten teilweise die EMSA Ergebnisse bestätigen

A) Formaldehydfixiertes Chromatin von behandelten hESCs (H9) wurde mit Antikörpern gegen Oct4 oder zur Kontrolle mit unspezifischem IgG immunpräzipitiert. Nach der Aufreinigung der Proben wurde die DNA per PCR amplifiziert. Dadurch konnte eine spezifische Anreicherung der Promotorregionen verschiedener Oct4-Zielgene nachgewiesen werden. Die *U2* Promotorregion diente als Negativkontrolle. **B**) Die immunpräzipitierte DNA wurde zusätzlich per qRT-PCR analysiert. **C**) Mithilfe einer qRT-PCR wurden die Veränderungen der Genexpression nach der Behandlung der Zellen analysiert. Die qRT-PCR wurde in Duplikaten durchgeführt und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert ($MW \pm SD$) an.

7.7.3 Die Bindung von Oct4 an einen artifiziellen *Nanog*-Promotor war ebenfalls phosphorylierungsabhängig

Da die Oct4 spezifische Anreicherung der *Fgf4* Promotor-DNA äußerst ineffizient war und für ein aussagekräftiges ChIP Experiment nicht ausreichte, sollte ein weiteres Oct4-Zielgen analysiert werden. Die Oct4-Bindungsstellen im *Lefty-A* und *Nanog*-Promotor waren annähernd identisch und mit dem zuvor beschriebenen MORE-Motiv vergleichbar (**Abb. 3.7.1 C**). Die Oct4 spezifische Anreicherung der *Nanog*-Promotor DNA war für ein ChIP Experiment jedoch ebenfalls unzureichend. Aus diesem Grund wurde für weitergehende Untersuchungen am *Nanog*-Promotor ein Luziferase Reportersystem verwendet. Bei diesem System befand sich die Expression der Luziferase unter der Kontrolle eines artifiziellen *Nanog*-Promotors. Für dieses Konstrukt wurde ein spezifischer Teil der *Nanog*-Promotorregion mit der Oct4/Sox2 Transkriptionsfaktorbindungsstelle dreimal hintereinander kloniert ¹⁹⁶.

Für die Bindungsanalyse am artifiziellen *Nanog*-Promotor wurden das Wildtyp-Oct4-Protein und verschiedene Oct4-Mutanten in HeLa Zellen exprimiert und nachfolgend die Luziferaseaktivität gemessen. Zur Kontrolle der spezifischen Aktivierung des Luziferase Reporters wurde die Oct4-Kernlokalisationsmutante (hOct4 Δ NLS) verwendet. Während diese Mutante den Reporter kaum induzieren konnte, kam es nach der Transfektion des Wildtyp Oct4-Proteins zu einer starken Aktivierung des Reporters (**Abb. 3.7.3 A**). Die Verwendung der Oct4 TA und SA Einzel- und der TA/SA Doppelmutante führte hingegen zu einer signifikanten Verringerung der Reporter Aktivierung (**Abb. 3.7.3 A**). Da zuvor die Aktivierung von PKA durch Br-cAMP eine positive Wirkung auf die Oct4-DNA-Bindung hatte, wurde zusätzlich eine Phosphorylierung-imitierende Oct4 Mutante (TE/SD) untersucht. Diese Mutante führte ebenfalls zu einer verringerten Aktivierung des *Nanog*-Reporters. Die Aussagekraft dieser Mutante ist jedoch stark limitiert, da ein Aminosäureaustausch zu einem Aspartat (D) bzw. Glutamat (E) nicht in jedem Fall eine *in vivo* Phosphorylierung imitiert. Aus diesem Grund wurde sich bei nachfolgenden Experimenten auf die Oct4 Alanin Mutanten beschränkt (TA, SA, TA/SA). Für die exakte Interpretation der Ergebnisse war es von entscheidender Bedeutung vergleichbare Proteinmengen von Oct4 in den HeLa Zellen zu exprimieren. Daher wurde die Oct4-Proteinkonzentration der Gesamtzelllysate zur Kontrolle mit Oct4 und α -Tubulin spezifischen Antikörpern analysiert (**Abb. 3.7.3 B**).

Zusätzlich wurde das *Nanog*-Reportersystem verwendet, um die Auswirkungen der chemischen PKA Modulation in hESCs zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass es während der spontanen Differenzierung zu einem nachweisbaren Aktivitätsverlust des Reporters kam (**Abb. 3.7.3 C**; CM 3d-nCM 3d). Die Stimulation der Zellen mit 8-Br-cAMP führte hingegen zu einer signifikanten Aktivierung des Reporters. Des Weiteren konnte nach der

spezifischen Inhibierung des PKA Signalwegs ein deutlicher Aktivitätsverlust des Reportersystems festgestellt werden (**Abb. 3.7.3 C**, CM 3d + H-89). Es stellte sich daraufhin die Frage, ob Br-cAMP einen positiven Einfluss auf die Pluripotenz der hESCs unter differenzierenden Bedingungen (nCM 3d) hat. Die Behandlung der differenzierenden hESCs (nCM 3d) mit Br-cAMP konnte den differenzierungsbedingten Aktivitätsverlust des Reporters nur geringfügig kompensieren und hatte keinen zusätzlichen positiven Effekt auf die Oct4-DNA-Bindung (**Abb. 3.7.3 C**). Die Inhibierung von PKA in den differenzierenden hESCs hatte nahezu keine Auswirkung auf die *Nanog*-Reporteraktivität (**Abb. 3.7.3 C**, siehe vergleichend nCM3d, nCM3d+H-89).

Zur Kontrolle der chemischen Behandlungen der Zellen wurde ein cAMP-spezifischer Luziferase Reporter (CRE Luziferase) verwendet. Bei diesem Reporter steht die Luziferase-Expression unter der Kontrolle eines minimalen CMV Promotors, der in seiner Aktivität von einer CRE-Sequenz (*cAMP-response element*) abhängig ist. Die Erhöhung des zellulären cAMP Spiegels durch 8-Br-cAMP führt zu einer erhöhten PKA Aktivität und dadurch zur phosphorylierungsbedingten Aktivierung des sogenannten CREB Proteins (*cAMP response element-binding protein*). Das phosphorylierte CREB-Protein kann daraufhin an die CRE-Sequenz binden und die Transkription der Luziferase aktivieren. In HeLa Zellen wurde der *CRE*-Luziferase Reporter nach der Zugabe von 8-Br-cAMP fünfzigfach induziert und diese Aktivierung konnte durch H-89 fast vollständig verhindert werden (**Abb. 3.7.3 D**). Im Gegensatz dazu war in den hESCs die Aktivierung (8-Br-cAMP) oder Inhibierung (H-89) des *CRE*-Luciferase Reporters vergleichsweise moderat und mit den des *Nanog*-Reporters vergleichbar (**Abb. 3.7.3 E**). Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass unter den gegebenen hESC Zellkulturbedingungen der cAMP Spiegel oder respektive die PKA Aktivität stark erhöht war. Aus diesem Grund wurden HeLa Zellen mit dem *CRE*-Luziferase Reporter transfiziert und in HeLa-Medium, nicht konditioniertem (nCM) und konditioniertem (CM) hESCs-Medium kultiviert. Dabei konnte eine dreifache (nCM) bis sechszehnfache (CM) Aktivierung des Reporters im Vergleich zum HeLa Zellmedium festgestellt werden (**Abb. 3.7.3 F**). Daher ist möglicherweise die erhöhte PKA Aktivität im konditionierten hESC-Medium ein entscheidender Faktor bei der Erhaltung des pluripotenten Zustandes der hESCs.

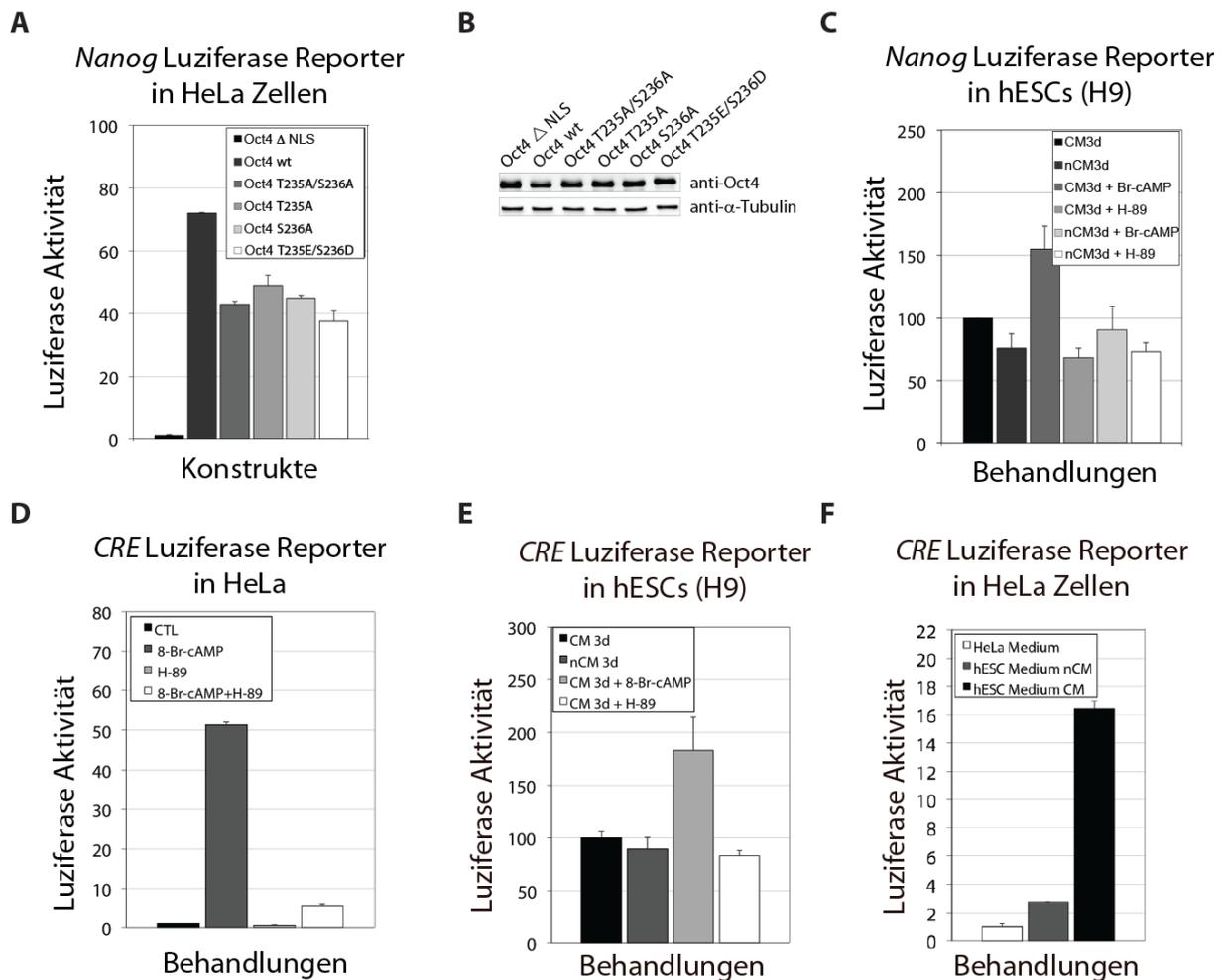


Abb. 3.7.3 Luciferase basierende Oct4-Promotorbindungsstudien nach der Modulation des PKA Signalwegs

A) Für die Promotorbindungsstudien wurden verschiedene Oct4-Konstrukte und ein artifizierlicher *Nanog* Luciferase Reporter in HeLa Zellen transfiziert und anschließend die Luciferaseaktivität gemessen. **B)** Die Proteinexpressionskontrolle des Luciferaseexperimentes aus A) erfolgte mithilfe eines Western Blots und Oct4 und α -Tubulin spezifischen Antikörpern. **C)** Humane embryonale Stammzellen wurden mit einem *Nanog* Luciferase Reporter transfiziert und mit 8-Br-cAMP und H-89 behandelt. **D-E)** Mithilfe eines cAMP abhängigen Luciferase Reporters (*CRE* Luciferase) wurde die Aktivität von 8-Br-cAMP und H-89 in HeLa Zellen bzw. hESCs kontrolliert. **E)** Ein in HeLa Zellen transfizierter *CRE*-Luciferase Reporter wurde in Abhängigkeit des verwendeten Mediums unterschiedlich stark aktiviert.

7.8 Physiologische Bedeutung der Oct4 Phosphorylierung bei der Induktion der Pluripotenz

Im Nachfolgenden sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit die Phosphorylierung von hOct4 eine physiologische Bedeutung und einen Einfluss auf die Induktion der Pluripotenz hat. Im Verlauf dieser Promotion konnte die Induktion der Pluripotenz in somatischen Zellen der Maus etabliert werden. Dafür wurden embryonale Fibroblasten der Maus mit einem Transkriptionsfaktorengemisch aus Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc transduziert. Die exogene Expression dieser Transkriptionsfaktoren führte zur Induktion

der endogenen Pluripotenz-Faktoren Oct4, Sox2 und Nanog und zur Reprogrammierung der Fibroblasten in induzierte pluripotente Stammzellen. Die Übertragung dieses Protokolls auf das humane System war bisher nicht möglich und wird derzeit weiter optimiert. Aus diesem Grund wurde bei der Induktion der Pluripotenz das murine Oct4 gegen das humane Oct4 ersetzt. Ziel dieses Versuches war es zu analysieren, ob die Modulation des PKA-Phosphorylierungsmotives im Modellsystem der Reprogrammierung die molekulare Aktivität von Oct4 beeinflusst.

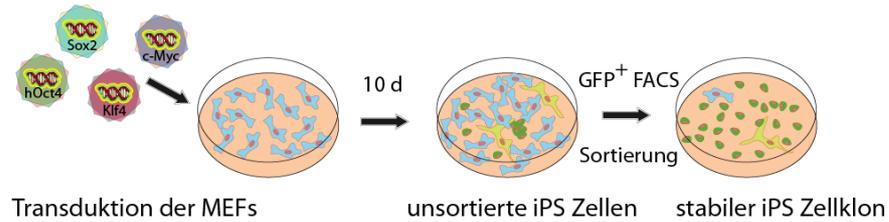
7.8.1 Das humane Oct4 kann während des Reprogrammierungsprozesses das murine Oct4 ersetzen

Bei diesem Experiment wurde ein leicht modifiziertes Standardprotokoll zur iPS Gewinnung eingesetzt⁷⁰. Dabei wurden für die Induktion der Pluripotenz die murinen Faktoren Sox2, Klf4 und c-Myc in Kombination mit humanem Oct4 verwendet. Nach Infektion von Fibroblasten der Oct4-GFP-Reportermauszelllinie wurden die Zellen für zehn Tage kultiviert²¹⁵. Bei dieser Reporterzelllinie steht die GFP-Expression unter der Kontrolle des endogenen *Oct4*-Promotors. Nach der Transduktion der vier Pluripotenzfaktoren kam es in einigen wenigen Zellen zur Aktivierung des endogenen *Oct4*-Promotors und somit zur GFP-Expression. Mithilfe der Durchflusszytometrischen Sortierung (FACS) wurde daher aus dem Pool der induzierten Zellen die GFP-exprimierenden Zellen extrahiert und weiter kultiviert. Auf diesem Wege konnte eine stabile GFP-positive iPS Zelllinie etabliert werden. In der Abbildung **3.8.1 A** ist der Ablauf des Experiments vereinfacht graphisch dargestellt.

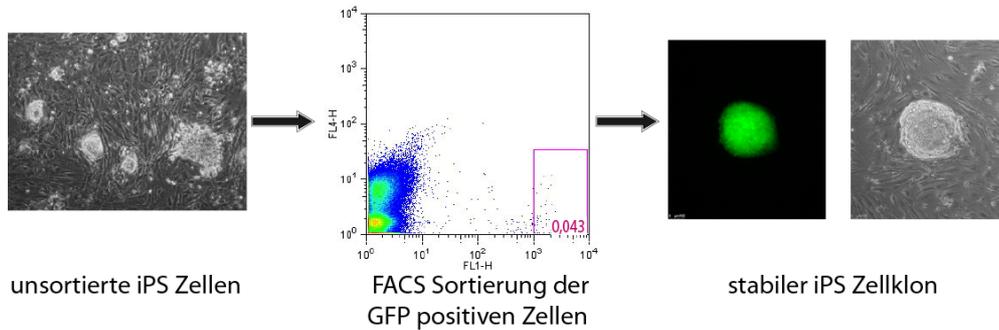
Aus den induzierten Zellen entwickelte sich innerhalb von 7 Tagen eine heterogene Mischkultur, in welcher einige Zellen eine stammzellähnliche Morphologie annahmen (**Abb. 3.8.1 B**). Einige dieser Kolonien waren zudem GFP-positiv und konnten durchflusszytometrisch von GFP-negativen Zellen getrennt werden. Dieser experimentelle Ablauf ermöglichte es unter Verwendung des humanen Oct4-Expressionskonstrukts eine GFP-positive iPS Zelllinie mit einer mESC typischen Morphologie zu etablieren (**Abb. 3.8.1 B**). Die Reprogrammierungseffizienz von 0.043 % entsprach dabei in etwa der publizierten Effizienz der Reprogrammierung mit mOct4 von 0.1 %⁶³. Anschließend wurde diese miPS Zelllinie (miPS hOct4) mithilfe einer qRT-PCR auf die Expression verschiedener Pluripotenz-assoziiierter Gene untersucht und mit einer „bona fides“ mESC Zelllinie, miPS Zelllinie (miPS mOct4) und mausembryonalen Fibroblasten (MEF) verglichen. Dabei zeigte sich für die iPS Zelllinien (miPS mOct4, miPS hOct4) und für die mESC Zelllinie ein annähernd identisches Genexpressionsprofil verschiedener Pluripotenz Gene (Oct4, Nanog, E-cad, Nr5a2). Diese Gene waren erwartungsgemäß nicht in den

MEFs exprimiert, welche den Ausgangspunkt für die Induktion der Pluripotenz darstellten (**Abb. 3.8.1 C**). Als Marker für bereits differenzierte Zellen wurde N-Cadherin (N-Cad) verwendet. Dementsprechend hoch war die N-Cad Expression in terminal differenzierten Fibroblasten (MEF) (**Abb. 3.8.1 C**). Die leicht erhöhte N-Cad Menge der miPS Proben mit dem humanem Oct4 kann auf verbliebene MEF Zellen aus dem Reprogrammierungsvorgang zurückgeführt werden.

A



B



C

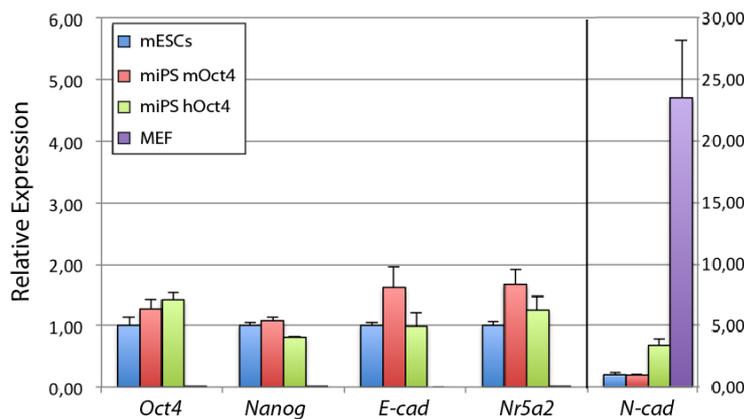


Abb. 3.8.1 Das humane Oct4 konnte bei dem Reprogrammierungsprozess der Fibroblasten zu iPS Zellen das murine Oct4 ersetzen

A) Eine schematische Darstellung fasst den Verlauf des Reprogrammierungsexperiments zusammen. **B)** Im Verlaufe der Induktion der Pluripotenz entsteht eine Mischkultur aus Zellen die sich in verschiedenen Phasen des Reprogrammierungsprozesses befinden. Anhand morphologischer Kriterien und der GFP Expression konnten verschiedene stabile miPS Zellen auf Basis des hOct4 erzeugt werden. **C)** Mithilfe einer qRT-PCR wurde in den iPS Zellen die Expression verschiedener Pluripotenz-assoziiierter Gene im Vergleich zu anderen pluripotenten oder differenzierten Zelllinien analysiert.

7.8.2 Mutationen des Oct4-Phosphorylierungsmotives beeinflussen die Induktion von Pluripotenz negativ

Basierend auf dem zuvor beschriebenen Experiment zur Herstellung von iPS Zellen wurden verschiedene Oct4-Mutanten für Reprogrammierungsstudien eingesetzt. Dafür wurden in das Phosphorylierungsmotiv entweder verschiedene Einzelmutationen (hOct4 T235A, hOct4 S236A) oder eine Doppelmutation (hOct4 T235A/S236A) eingeführt. Als Negativkontrolle wurde eine Kernlokalisationsmutante von Oct4 (hOct4 Δ NLS) verwendet (**Abb. 3.8.2 A**). Die Virenüberstände der einzelnen Mutanten wurden getrennt voneinander mit den Virusüberständen von Sox2, Klf4 und c-Myc gemischt und zur iPS Induktion eingesetzt. Bei diesem Versuch war es von entscheidender Bedeutung, dass die infizierten Zellen vergleichbare Proteinmengen der jeweiligen Oct4-Mutanten exprimierten. Aus diesem Grund wurden die Virustiter der verschiedenen Oct4-Konstrukte bestimmt und der Messung entsprechend angeglichen. Danach wurden MEFs mit vergleichbaren Virustitern infiziert und anschließend per Immunoblot analysiert. Dabei konnte eine gleichmäßige Oct4-Proteinexpression nachgewiesen werden (**Abb. 3.8.2 B**). Zur Ladekontrolle wurde ein α -Tubulin spezifischer Antikörper benutzt. Die Bestimmung der Virustiter der anderen Faktoren (Sox2, Klf4 und c-Myc) waren in diesem Zusammenhang nicht nötig, da diese Virenüberstände zu gleichen Teilen vermischt wurden. Von dieser Mischung wurden anschließend gleiche Volumina mit den einzelnen Oct4-Viren vermengt und für die Transduktion eingesetzt. Erwartungsgemäß konnten mit dem Wildtyp Oct4-Protein GFP-positive Kolonien mit Stammzellmorphologie generiert werden. Die Reprogrammierungsrate wurde anhand der GFP-positiven Zellen bestimmt und war mit der Effizienz aus dem Experiment unter 3.8.1 vergleichbar. Die Kernlokalisationsmutante (hOct4 Δ NLS) in Verbindung mit Sox2, Klf4 und c-Myc konnte hingegen den Reprogrammierungsprozess nicht in Gang setzen. Bei diesem Experiment wurden, mit Ausnahme weniger toter autofluoreszierender Zellen, keine GFP-positiven Zellen detektiert (**Abb. 3.8.2 C**). Des Weiteren konnten erstaunlicherweise weder mit der Doppelmutante noch mit den Einzelmutanten stabile GFP-positive iPS Zellen erzeugt werden. Das FACS-Profil der Doppelmutante (hOct4 T235A/S236A) entsprach dabei annähernd dem Profil der Kernlokalisationsmutante (hOct4 Δ NLS). Bei den Einzelmutanten konnten vereinzelt schwach GFP-positive Zellen detektiert werden, die jedoch nicht weiter kultiviert werden konnten (**Abb. 3.8.2 C**). Da alle GFP-basierenden Analysen dem iPS Standardprotokoll entsprachen und 10 Tage nach der Infektion durchgeführt wurden, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Mutationen des Phosphorylierungsmotives nur eine zeitliche Verschiebung des Reprogrammierungsprozesses hervorriefen. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass

Mutationen im beschriebenen Oct4-Phosphorylierungsmotiv einen entscheidenden Einfluss auf die Erzeugung von pluripotenten Stammzellen hatten.

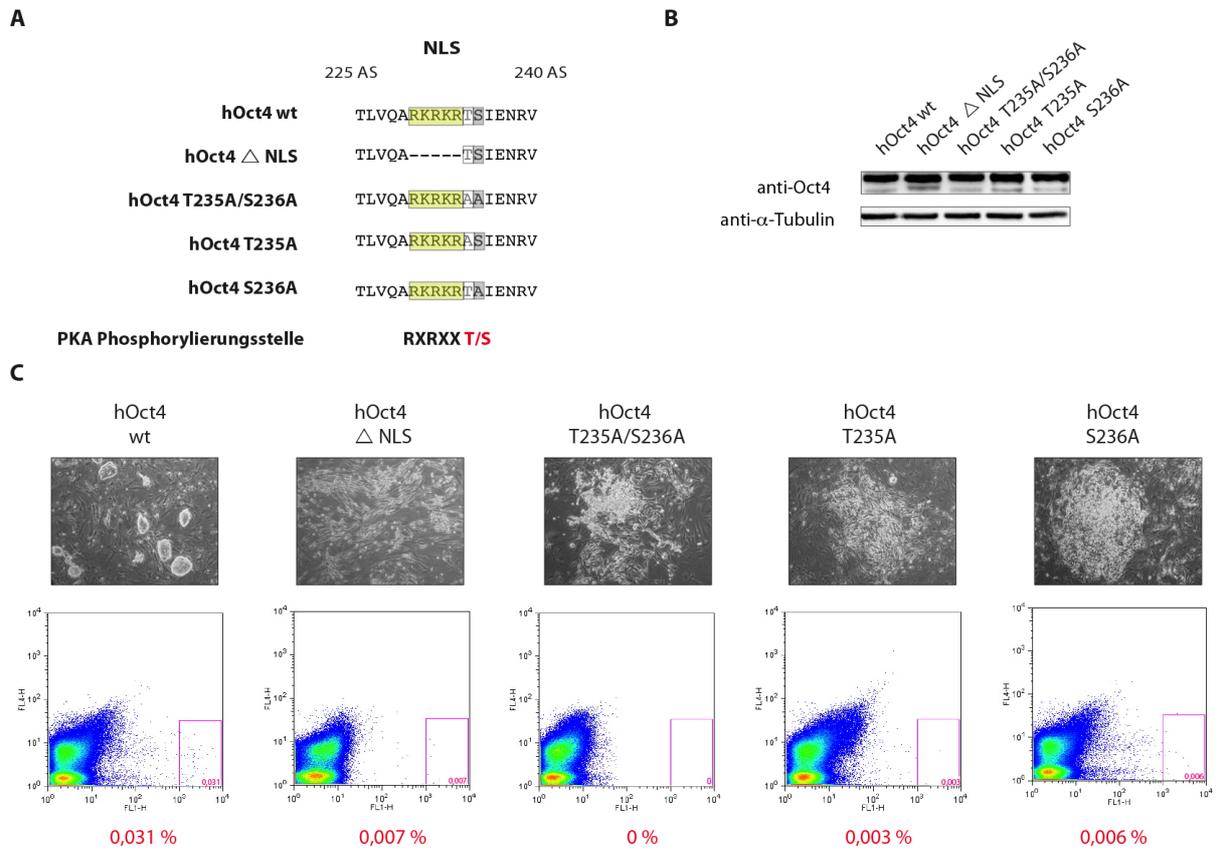


Abb. 3.8.2 Die Reprogrammierung der mausembryonalen Fibroblasten (MEF) zu iPS Zellen war mit den Oct4 Mutanten nicht möglich

A) Die für die Reprogrammierungsstudien eingesetzten Oct4-Konstrukte wurden aufgelistet. Hervorgehoben dargestellt wurde das Kernlokalisierungssignal (NLS) und die potentielle Phosphorylierungsstelle mit den eingeführten Mutationen. **B)** Mithilfe der spezifischen Antikörper gegen Oct4 und α -Tubulin wurde die Proteinexpression von den Oct4-Mutanten überprüft. **C)** Phasenkontrastbilder zeigen die morphologischen Veränderungen der induzierten Zellen 10 Tage nach der Transduktion. GFP-positive Zellen wurden fast ausschließlich bei der Reprogrammierung mit Wildtyp Oct4 detektiert.

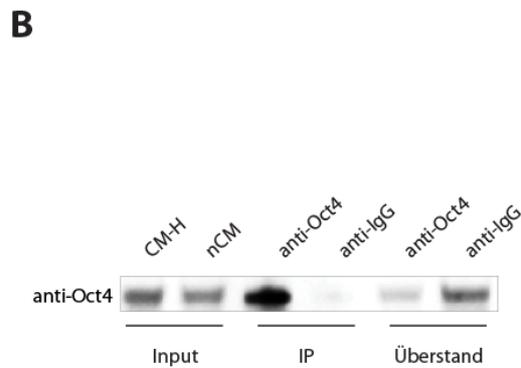
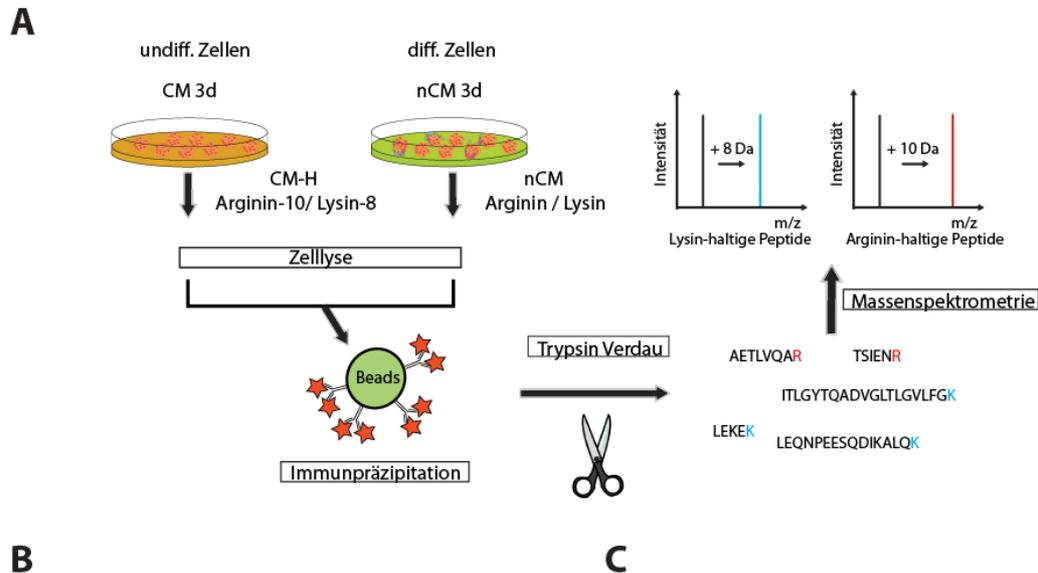
7.9 Weiterführende Versuche und vorläufige Ergebnisse

7.9.1 Metabolische Markierung (SILAC) der hESCs zur anschließenden Phosphoprotein Analyse

Zur Verifizierung der bisherigen Ergebnisse wurden hESCs durch den metabolischen Einbau von „schweren“ Aminosäuren markiert und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Durch den Einbau verschieden markierter Aminosäuren kann das Proteom samt der posttranslationalen Modifikationen zweier unabhängiger Zellpopulationen in verschiedenen Differenzierungszuständen mit einander verglichen werden. Ziel dieses Experiments war es die Phosphorylierung von Oct4 massenspektrometrisch zu untersuchen und einen differenzierungsabhängigen Unterschied der Oct4 Phosphorylierung in den hESCs nachzuweisen.

Dafür wurden undifferenzierte Zellen (CM 3d) und differenzierende Zellen (nCM 3d) in Medium mit schweren Aminosäuren beziehungsweise mit den natürlichen Aminosäuren kultiviert. Anschließend wurden die Zelllysate vereinigt und Oct4 durch eine Immunpräzipitation angereichert. Nachfolgend wurden die Proben tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert²⁰⁹. Der Ablauf des Experiments wurde vereinfacht in der Abbildung **3.9.1 A** zusammengefasst.

Ein entscheidender Faktor bei dem SILAC Experiment war eine hohe Markierungsrate der Zellen mit den schweren Isotopen. Es zeigte sich, dass nach 5 Passagen nahezu alle Zellen markiert waren (97%). Die effektive und spezifische Anreicherung von Oct4 war ebenfalls Voraussetzung für die Durchführung des Experiments. Durch eine Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern konnte Oct4 im Vergleich zur IgG Kontrolle um einen Faktor 250 angereichert werden (**Abb. 3.9.1 B**). Bei der anschließenden Analyse der Proben im Massenspektrometer wurden von den sechzehn möglichen Oct4-Peptiden neun identifiziert (**Abb. 3.9.1 C**). Das Peptid mit der potentiellen Phosphorylierungsstellen wurde dabei nicht detektiert (**Abb. 3.9.1 C AS 235-240**). Auch andere phosphorylierte Oct4-Peptide konnten nicht gefunden werden. Da in sämtlichen Proben insgesamt nur 15 phosphorylierte Peptide verschiedener Proteine nachgewiesen werden konnten, ist anzunehmen, dass die Aufreinigung der Proben zu einem massiven Verlust der proteingebundenen Phosphatgruppen führte. Für nachfolgende massenspektrometrische Versuche müssen daher die experimentellen Abläufe der Probenaufbereitung verbessert und zeitlich optimiert werden. Des Weiteren muss die Menge der Phosphopeptide vorab über eine Phosphopeptidanreicherung (Titanium Dioxid, PhosphoCatch) erhöht werden.



C

Aminosäure	Peptid	identifiziert
1-33	MAGHLASDFAFSPPPGGGGDGGPPEPGWVDPR	+
34-123	TWLSFQPPGGPGIGPGVPGSEVWGIPPCPPPY EFCGGMAYCGPQVGVGLVPQGGLETSQPEGEAG VGVESNSDASPEPCTVTPGAVK	-
129-140	LEQNPEESQDIK	-
145-151	ELEQFAK	+
158-177	ITLGYTQADVGLTLGLVLF GK	-
178-186	VFSQTTICR	+
187-195	FEALQLSFK	+
200-206	LRPLLQK	+
207-222	WVEEADNNENLQEICK	+
223-230	AETLVQAR	+
235-240	TSIENR	-
243-254	GNLENLFLQCPK	+
255-271	PTLQQISHIAQQLGLEK	+
276-281	VWFCNR	-
288-295	SSSDYAQR	-
296-360	EDFEAAGSPFSGGPVSFPLAPGPHFGTPGYGSPHFIAL YSSVPPFEGEAFPPVSVTLTGSPMHSN	-

Abb. 3.9.1 Mehrere Oct4 Peptide konnten mithilfe des SILAC/Massenspektrometrie Experiments nachgewiesen werden

A) Übersichtsartige Zusammenfassung des SILAC Experiments mit anschließender Massenspektrometrie. **B)** Die Anreicherung von Oct4 erfolgte über eine Immunpräzipitation. Dargestellt sind die Proben vor (Input) und nach (Überstand) der Immunpräzipitation sowie die immunpräzipitierten Proteine (IP). Die Präzipitation wurde mit Oct4-spezifischen Antikörpern (anti-Oct4) und einen unspezifischen Antikörper (anti-IgG) durchgeführt. Der Nachweis des präzipitierten Oct4 erfolgte durch einen Oct4 Antikörper. **C)** Tabellarisch wurden die nach dem Trypsinverdau möglichen Oct4-Peptide zusammengefasst. Die detektierten Oct4-Peptide wurden mit einem Plus (+) markiert. Die rote Markierung hebt die Peptidsequenz der beschriebenen Oct4-Phosphorylierungsstelle hervor.

7.9.2 Weitere posttranslationale Modifikationen von Oct4 wahrscheinlich

Im Zuge der Mutationsstudien des PKA-Phosphorylierungsmotives wurden weitere Punktmutanten von Oct4 erzeugt. Diese Oct4-Mutanten wurden anschließend mithilfe des artifiziellen *Nanog* Luziferase-Reporters auf Aktivierungsunterschiede untersucht. Dabei fiel die Aktivierung des Luziferase-Reporters bei der C-terminalen Oct4-Mutante S359A besonders stark ab. Interessanterweise wurde diese Aminosäure während der bioinformatischen Analyse als potentiell Phosphorylierungsmotiv von Gsk3 β und ERK identifiziert (siehe **Abb. 3.3 B**). *In vitro* Kinase Experimente bestätigten, dass Gsk3 β und ERK in der Lage waren den C-Terminus von Oct4 zu phosphorylieren (**Abb. 3.4 B**). Des Weiteren führte die Mutation des Serin 359 von Oct4 zu einem deutlichen Expressionsunterschied bzw. Stabilitätsverlust des Proteins (**Abb. 3.9.2 A**). Um mit dem Wildtyp Oct4 vergleichbare Proteinmengen in der Zelle zu exprimieren, musste in etwa zehnmal mehr DNA der Oct4-Mutante transfiziert werden (**Abb. 3.9.2 B**). Nach der Behandlung der Zellen mit dem Proteinbiosynthese-Hemmer Cyclohexamid bekräftigte sich die Annahme, dass eine phosphorylierungsbedingte Veränderung des Serin 359 die Stabilität von Oct4 beeinflusst (**Abb. 3.9.2 B**). Interessanterweise konnte die S359A Mutante, selbst mit angeglichenen Proteinmengen, den Luziferase Reporter nur deutlich vermindert aktivieren (**Abb. 3.9.2 C**; um einen Faktor 4 verringerte Aktivierung). Daher ist es möglich, dass die Mutation S359A neben der Stabilität und Expression auch die DNA-Bindung des Proteins beeinflusst. In Bezug auf die Kern-/Zytoplasma-Lokalisation des Proteins konnten per Immunfluoreszenzmikroskopie keine Unterschiede zum Wildtyp Oct4-Protein festgestellt werden (**Abb. 3.9.2 D**).

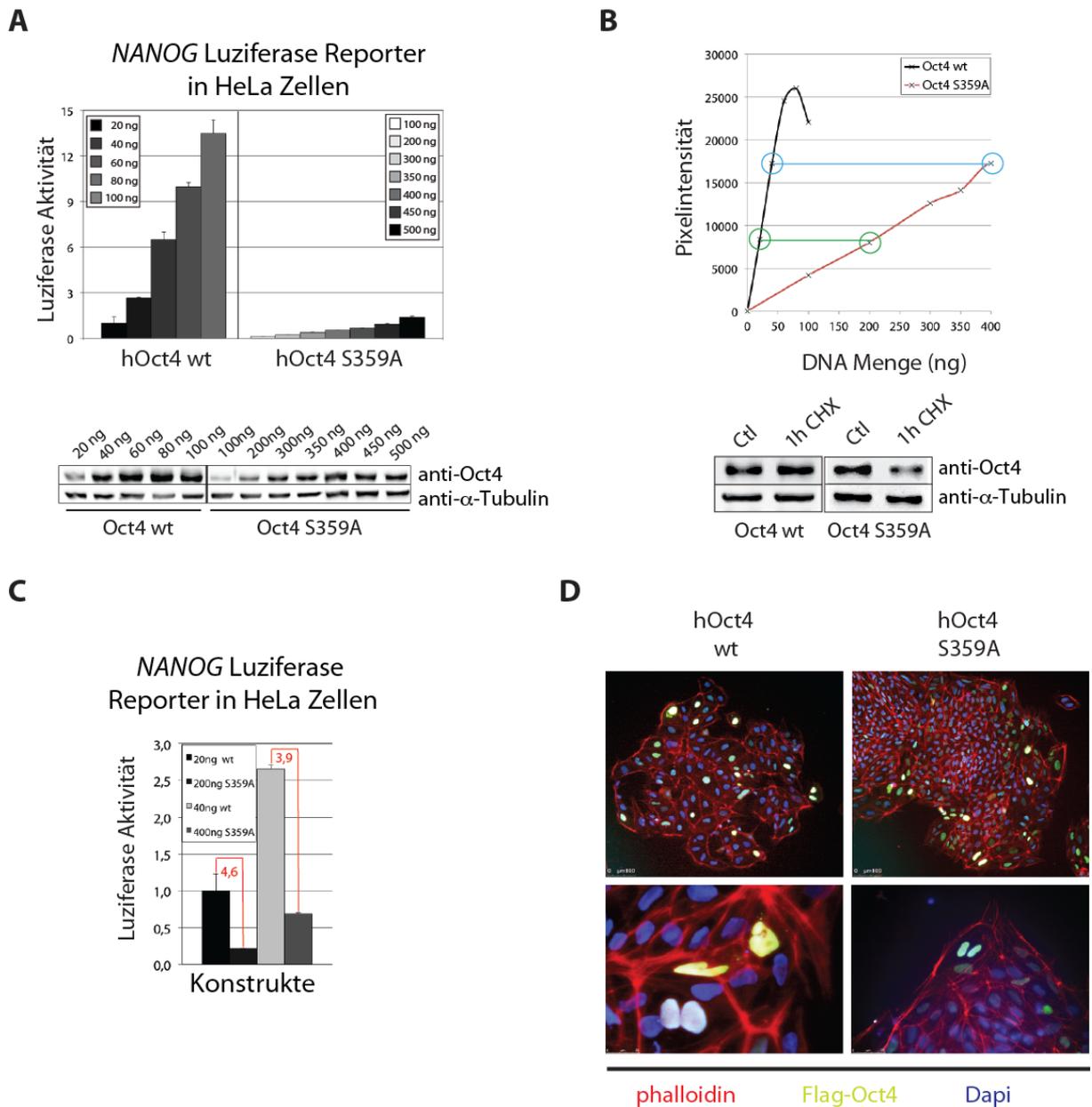


Abb. 3.9.2 Hinweise auf weitere Modifikationen des Oct4-Proteins an der C-terminalen Domäne

A) Der *Nanog* Luziferase Reporter wurde durch die Oct4-Mutante S359A deutlich weniger aktiviert. Die Proteinexpression der Mutante fiel deutlich gegenüber der Expressions des Wildtyp Oct4-Proteins ab. **B)** Densitometrische Messung der Proteinbandenintensitäten verdeutlichten, dass in etwa zehnmal mehr der Oct4-Mutante S359A transfiziert werden musste, um eine Wildtyp Oct4 vergleichbare Proteinexpression zu erreichen. Nach der Anpassung der DNA/Proteinmenge wurden die Zellen für eine Stunde mit dem Proteinbiosynthese-Hemmer Cyclohexamid (CHX) behandelt. **C)** Die Aktivierung des *Nanog* Luziferase Reporter durch die Oct4-Mutante S359A war in etwa vierfach geringer als durch das Wildtyp Oct4-Protein. **D)** Die Oct4 Mutation S359A hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins in der Zelle.

8 Diskussion

Pluripotente embryonale Stammzellen können sich in alle funktionellen Zelltypen des Organismus entwickeln und sind daher von großem Interesse im Bereich der regenerativen Medizin sowie bei der Erforschung der frühen Embryogenese. Um den therapeutischen Einsatz dieser Zellen zu ermöglichen, ist es von entscheidender Bedeutung, die molekularen Mechanismen der Pluripotenz und der Differenzierung zu verstehen. Die Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog bilden das Zentrum des transkriptionellen Netzwerkes der pluripotenten Stammzellen und regulieren die Expression verschiedener Pluripotenz- und differenzierungsassoziierter Zielgene. Der genaue Regulationsmechanismus dieser bivalenten Genexpression ist bisher noch nicht vollends aufgeklärt, man vermutet jedoch, dass die Aktivität der zentralen Transkriptionsfaktoren zusätzlich durch weitere Kofaktoren und posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden ¹¹³.

In der vorliegenden Arbeit habe ich den humanen POU-Transkriptionsfaktor Oct4, als Teil des zentralen Transkriptionsfaktorkomplexes, auf potentielle posttranslationale Modifikationen untersucht. Für die Familie der POU-Transkriptionsfaktoren wurden bereits verschiedene posttranslationale Modifikationen beschrieben ¹⁵². Eine der am häufigsten auftretenden Modifikationen dabei ist die Proteinphosphorylierung ^{170, 175-178}. Aus diesem Grund lag der Fokus dieser Arbeit auf der Analyse einer möglichen Phosphorylierung des humanen Oct4-Proteins. Im Verlaufe dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die Oct4-Proteinmenge im Verlaufe der spontanen Differenzierung über drei Tage stabil war. Parallel dazu kam es jedoch zu differenzierungsassozierten morphologischen und molekularen Veränderungen der hESCs. Des Weiteren konnte ich zeigen, dass Oct4 von der Proteinkinase A phosphoryliert wird und dass es während der frühen Phase der spontanen Differenzierung zu einer Veränderung des Oct4-Phosphorylierungszustandes kommt. Als mögliche Konsequenz der Oct4-Proteinphosphorylierung konnte ich eine veränderte Oct4-DNA-Bindungsaktivität und Proteinstabilität nachweisen. Zur Analyse der physiologischen Relevanz der beschriebenen Oct4-Phosphorylierung habe ich Reprogrammierungsstudien durchgeführt. Dabei konnte ich einen entscheidenden Einfluss der Oct4-Phosphorylierung auf die Induktion der Pluripotenz in somatischen Zellen feststellen.

8.1 Oct4-Phosphorylierungsunterschiede während der spontanen Differenzierung

Als allgemein gültiges Merkmal für differenzierende Stammzellen gilt der Expressionsverlust der zentralen Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog. Des Weiteren ist bekannt, dass die 50% Erhöhung oder Verringerung der Oct4-Expression zur Differenzierung der Stammzellen in primitives Endoderm oder Mesoderm bzw. Trophektoderm führt ²¹⁶⁻²¹⁸. Im Verlaufe dieser Arbeit zeigte sich, dass die Oct4-Expression in der frühen Phase der spontanen Differenzierung erst nach 5 Tagen um 50% reduziert war, während differenzierungsassoziierte morphologische und molekulare Veränderungen der Stammzellen bereits einen Tag nach Beginn der Differenzierung festgestellt werden konnten. Diese Beobachtung konnte in verschiedenen Stammzelllinien bestätigt werden (**Abb. 3.1**). Daher wurde vermutet, dass unabhängig von der Oct4-Gesamtproteinmenge eine Änderung des Oct4-Phosphorylierungszustandes die beschriebenen Veränderungen bedingen, und dass es sich dabei um einen generellen Regulationsmechanismus der Pluripotenz in humanen embryonalen Stammzellen handelt. Da keine Oct4 phosphorylierungsspezifische Antikörper existieren und eine Trennung anhand von phosphorylierungsbedingter Molekulargewichtsunterschieden nicht möglich war, wurde zum Nachweis einer potentiellen Phosphorylierung die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DG) gewählt. Dabei zeigte sich ein für phosphorylierte Proteine typisches Proteinverteilungsmuster für Oct4 in Form sogenannter „*phosphorylation trains*“ (**Abb.3.2 A**) ^{211, 219, 220}. Die einzelnen Proteinsignale lassen sich auf die unphosphorylierte Proteinform bzw. auf multiple Proteinphosphorylierungen zurückführen ²¹¹. Eine ähnliche Proteinverteilung konnte auch mit Flag-markiertem Oct4-Protein unter Verwendung von Flag-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden, so dass Antikörper bedingte Artefaktsignale ausgeschlossen werden konnten.

Da mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese drei distinkte Proteinsignale detektiert wurden, ist zu vermuten, dass Oct4 in den humanen embryonalen Stammzellen in mindestens drei unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen vorliegt. Dieses Ergebnis deckt sich mit bereits publizierten Daten über verschiedene Phosphorylierungen des murinen und humanen Oct4 an der N-terminalen und C-terminalen Transaktivierungsdomäne sowie der DNA-Bindungsdomäne ^{170, 180, 181}. Wie bereits oben erwähnt, ändert sich das Oct4-Phosphorylierungsprofil während der spontanen Differenzierung parallel zu differenzierungsassoziierten Veränderungen der Stammzellen, was zu der Vermutung führte, dass die Oct4-Phosphorylierung die Funktion des Proteins beeinflussen könnte (**Abb.3.2 A**).

Durch die Behandlung der Stammzelllysate mit einer Protein Phosphatase konnte bestätigt werden, dass es sich bei den beschriebenen Oct4-Modifikationen um Phosphorylierungen handelte (**Abb. 3.2 B**). Diese Methode ist ein gängiges Nachweisverfahren von Proteinphosphorylierungen, bei dem unbehandelte Zelllysate mit Phosphatase-behandelten Zelllysaten, nach der Auftrennung durch die 2-DG, verglichen werden ²²¹. Als weitere Modifikationen von Oct4 sind Ubiquitinierung, SUMOlyierung bekannt ¹⁸²⁻¹⁸⁵. Diese posttranslationalen Modifikationen führen jedoch zu einer deutlichen Erhöhung des Molekulargewichts von Oct4 und können somit als potentielle Quelle für die drei distinkten Oct4-Proteinsignale in der 2-DG ausgeschlossen werden. Auch die diversen Oct4-Isoformen können als Grund für das beschriebene Oct4-Proteinverteilungsmuster ausgeschlossen werden ¹⁶⁶. Aufgrund ihrer verkürzten Aminosäuresequenzen würden sich die einzelnen Isoformen sowohl im Molekulargewicht als auch durch ihre individuellen isoelektrischen Punkte vom Stammzellen-spezifischen Oct4 unterscheiden.

8.2 Der POU-Transkriptionsfaktor Oct4 ist ein Phosphoprotein

Die bioinformatische Analyse der Oct4-Aminosäuresequenz ergab, dass Oct4 potenziell als Substrat für verschiedene Kinasen fungieren kann (**Abb. 3.3 B**). Mit *in vitro* Kinase Experimenten konnte bestätigt werden, dass Oct4 unter anderem von AKT, PKA, Gsk3 β und ERK2 phosphoryliert wurde (**Abb. 3.4**). In Übereinstimmung mit den Daten der bioinformatischen Analyse konnte gezeigt werden, dass PKA und AKT hauptsächlich die DNA-Bindungsdomäne phosphorylieren während Gsk3 β und ERK2 ausschließlich die N- und C-terminale Transaktivierungsdomäne phosphorylieren. Die PKA-vermittelte Phosphorylierung der DNA-Bindungsdomäne war besonders stark ausgeprägt und daher von übergeordnetem Interesse (**Abb. 3.4**). Wie bereits zuvor erwähnt, enthält die DNA-Bindungsdomäne ein Kern-Lokalisations-Signal gefolgt von einer hoch konservierten potenziellen PKA-Phosphorylierungsstelle (**Abb. 3.3 C**). Interessanterweise scheint diese PKA-Phosphorylierungsstelle ein generelles Phosphorylierungsmotiv der POU-Transkriptionsfaktorfamilie zu sein. So konnte bereits gezeigt werden, dass *in vitro* PKA die POU-Transkriptionsfaktoren Pit-1, Oct1 und Brn2 phosphoryliert und das ein gezielter Austausch der auf das Kern-Lokalisations-Signal folgenden Aminosäuren Threonin, Serin (RKRKRTS) zu Alanin (RKRKRAA) diese Phosphorylierung unterbindet ^{158, 176, 187}. Des Weiteren konnten diese Studien nachweisen, dass die chemische Aktivierung von PKA zu einer vermehrten Phosphorylierung der POU-DNA-Bindungsdomäne führte ¹⁷⁶. Eine Stress induziert Phosphorylierung des PKA-Motives ist für Oct1 und Oct4 ebenfalls bekannt ¹⁴⁷. Durch eine massenspektrometrische Analyse von bakteriell exprimierten und

PKA behandelten Brn2 Proteinproben konnte das Serin als Hauptmotiv für die Phosphorylierung identifiziert werden¹⁵⁸. Ähnlich der bereits publizierten Daten führte die chemische Aktivierung von PKA durch Br-cAMP zu einer erhöhten Menge des hyperphosphorylierten Oct4 während die Inhibierung von PKA ein gegensätzliches Ergebnis zeigte (**Abb. 3.5 A**). Mithilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese und unter Verwendung verschiedener Oct4-Mutanten konnte die Veränderung des Oct4-Phosphorylierungsprofils partiell auf die potentiellen PKA-Phosphorylierungsstelle zurückgeführt werden (**Abb. 3.5 C, D**). Da aber bei der Oct4-Doppelmutante TA/SA sowohl in den HeLa Zellen als auch in den hESCs noch hypophosphoryliertes Oct4 nachweisbar war, ist anzunehmen, dass Oct4 von weiteren Kinasen phosphoryliert werden kann. Die dafür in Frage kommenden Kinasen wurden bereits durch die *in vitro* Kinase Experimente (AKT, ERK2 und Gsk3 β) beschrieben. Zusätzlich konnte bereits gezeigt werden, dass andere Transkriptionsfaktoren der POU-Familie von weiteren Kinasen (JUN Kinase, DNA-PK, PKC) phosphoryliert werden, unter anderem an dem hier diskutierten PKA-Motiv^{176, 222, 223}.

Ähnlich wie für Oct1 beschrieben, scheint Oct4 ein Phosphoprotein zu sein, das von multiplen Kinasen und Phosphatasen in seiner Funktion reguliert wird^{170, 224}. Diese Vermutung wird durch neuere Studien untermauert, in denen die Phosphorylierung von Oct4 in hESC nachgewiesen wurde^{180, 189, 190}. Interessanterweise bestätigen zwei dieser Publikation, dass Oct4 in undifferenzierten hESC an dem, in dieser Dissertation untersuchten, PKA-Motiv phosphoryliert wird^{189, 190}. Mit dem SILAC Experiment sollte die beschriebene Phosphorylierung von Oct4 bestätigt und ein möglicher differenzierungsabhängiger Unterschied der Oct4-Phosphorylierung in den hESCs untersucht werden. Obwohl das Oct4-Protein nachgewiesen werden konnte, war die Anreicherung von phosphorylierten Peptiden äußerst gering (siehe **3.9.1**). Daher müssen diese Experimente weiter optimiert werden.

Für Oct1 ist eine Zellzyklus abhängige Phosphorylierung des PKA-Motivs bekannt^{187, 224}. Da während dieser Arbeit die Zellen nicht synchronisiert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Oct4 einer ähnlichen Regulation unterliegt. Interessanterweise hatte die Zellzyklus abhängige Kinase Aurora-A ebenfalls eine gewisse Spezifität zu dem PKA-Phosphorylierungsmotiv (**Abb. 3.3 B**).

Scheinbar hat die Struktur des Proteins *in vivo* einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Oct4 in den HeLa Zellen (**Abb. 3.5 F**). Es konnte nur in Verbindung mit der N-terminalen Domäne ein dem Wildtypprotein ähnliches Verteilungsmuster von Oct4 in der 2-DG festgestellt werden. Man kann spekulieren, dass die Deletionsmutanten der N- und C-terminalen Transaktivierungsdomänen zu einer umfassenden strukturelle Veränderung von Oct4 führen, wodurch eventuell Phosphorylierungsmotive maskiert werden. Es war jedoch schwierig, eine exakte Aussage bezüglich der Phosphorylierungszustände zu treffen, da sich bei den verkürzten Oct4-Proteinen der isoelektrische Punkt stark veränderte. Somit ist die Aussage bezüglich der strukturellen Veränderung von Oct4 spekulativ und wurde im Verlaufe dieser Dissertation nicht weiter verfolgt.

Die Unterschiede im Oct4-Phosphorylierungsprofil zwischen den HeLa Zellen und den hESC lassen sich vermutlich auf zelltypspezifische Abweichungen in der Expression und Aktivität der Kinasen zurückführen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die C-terminale Transaktivierungsdomäne von Oct4 abhängig vom Zelltypen phosphoryliert wird¹⁷⁰. Eine Analyse der Oct4-Einzelmutanten in den hESCs war aufgrund der geringen Transfektionseffizienz (10%) der Zellen und den daraus resultierenden Probleme bei der 2-DG äußerst schwierig.

8.3 Die Funktion der Oct4-Phosphorylierung

Posttranslationale Modifikationen ist ein weit verbreiteter zellulärer Mechanismus, um die Aktivität von Proteinen zu regulieren. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen ist dabei einer der häufigsten zellulären Regulationsmechanismen, wodurch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren im Zuge verschiedener extra- und intrazellulärer Signale verändert werden kann²²⁵. Die Änderung des Phosphorylierungszustandes kann die Lokalisation, die DNA-Bindungseigenschaften, die Kofaktorbindung oder das transaktivierende Potenzial eines Transkriptionsfaktors beeinflussen^{173, 225}.

8.3.1 Subzelluläre Lokalisation

Wie bereits zuvor erwähnt, befindet sich direkt vor dem in dieser Arbeit untersuchten PKA-Phosphorylierungsmotiv das Kern-Lokalisations-Signal von Oct4. Des Weiteren wurde bereits diskutiert, dass eine PKA vermittelte Phosphorylierung des homologen Motives des POU-Transkriptionsfaktors Brn2 die Kernlokalisierung des Proteins beeinflusst²²⁶. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die Veränderung des Phosphorylierungszustandes einen direkten Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von

Oct4 hat. Es zeigte sich jedoch, dass weder die chemische Modulation des PKA-Phosphorylierungsmotiv durch 8-Br-cAMP und H-89 noch die Mutation des PKA-Motives einen Einfluss auf die Lokalisation von Oct4 hatte (**Abb. 3.6.1**). Dieses Ergebnis stimmt mit den bereits publizierten Daten über die subzelluläre Verteilung von Oct2 und dem murinen Oct4 nach Veränderung des PKA-Phosphorylierungsmotives überein ^{181, 227}.

8.3.2 Kofaktorbindung

Transkriptionsfaktoren interagieren mit verschiedensten Proteinen unter anderem mit anderen Transkriptionsfaktoren, Koregulatoren und Bestandteile des basalen Transkriptionskomplexes ²¹⁷. Dabei können Phosphorylierung das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren mit ihren Koaktivatoren und Korepressoren beeinflussen. Dies geschieht entweder über die direkte Blockierung der Interaktion aufgrund einer phosphorylierten Aminosäure oder durch eine konformationelle Strukturveränderung des Proteins, wodurch ein Protein-Proteinbindungsmotiv freigelegt oder verdeckt wird ¹⁷³. Die am besten untersuchte und verstandene Interaktion besteht zwischen Oct4 und Sox2. Beide Transkriptionsfaktoren binden kooperativ an die Promotorregionen verschiedener Zielgene wie z.B. *Nanog*, *Fgf4*, *Utf1* und regulieren so deren Expression ^{193, 196, 228, 229}. Aus diesem Grund wurde die Interaktion von Oct4 und Sox2 in Abhängigkeit vom Differenzierungszustand der Zellen und nach der Aktivierung bzw. Inhibierung des PKA Signalwegs untersucht. In einem Koimmunpräzipitationsexperiment konnten dabei keine Bindungsunterschiede detektiert werden (**Abb. 3.6.2**). Auch dieses Ergebnis stimmt mit den bereits publizierten Daten über die an der *Fgf4* Promotorregion überein ¹⁹⁷. Die Autoren konnten anhand eines Homologie-Modells der Oct4/Sox2/DNA Bindung zeigen, dass die Oct/Sox Interaktion von der C-terminalen Sox2-Region und von der POU-spezifischen Oct4-Region abhängig war. Da sich die PKA-Phosphorylierungsstelle in der POU-Homöodomäne befindet, ist ein direkter Einfluss auf die Interaktion zwischen Oct4 und Sox2 eher unwahrscheinlich. Somit wurden die morphologischen und molekularen Veränderungen der hESCs während der Differenzierung nicht durch eine direkte Beeinträchtigung der Protein-Protein Wechselwirkung von Oct4 und Sox2 bedingt.

Ein weiterer Kofaktor von Oct4 in murinen embryonalen Stammzellen ist Dax1 ^{217, 230}. Dieses Protein wurde als negativ Regulator der Oct4 Funktion identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass Dax1 an die Oct4 POU-Domäne bindet und so die DNA-Bindung und die transkriptionelle Aktivität von Oct4 beeinflusst ²³¹. Die Überexpression von Dax1 führt zur Differenzierung der ESCs und zur Inhibierung der Oct4-DNA-Interaktion ²³¹. Es ist vorstellbar, dass eine Phosphorylierung von Oct4 die Interaktion mit Dax1 positiv oder

negativ beeinflusst. Ein Beispiel für einen solchen regulatorischen Mechanismus ist die Interaktion des POU-Transkriptionsfaktors Pit-1 mit ETS-1. Synergistisch aktivieren diese beiden Transkriptionsfaktoren den Prolactin Promotor und die PKA Phosphorylierung von Pit-1 erhöht die Bindungsaffinität der beiden Faktoren zueinander²³². Neueste Studien bestätigen zudem, dass die Phosphorylierung des murinen Oct4 die Interaktion mit Pin1 beeinflusst, wodurch die Stabilität und transkriptionelle Aktivität von Oct4 reguliert wird¹⁸⁰.

Zusätzlich zu den Koaktivatoren können POU-Transkriptionsfaktoren auch mit Korepressoren interagieren^{233, 234}. Daher ist ein phosphorylierungsabhängiger negativer Regulationsmechanismus bei Zielgenrepression ebenfalls möglich.

Des Weiteren ist bekannt, dass Oct4 mit verschiedenen Chromatinregulatoren der Polycomb und Trithorax Gruppe wie SetDB1 oder Wdr5 direkt interagiert^{4, 235}. Daher ist es möglich, dass die Phosphorylierung von Oct4 die Interaktion mit Chromatinregulatoren steuert und so einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung und/oder Repression der Transkription in ESCs hat. Unabhängig davon kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Oct4-Phosphorylierung die DNA-Bindung im Zusammenhang eines weiteren bisher noch nicht identifizierten Kofaktors beeinflusst²³⁶.

8.3.3 Die Oct4-Phosphorylierung moduliert die Oct4-DNA-Bindung

Einige Transkriptionsfaktoren befinden sich dauerhaft im Zellkern und werden von verschiedenen Proteinkinasen bzw. von Proteinphosphatasen in ihrer Aktivität kontrolliert¹⁷³. Dabei kann die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die Promotorregionen von Zielgenen durch Unterschiede in der Proteinphosphorylierung positiv oder negativ reguliert werden^{222, 237}.

Für verschiedene POU-Transkriptionsfaktoren wie Pit-1, Oct1, Oct2, murines Oct4, Brn2, Brn5 konnte bereits eine PKA phosphorylierungsbedingte Regulation der DNA-Bindung nachgewiesen werden^{158, 176, 179, 181, 222, 225}. Die Zielsequenz von PKA war in allen Fällen, eine der in dieser Dissertation untersuchten homologen Sequenz unterhalb des Kernlokalisationssignals (**Abb. 3.3 C**). Dabei waren die jeweiligen Auswirkungen auf die POU-DNA-Bindungseigenschaften jedoch konträr. So führte beispielsweise die Phosphorylierung des PKA-Motives von Oct1, Oct2, Brn2 und des murinen Oct4 zu einer verringerten DNA-Bindung der entsprechenden POU-Faktoren^{158, 179, 181, 187, 225}. Parallel dazu wurde teilweise für dieselben POU-Transkriptionsfaktoren (Pit-1, Oct1, Oct2, Oct4) eine erhöhte DNA-Bindung in Abhängigkeit der Phosphorylierung nachgewiesen^{147, 176, 227}.

Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die Oct4-DNA-Bindung in hESCs ebenfalls phosphorylierungsabhängig ist und welche Auswirkungen sich dadurch auf die Genregulation ergeben. Mithilfe von EMSA, Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) und Reporter-gen Studien wurde die Oct4-DNA-Bindung untersucht. Dabei konnte eine differenzierungsabhängige Reduktion der Oct4-DNA-Bindung in allen drei experimentellen Ansätzen nachgewiesen werden (**Abb. 3.6.3.2 A; 3.7.1 A, B; 3.7.3 C**). Da sich wie bereits erwähnt, die Oct4-Proteinmenge im Verlaufe der spontanen Differenzierung (nCM3d) kaum veränderte und auch die Expression des Kofaktoren Sox2 stabil war (**Abb. 3.6.2 A**), waren die veränderten Promotorbindungen vermutlich durch den Phosphorylierungsunterschied von Oct4 bedingt (**Abb. 3.2 A**).

Während sich im EMSA Experiment unabhängig von den artifiziellen Bindungsmotiven PORE und MORE Unterschiede Oct4-DNA-Bindung zeigten, war diese Bindung im ChIP Experiment vom der Zielpromotorsequenz abhängig. Die Oct4-Bindung an den eigenen und den *Sox2* Promotor blieb unverändert, während es parallel zu einer signifikanten Verringerung der Bindung an die Promotoren von *Lefty-A* und *Fgf4* kam (**Abb. 3.7.1 A, B**). Diese Beobachtung und die Ergebnisse der 2-DG führten zu der Annahme, dass nur ein gewisser Teil des in der Zelle vorhandenen Oct4 phosphoryliert wird. In Folge der Phosphorylierung dieser Oct4-Subgruppen kommt es zu einer veränderten Spezifität zu einigen Zielgenen. Ein ähnlicher regulatorischer Mechanismus wurde bereits für Oct1 und Oct2 postuliert ^{147, 225}.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Oct4 in undifferenzierten Stammzellen immer in phosphorylierter Form vorliegt und dass diese Phosphorylierung für die Transkription einiger Zielgene (*Lefty-A*, *Fgf4*, *Nanog*) entscheidend ist und für andere Zielgene (*Sox2*, *Oct4*) keine Rolle spielt. Diese Theorie steht aber im Widerspruch mit den Daten der 2-DG bei der eindeutig unterschiedliche Phosphorylierungszustände von Oct4 nachgewiesen werden konnten (**Abb. 3.2**). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände durch den Verlust der Oct4-Proteinphosphorylierung im Zuge der Probenaufarbeitung bedingt waren.

Die Aktivierung von PKA durch 8-Br-cAMP führte *in vitro* (EMSA) und *in vivo* (ChIP) zu einer vermehrten Oct4 DNA-Bindung und einer erhöhten Aktivität des *Nanog*-Luziferase-Reporters (**Abb. 3.6.3.2 A; 3.7.2 A, B; 3.7.3 C**). Neben der DNA-Bindung erhöhte sich nach der 8-Br-cAMP Behandlung die Expression des Pluripotenz-assoziierten Gens *Lefty-A* (**Abb. 3.7.2 C**). *Lefty-A* ist ein bekannter Inhibitor des Nodal Signalweges ²³⁸. Eine gesteigerte Aktivität dieser Signalkaskade führt zur Differenzierung der hESCs in

Mesoderm und Endoderm²³⁹. Daher ist die positive Wirkung von Lefty-A bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz vermutlich die exakte Kontrolle des Nodal Signalweges. Die eher moderate Expressionssteigerung von *Lefty-A* und die fehlende Aktivierung weiterer Pluripotenz-assoziierten Oct4-Zielgene (*Nanog*, *Fgf4*) ist nicht geklärt. Vorstellbar ist, dass zusätzliche kompensatorische Mechanismen den pluripotenten Zustand kontrollieren und die übermäßige Expression einzelner Gene verhindern.

Die Inhibierung von PKA durch H-89 hatte im EMSA Experiment nahezu keine Auswirkung auf die Oct4 DNA-Bindung (**Abb. 3.6.3.2 A**). Bei den Luziferase und ChIP Experimenten verringerte dagegen die Behandlung mit H-89 die Bindung bzw. die Aktivität des Reporters auf ein Niveau, das in differenzierenden Zellen beobachtet wurde (**Abb. 3.7.2 A, B; 3.7.4 C**). Die Gründe für diese Unterschiede sind vielleicht auf die *in vitro* bzw. *in vivo* Bedingungen der einzelnen Experimente zurückzuführen. Auf der Ebene der Genexpression konnten ebenfalls keine H-89 bedingten Veränderungen nachgewiesen werden (**Abb. 3.7.2 C**). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass parallel wirkende Transkriptionsfaktoren den Expressionsverlust der Zielgene ausgleichen. Zusätzlich könnten weitere Kinasen wie AKT und PKC, die ebenfalls das PKA-Motiv von Oct4 phosphorylieren, die Inhibierung von PKA kompensieren (siehe **Abb. 3.4 C**)²²⁷.

Die positiven Auswirkungen der 8-Br-cAMP Behandlung auf die Bindung an die Promotorregionen verschiedener Oct4-Zielgene sowie die Aktivierung des Luziferase Reporters führten zu der Annahme, dass 8-Br-cAMP den pluripotenten Zustand der hESCs in nCM aufrechterhalten könnte. Es zeigte sich jedoch, dass 8-Br-cAMP annähernd keine Wirkung auf die Aktivierung des *Nanog*-Reporters in nCM hatte (siehe **Abb. 3.7.3 C**). Vermutlich führen differenzierungsassoziierte Veränderungen der hESCs zur Desensibilisierung der Zellen bezüglich der PKA-Aktivierung. Somit ist anzunehmen, dass die positive Wirkung der PKA vermittelten Phosphorylierung von Oct4 eine eher unterstützende und stabilisierende Funktion bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz einnimmt.

Übereinstimmend mit den zuvor beschriebenen Daten führten die phosphorylierungsinhibierenden Mutationen des PKA-Motives (T/A, S/A, TA/SA) zu einer verringerten DNA-Bindung und einer verringerten Aktivierung des *Nanog*-Luziferase-Reporters (**Abb. 3.6.3.2 B; 3.7.3 A**). Die Daten der phosphorylierungsimitierenden Mutanten waren äußerst widersprüchlich. Während eine Bindung dieser Mutanten an die artifiziellen DNA-Motive PORE und MORE nicht nachgewiesen werden konnte, wurde

gleichzeitig der *Nanog*-Luziferase-Reporter aktiviert (**Abb. 3.6.3.2 B; 3.7.3 A**). Die Aktivierung des Reporters war dabei vergleichbar mit den Alanin Mutanten und nicht wie erwartet stärker als beim Wildtyp Protein. Da der Austausch einer phosphorylierbaren Aminosäure in ein Glutamat bzw. Aspartat nicht zwangsläufig eine konstitutive Protein Phosphorylierung imitiert und wie bereits erwähnt die Daten diesbezüglich konträr waren, wurde sich auf die Analyse der Alanin Mutanten beschränkt ²⁴⁰.

Die Konsequenz der beschriebenen Oct4-Phosphorylierung auf die DNA-Bindung ist möglicherweise mit der für die Oct1-Phosphorylierung postulierten Auswirkung auf die DNA-Bindung vergleichbar ¹⁴⁷. Die Phosphorylierung des Serin an Position 236 der POU Homöodomäne führt über eine elektrostatische Wechselwirkung mit dem Lysin 154 der spezifischen POU-Domäne zur Stabilisierung der Homodimeren Oct4-Bindung an Ziel-DNA-Sequenzen in Form des MORE-Motives (**Abb.4.1 A**). Die beschriebenen Auswirkungen auf die DNA-Bindung mit dem PORE-Motive können anhand eines ähnlichen Modells erklärt werden (**Abb. 3.6.3.2**). Im Gegensatz zum MORE-Motiv bindet Oct4-Ziel-DNA in Form der PORE-Motive an gegenüberliegenden Seiten der DNA-Sequenz (**Abb.4.1 B**). Dabei kann die Phosphorylierung des Serin 236 der POU Homöodomäne die Oct4-Bindung an der DNA über elektrostatische Wechselwirkung mit dem Lysin 154 und dem Arginin 157 stabilisieren (unpublizierte Daten Esch et al.). Eine weitere entscheidende Rolle bei der Oct4-Ziel-DNA Erkennung spielt die Länge und Flexibilität der Linker-Region zwischen der POU-spezifischen Domäne und der POU-Homöodomäne ¹⁵⁴. Die PKA-Phosphorylierungsstelle von Oct4 befindet sich in unmittelbarer Nähe der Linker-Region, daher ist es vorstellbar, dass eine Phosphorylierung an dieser Stelle die Flexibilität des Linkers beeinflusst und somit die spezifische Oct4-PORE-DNA-Bindung reguliert. Aufgrund fehlender Strukturdaten der Linker-Region ist auch noch nicht vollends geklärt, ob die Linker-Region direkt mit der DNA interagiert. Wenn dem so wäre, könnte die Phosphorylierung diese Interaktion modulieren.

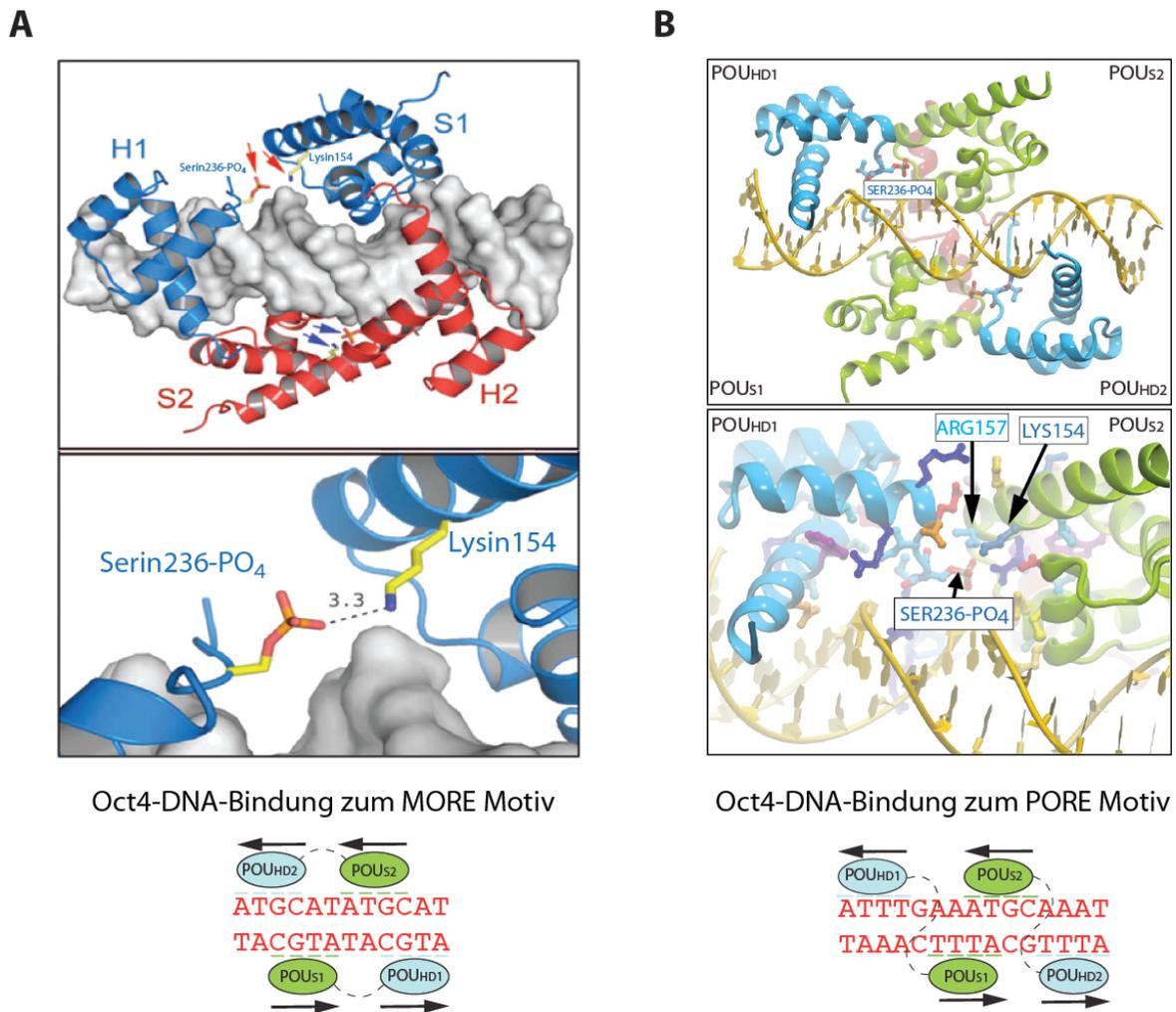


Abb. 4.1: Modulation der Oct4-DNA-Bindung nach der PKA-Phosphorylierung

A) Eine der Oct1 Kristallstruktur entlehnten Modellierung der phosphorylierungsbedingten Auswirkungen auf die Oct4-DNA-Bindung. Demnach führt die Phosphorylierung von Serin 236 zur Stabilisierung der dimeren Oct4 Konformation am MORE-DNA-Motiv. MORE-Motiv – Graue Helix, Blau und Rot – Oct-Moleküle, S – POU-spezifische Domäne, H – POU-Homöodomäne **B)** Ein Modell der Oct4-PORE Bindung zeigt die potentielle stabilisierende Wirkung der Phosphorylierung von Serin 236. (Adaptiert nach ^{147, 157} und unpublizierte Daten Esch et al.)

Unterschiedliche Auswirkung der Oct4-Phosphorylierung zwischen Maus und Mensch

In einer 2009 erschienen Publikation wurde die Phosphorylierung des murinen Oct4 in der embryonalen Karzinomzelllinie P19 untersucht ¹⁸¹. Die dort beschriebenen Ergebnisse der potentiellen PKA Phosphorylierung sind teilweise gegensätzlich zu den Ergebnissen in den hESCs. Die Stimulation der Karzinomzellen mit 8-Br-cAMP führte zu einer, teilweise vom p38 Map Kinase Signalweg abhängigen, erhöhten Oct4-Expression, in dessen Folge PORE unabhängige Zielgene stärker exprimiert wurden. Ein PORE abhängiger Reporter wurde hingegen nach einer Phosphorylierung imitierenden Mutation der PKA-Phosphorylierungsstellen nicht mehr aktiviert. Die Autoren postulierten daraufhin, dass die Phosphorylierung des PKA-Motives eine elektrostatische Abstoßung zwischen Oct4 und der DNA hervorruft. Dieses Modell widerspricht dem hier postulierten Modell der

positiven Wirkung einer Oct4 Phosphorylierung auf die DNA-Bindung. Da sich die Modelle untereinander nicht ausschließen, kann vermutet werden, dass beide Auswirkungen auf die DNA-Bindung in Abhängigkeit auf die Ziel-DNA möglich sind.

Neben den beschriebenen Unterschieden bei den DNA-Bindungseigenschaften führte die Stimulation der hESCs mit 8-Br-cAMP nicht zu einer erhöhten Oct4 Expression (**Abb. 3.6.3.2**). Auch hatte die Inhibierung der p38 Map Kinase keine Auswirkung auf die Oct4 bedingte Aktivierung des *Nanog*-Reporters (Daten nicht gezeigt). Die abweichenden Ergebnisse lassen des Weiteren Zelltypen-abhängige Unterschiede vermuten. Für die Studien zum murinen Oct4 wurden beispielsweise embryonale Karzinomzellen und nicht ESC verwendet. Daher kann spekuliert werden, dass in den Karzinomzellen eine andere Regulation der Oct4-DNA-Bindung vorliegt. Des Weiteren sind für humane und murine embryonale Stammzellen bereits abweichende regulatorische Mechanismen auf posttranslationaler Ebene bekannt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Ubiquitin-Ligase WWP2 die Degradation von Oct4 in undifferenzierten hESCs steuert, während in mESCs dieser Mechanismus scheinbar keine Rolle spielt¹⁶². Ein weiterer plausibler Erklärungsansatz wären die bereits erwähnten unterschiedlichen Entwicklungsstadien („*primed*“, „*naive*“) der ESC und dadurch bedingte Unterschiede in der molekularen Regulation der Zellen (siehe **1.4.1**). Demnach entsprechen mESCs einem ursprünglichen („*naive*“) und hESCs einem späteren weiter fortgeschrittenen, Maus Epiblast-Stammzellen ähnlichen, Entwicklungsstadium („*primed*“) ¹¹¹. Interessant wäre daher ein Vergleich der Maus Epiblast-Stammzellen mit den hESCs bezüglich der Oct4-Phosphorylierung und der damit verbundenen transkriptionellen Regulation im Verlauf der spontanen Differenzierung.

8.3.4 Oct4-Protein Stabilität

In einer vorläufigen Analyse weiterer Mutanten konnte eine zusätzliche, potentiell funktionelle, Phosphorylierungsstelle am C-Terminus von Oct4 detektiert werden (**1.9.2**). Neben den DNA-Bindungseigenschaften war bei dieser Mutante (Serin 359) die Proteinstabilität vom Phosphorylierungszustand abhängig. Möglicherweise beeinflusst diese Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung den postulierten Degradationsmechanismus von Oct4 in Abhängigkeit von Caspase 7 ²⁴¹. Diese Vermutung ist spekulativ und müsste durch weiterführende Experimente bestätigt werden. Interessanterweise zeigte sich jedoch auch bei der Auswertung der *in vitro* Kinase Experimente eine C-Terminus abhängige Oct4-Protein Instabilität (siehe **Abb. 3.4 C**).

8.4 Der PKA Signalweg und die Oct4-Phosphorylierung beeinflussen die Pluripotenz und die Reprogrammierung

Die Funktion der PKA Signaltransduktionskaskade bei der Induktion und der Aufrechterhaltung der Pluripotenz ist weitestgehend unbekannt. In embryonalen Stammzellen der Maus führte eine erhöhte Aktivität des PKA Signalwegs zu einer gesteigerten Expression von Oct4^{181, 242}. Dieser Effekt konnte verstärkt in Abwesenheit des LIF-Faktors oder nach der Retinsäure induzierten Differenzierung festgestellt werden. Des Weiteren führte die Inhibierung des PKA-Signalweges zu einer verringerten Oct4 Expression. Somit hatte der PKA Signalweg über die Expressionssteigerung von Oct4 und der damit verbundenen Inhibierung der Differenzierung einen positiven Effekt auf die Pluripotenz der mESCs. Im humanen System führte die Aktivierung von PKA zu einer erhöhten Reprogrammierungseffizienz und ermöglichte die Reprogrammierung von somatischen Zellen in „naive“ humane iPS Zellen (siehe 1.4.1.3)^{36, 243}. Diese Ergebnisse lassen einen direkten Zusammenhang des PKA Signalwegs und dem pluripotenten Zustand in humanen und murinen ESCs vermuten.

Im Verlaufe der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Oct4 PKA-Phosphorylierungsstelle einen entscheidenden Einfluss auf die Reprogrammierung von somatischen Zellen hat (siehe **3.8.2**). Nach Mutation des PKA-Motives von Oct4 konnten keine induzierten pluripotenten Zellen generiert werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die fehlende Oct4 Phosphorylierung nur eine zeitliche Verzögerung des Reprogrammierungsprozesses oder eine stark verringerte Reprogrammierungseffizienz bedingt. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Theorie ist, das phosphorylierte Oct4 eine höhere Affinität zu bestimmten Zielgenen hat, die aufgrund der Mutation nachfolgend schwächer exprimiert werden. Des Weiteren wäre vorstellbar, dass eine gesteigerte Expression des unphosphorylierten Oct4 diese Affinitätsunterschiede kompensieren könnte.

Interessanterweise konnte die Reprogrammierungseffizienz von hiPS Zellen durch die Zugabe von 8-Br-cAMP und der damit verbundenen Aktivierung des PKA Signalwegs gesteigert werden²⁴³. Es kann spekuliert werden, dass der positive Effekt auf die Reprogrammierung im Zusammenhang mit einer erhöhten oder stabilisierten Oct4-Phosphorylierung steht. Dass posttranslationale Modifikationen einen Einfluss auf die Reprogrammierung haben können, ist nicht unbekannt. So konnten beispielsweise ein Sox2 phosphorylierungsabhängiger Einfluss auf die Reprogrammierung gezeigt werden²⁴⁴. Die Mutation der Sox2 Phosphorylierungsstelle führte dabei zu einer stark verringerten Effizienz bei der Reprogrammierung.

8.5 Modellvorstellung der PKA vermittelten Oct4 Regulation

Wie bereits erwähnt, ist der pluripotente Zustand der embryonalen Stammzellen von einem exakten Zusammenspiel verschiedener extrinsischer und intrinsischer Einflüsse abhängig. In einem folgenden Modell wird die hypothetische Funktion der PKA-vermittelten Oct4-Phosphorylierung bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz und während der frühen Phase der spontanen Differenzierung zusammengefasst.

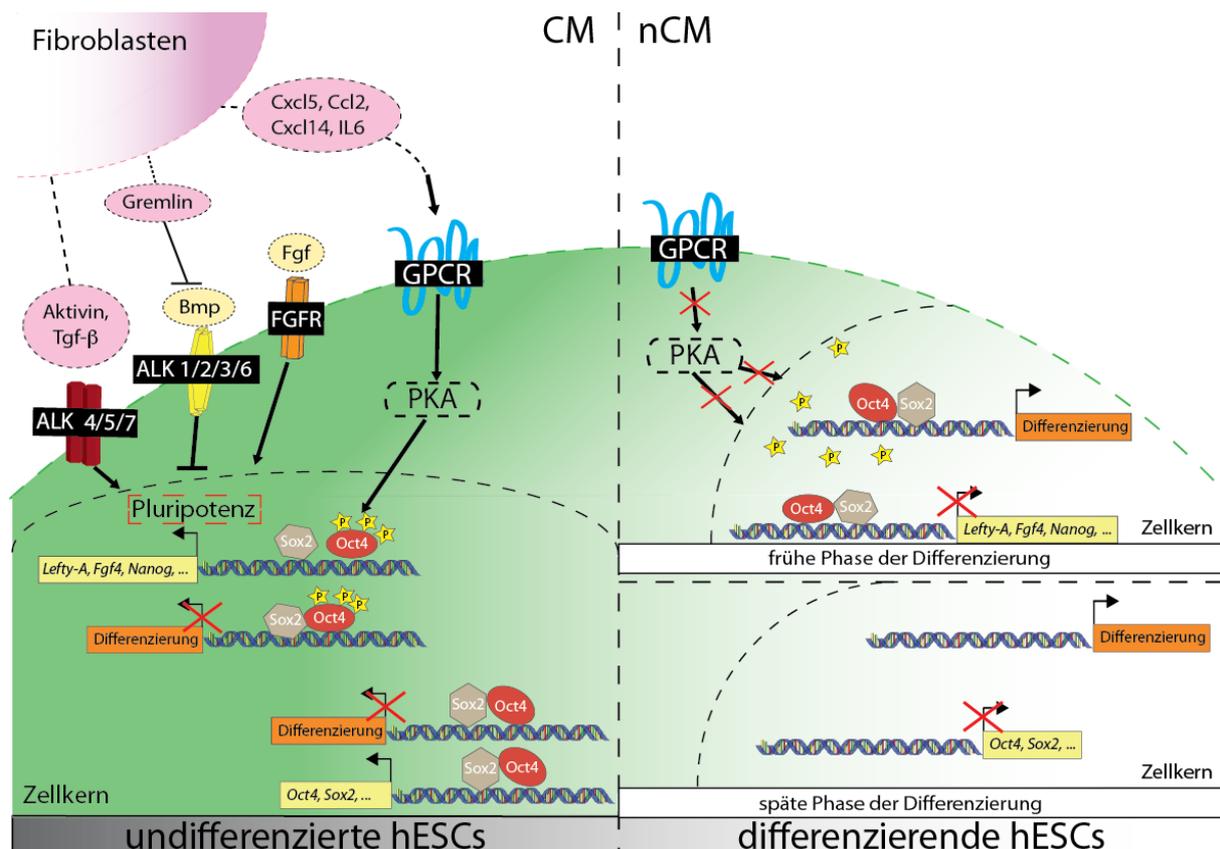


Abb. 4.2: Potentielle Auswirkungen der PKA-vermittelten Oct4-Phosphorylierung auf die Regulation der Pluripotenz

Embryonale Fibroblasten der Maus sezernieren in Abhängigkeit von Fgf2 verschiedenste Signalmoleküle und konditionieren auf diese Weise das Medium für die Kultivierung der humanen embryonalen Stammzellen^{85, 86}. Die im konditionierten Medium (CM) enthaltenen Signalmoleküle (Aktivin, Tgf-β, Gremlin) aktivieren und inhibieren verschiedene Signaltransduktionskaskaden (ALK4/5/7, ALK1/2/3/6, FgfR) und steuern so die Pluripotenz der hESC. Parallel dazu sezernieren die Fibroblasten Signalmoleküle wie CXCL5 und CCL2, die den G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) aktivieren können⁸⁶. Die Aktivierung der G-Protein Rezeptoren führt zu einer erhöhten PKA Aktivität und zur Phosphorylierung verschiedener Zielproteine wie z.B. Oct4. Eigenständig oder in

Verbindung mit Sox2 (oder anderen Kofaktoren) aktiviert phosphoryliertes Oct4 Zielgene (z.B. *Lefty-A*, *Fgf4*, *Nanog*) oder inhibiert differenzierungsassoziierte Zielgene. Parallel zu dem phosphorylierten Oct4 liegt im Zellkern eine bestimmte Menge von Oct4 unphosphoryliert vor. Das unphosphorylierte Oct4 bindet wiederum andere Zielgene und aktiviert (*Oct4*, *Sox2*) oder inhibiert deren Expression in Verbindung mit anderen Kofaktoren (z.B. Sox2).

In nicht konditioniertem Medium (nCM) kommt es aufgrund der fehlenden Signalmoleküle zu einer Deregulierung der Pluripotenz-kontrollierenden Signalwege (Aktivin, Bmp, Fgf) und zu einem Aktivitätsverlust der PKA Signaltransduktionskaskade. Daraufhin kommt es in der frühen Phase der spontanen Differenzierung (3d nCM) zur Verringerung der Oct4-Phosphorylierung, wodurch die Expression einzelner Zielgene (z.B. *Lefty-A*, *Fgf4*, *Nanog*) inhibiert wird und die Expression differenzierungsassoziierte Zielgene aktiviert wird. Interessanterweise führte die spontane Differenzierung zu einer erhöhten Expression der Protein Phosphatase PP2A (noch nicht publizierte Daten Quiroga et al.). Parallel dazu hatte die Inhibierung von PP2A einen positiven Effekt auf die Pluripotenz²⁴⁵. Dies führte zu der Vermutung, dass es während der frühen Phase der spontanen Differenzierung neben der verringerten Oct4-Phosphorylierung auch zur aktiven Oct4-Dephosphorylierung durch PP2A kommen kann. Im späten Stadium der Differenzierung (ab 5d nCM) war die Expression von Oct4, Sox2 und anderen Kofaktoren stark verringert, so dass weitere Differenzierungsprozesse einsetzen.

9 Literaturverzeichnis

1. Kirschner LS, Yin Z, Jones GN, Mahoney E. Mouse models of altered protein kinase A signaling. *Endocr Relat Cancer*; 2009. p. 773-93.
2. Vilardaga J-P, Agnati LF, Fuxe K, Ciruela F. G-protein-coupled receptor heteromer dynamics. *J Cell Sci*; 2010. p. 4215-20.
3. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*; 2008. p. 567-82.
4. Young RA. Control of the embryonic stem cell state. *Cell*; 2011. p. 940-54.
5. K. Rajasekhar V, C. Vemuri M. Regulatory Networks in Stem Cells - Page 26. 2009. p. 601.
6. Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*; 2010. p. 508-25.
7. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell stem cell*; 2007. p. 35-8.
8. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*; 2009. p. 185-99.
9. Ohtsuka S, Dalton S. Molecular and biological properties of pluripotent embryonic stem cells. *Gene Ther*; 2008. p. 74-81.
10. Stocum DL. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen*; 2001. p. 429-42.
11. De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Alcaina Y. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev*; 2010. p. 633-49.
12. Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 2006; **441**(7097): 1060-.
13. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*; 1978. p. 7-25.
14. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 2005. p. 605-31.
15. Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*; 2008. p. 583-97.
16. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*; 2000. p. 157-68.
17. Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*; 2001. p. 92-7.
18. Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J*; 2004. p. 980-2.
19. Gruh I, Martin U. Transdifferentiation of stem cells: a critical view. *Adv Biochem Eng Biotechnol*; 2009. p. 73-106.
20. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*; 2004. p. 639-48.
21. STEVENS LC. Testicular teratomas in fetal mice. *J Natl Cancer Inst*; 1962. p. 247-67.
22. KLEINSMITH L, PIERCE GB. MULTIPOTENTIALITY OF SINGLE EMBRYONAL CARCINOMA CELLS. *Cancer Res*; 1964. p. 1544-51.
23. Yu J, Thomson JA. Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev*; 2008. p. 1987-97.
24. Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1975. p. 1441-5.
25. Papaioannou VE, Gardner RL, McBurney MW, Babinet C, Evans MJ. Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis. *J Embryol Exp Morphol*; 1978. p. 93-104.

26. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*; 2007. p. 196-9.
27. Solter D, Skreb N, Damjanov I. Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. *Nature*; 1970. p. 503-4.
28. Lovell-Badge R. Many ways to pluripotency. *Nat Biotechnol*; 2007. p. 1114-6.
29. Martin GR, Evans MJ. The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell*; 1974. p. 163-72.
30. Berstine EG, Hooper ML, Grandchamp S, Ephrussi B. Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1973. p. 3899-903.
31. Solter D, Knowles BB. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci USA*; 1978. p. 5565-9.
32. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*; 1981. p. 154-6.
33. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1981. p. 7634-8.
34. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*; 1984. p. 255-6.
35. Brons IGM, Smithers LE, Trotter MWB, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*; 2007. p. 191-5.
36. Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2010. p. 9222-7.
37. Chambers I, Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*; 2004. p. 7150-60.
38. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1995. p. 7844-8.
39. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*; 1998. p. 1145-7.
40. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*; 2000. p. 271-8.
41. Tesar PJ. Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2005. p. 8239-44.
42. Stojkovic M, Lako M, Stojkovic P, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, et al. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cells*; 2004. p. 790-7.
43. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu S-J, Lanza R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*; 2006. p. 481-5.
44. Vazin T, Freed WJ. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci*; 2010. p. 589-603.
45. Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*; 1992. p. 550-1.
46. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*; 1992. p. 841-7.

47. Labosky PA, Barlow DP, Hogan BL. Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development*; 1994. p. 3197-204.
48. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*; 2004. p. 1001-12.
49. Shablott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1998. p. 13726-31.
50. Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature*; 2008. p. 344-9.
51. Ko K, Araúzo-Bravo MJ, Tapia N, Kim J, Lin Q, Bernemann C, et al. Human adult germline stem cells in question. *Nature*; 2010. p. E1; discussion E3.
52. Rao M, Condit ML. Alternative sources of pluripotent stem cells: scientific solutions to an ethical dilemma. *Stem Cells Dev*; 2008. p. 1-10.
53. Revazova ES, Turovets NA, Kochetkova OD, Kindarova LB, Kuzmichev LN, Janus JD, et al. Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning Stem Cells*; 2007. p. 432-49.
54. Paffoni A, Brevini TAL, Gandolfi F, Ragni G. Parthenogenetic activation: biology and applications in the ART laboratory. *Placenta*; 2008. p. 121-5.
55. Meissner A, Jaenisch R. Mammalian nuclear transfer. *Dev Dyn*; 2006. p. 2460-9.
56. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*; 1997. p. 810-3.
57. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*; 1998. p. 369-74.
58. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol*; 2001. p. 1553-8.
59. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*; 2005. p. 1369-73.
60. Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*; 2010. p. 704-12.
61. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*; 2006. p. 663-76.
62. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*; 2007. p. 313-7.
63. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*; 2007. p. 318-24.
64. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell stem cell*; 2007. p. 55-70.
65. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*; 2007. p. 861-72.
66. Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell stem cell*; 2009. p. 16-9.

67. Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell stem cell*; 2008. p. 587-90.
68. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*; 2007. p. 1917-20.
69. Heng J-CD, Feng B, Han J, Jiang J, Kraus P, Ng J-H, et al. The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell stem cell*; 2010. p. 167-74.
70. Redmer T, Diecke S, Grigoryan T, Quiroga-Negreira A, Birchmeier W, Besser D. E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO reports*; 2011.
71. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*; 2008. p. 101-6.
72. Marson A, Foreman R, Chevalier B, Bilodeau S, Kahn M, Young RA, et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell stem cell*; 2008. p. 132-5.
73. Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol*; 2008. p. e253.
74. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev*; 2010. p. 2239-63.
75. Feng B, Ng J-H, Heng J-CD, Ng H-H. Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*; 2009. p. 301-12.
76. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, et al. Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell*; 2011. p. 376-88.
77. Amabile G, Meissner A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med*; 2009. p. 59-68.
78. Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, Christodoulou C, Thomas DD, Gostissa M, et al. Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells*; 2010. p. 64-74.
79. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*; 2008. p. 945-9.
80. Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, et al. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods*; 2010. p. 197-9.
81. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell*; 2009. p. 381-4.
82. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh Y-H, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell*; 2010. p. 618-30.
83. Lengner CJ, Camargo FD, Hochedlinger K, Welstead GG, Zaidi S, Gokhale S, et al. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell stem cell*; 2007. p. 403-15.
84. Prowse ABJ, McQuade LR, Bryant KJ, Marcal H, Gray PP. Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media. *J Proteome Res*; 2007. p. 3796-807.

85. Greber B, Lehrach H, Adjaye J. Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells*; 2007. p. 455-64.
86. Diecke S, Quiroga-Negreira A, Redmer T, Besser D. FGF2 signaling in mouse embryonic fibroblasts is crucial for self-renewal of embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs (Print)*; 2008. p. 52-61.
87. Tomida M, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hozumi M. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *J Biol Chem*; 1984. p. 10978-82.
88. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*; 1988. p. 688-90.
89. Nichols J, Chambers I, Taga T, Smith A. Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development*; 2001. p. 2333-9.
90. Stewart R, Stojkovic M, Lako M. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur J Cancer*; 2006. p. 1257-72.
91. Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*; 2005. p. 885-96.
92. Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*; 2009. p. 118-22.
93. Umehara H, Kimura T, Ohtsuka S, Nakamura T, Kitajima K, Ikawa M, et al. Efficient derivation of embryonic stem cells by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Stem cells (Dayton, Ohio)*; 2007. p. 2705-11.
94. Watanabe S, Umehara H, Murayama K, Okabe M, Kimura T, Nakano T. Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene*; 2006. p. 2697-707.
95. Hao J, Li T-G, Qi X, Zhao D-F, Zhao G-Q. WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*; 2006. p. 81-91.
96. Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH, Young RA. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev*; 2008. p. 746-55.
97. Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*; 2004. p. 55-63.
98. Burdon T, Stracey C, Chambers I, Nichols J, Smith A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*; 1999. p. 30-43.
99. Fujiwara Y, Orkin SH. Molecular Regulation of the State of Embryonic Stem Cells. In: Majumder S, editor. *Stem Cells and Cancer*: Springer New York; 2009. p. 33-60.
100. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*; 2003. p. 685-700.
101. Dvorak P, Hampl A. Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. *Folia Histochem Cytobiol*; 2005. p. 203-8.
102. James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*; 2005. p. 1273-82.

103. Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci*; 2005. p. 4495-509.
104. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*; 2001. p. 971-4.
105. Ludwig TE, Bergendahl V, Levenstein ME, Yu J, Probasco MD, Thomson JA. Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat Methods*; 2006. p. 637-46.
106. Li Y-Q. Master stem cell transcription factors and signaling regulation. *Cell Reprogram*; 2010. p. 3-13.
107. Pera MF, Tam PPL. Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature*; 2010. p. 713-20.
108. Xu R-H, Sampsel-Barron TL, Gu F, Root S, Peck RM, Pan G, et al. NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell stem cell*; 2008. p. 196-206.
109. Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells*; 2006. p. 1476-86.
110. Eiselleova L, Matulka K, Kriz V, Kunova M, Schmidtova Z, Neradil J, et al. A Complex Role for FGF-2 in Self-Renewal, Survival, and Adhesion of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*; 2009. p. 1847-57.
111. Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*; 2009. p. 487-92.
112. Buecker C, Geijsen N. Different flavors of pluripotency, molecular mechanisms, and practical implications. *Cell stem cell*; 2010. p. 559-64.
113. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*; 2005. p. 947-56.
114. Silva SS, Rowntree RK, Mekhoubad S, Lee JT. X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2008. p. 4820-5.
115. Kunath T. Primed for pluripotency. *Cell stem cell*; 2011. p. 241-2.
116. Guo G, Yang J, Nichols J, Hall JS, Eyres I, Mansfield W, et al. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development*; 2009. p. 1063-9.
117. Hanna J, Markoulaki S, Mitalipova M, Cheng AW, Cassady JP, Staerk J, et al. Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. *Cell stem cell*; 2009. p. 513-24.
118. Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*; 2009. p. 722-37.
119. Yang J, van Oosten AL, Theunissen TW, Guo G, Silva JCR, Smith A. Stat3 activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency. *Cell stem cell*; 2010. p. 319-28.
120. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*; 2007. p. 79-94.
121. Yuen JWF, Poon LSW, Chan ASL, Yu FWY, Lo RKH, Wong YH. Activation of STAT3 by specific Galpha subunits and multiple Gbetagamma dimers. *Int J Biochem Cell Biol*; 2010. p. 1052-9.
122. Hofmann KP, Scheerer P, Hildebrand PW, Choe H-W, Park JH, Heck M, et al. A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem Sci*; 2009. p. 540-52.

123. de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*; 1998. p. 474-7.
124. Craven KB, Zagotta WN. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol*; 2006. p. 375-401.
125. Luttrell LM. Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol*; 2008. p. 239-64.
126. Antoni FA. Molecular diversity of cyclic AMP signalling. *Front Neuroendocrinol*; 2000. p. 103-32.
127. Daniel PB, Walker WH, Habener JF. Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu Rev Nutr*; 1998. p. 353-83.
128. Rosenberg D, Groussin L, Jullian E, Perlemoine K, Bertagna X, Bertherat J. Role of the PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues. *Ann N Y Acad Sci*; 2002. p. 65-74.
129. Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, et al. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*; 2010. p. 430-5.
130. Rahl PB, Lin CY, Seila AC, Flynn RA, McCuine S, Burge CB, et al. c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell*; 2010. p. 432-45.
131. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*; 2003. p. 631-42.
132. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*; 1998. p. 379-91.
133. Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, et al. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*; 2006. p. 301-13.
134. Loh Y-H, Wu Q, Chew J-L, Vega VB, Zhang W, Chen X, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*; 2006. p. 431-40.
135. Cole MF, Young RA. Mapping key features of transcriptional regulatory circuitry in embryonic stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 2008. p. 183-93.
136. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*; 2007. p. 693-705.
137. Mattout A, Meshorer E. Chromatin plasticity and genome organization in pluripotent embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*; 2010. p. 334-41.
138. Fisher CL, Fisher AG. Chromatin states in pluripotent, differentiated, and reprogrammed cells. *Curr Opin Genet Dev*; 2011. p. 140-6.
139. Chen L, Daley GQ. Molecular basis of pluripotency. *Hum Mol Genet*; 2008. p. R23-7.
140. Loh Y-H, Ng J-H, Ng H-H. Molecular framework underlying pluripotency. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*; 2008. p. 885-91.
141. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*; 2006. p. 315-26.
142. Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*; 2007. p. 77-88.
143. Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blalock R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*; 2007. p. 380-5.

144. Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, et al. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*; 2005. p. 489-501.
145. Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink T, Johnstone S, et al. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*; 2008. p. 521-33.
146. Reményi A, Tomilin A, Pohl E, Lins K, Philippssen A, Reinbold R, et al. Differential dimer activities of the transcription factor Oct-1 by DNA-induced interface swapping. *Mol Cell*; 2001. p. 569-80.
147. Kang J, Gemberling M, Nakamura M, Whitby FG, Handa H, Fairbrother WG, et al. A general mechanism for transcription regulation by Oct1 and Oct4 in response to genotoxic and oxidative stress. *Genes Dev*; 2009. p. 208-22.
148. Herr W, Sturm RA, Clerc RG, Corcoran LM, Baltimore D, Sharp PA, et al. The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. *Genes Dev*; 1988. p. 1513-6.
149. Ryan AK, Rosenfeld MG. POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev*; 1997. p. 1207-25.
150. Bosnali M, Münst B, Thier M, Edenhofer F. Deciphering the stem cell machinery as a basis for understanding the molecular mechanism underlying reprogramming. *Cell Mol Life Sci*; 2009.
151. Veenstra GJ, van der Vliet PC, Destrée OH. POU domain transcription factors in embryonic development. *Mol Biol Rep*; 1997. p. 139-55.
152. Cook AL, Sturm RA. POU domain transcription factors: BRN2 as a regulator of melanocytic growth and tumorigenesis. *Pigment Cell Melanoma Res*; 2008. p. 611-26.
153. Rosenfeld MG. POU-domain transcription factors: pou-er-ful developmental regulators. *Genes Dev*; 1991. p. 897-907.
154. van Leeuwen HC, Strating MJ, Rensen M, de Laat W, van der Vliet PC. Linker length and composition influence the flexibility of Oct-1 DNA binding. *EMBO J*; 1997. p. 2043-53.
155. Botquin V, Hess H, Fuhrmann G, Anastassiadis C, Gross MK, Vriend G, et al. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev*; 1998. p. 2073-90.
156. Poellinger L, Yoza BK, Roeder RG. Functional cooperativity between protein molecules bound at two distinct sequence elements of the immunoglobulin heavy-chain promoter. *Nature*; 1989. p. 573-6.
157. Tomilin A, Reményi A, Lins K, Bak H, Leidel S, Vriend G, et al. Synergism with the coactivator OBF-1 (OCA-B, BOB-1) is mediated by a specific POU dimer configuration. *Cell*; 2000. p. 853-64.
158. Nieto L, Joseph G, Stella A, Henri P, Burlet-Schiltz O, Monsarrat B, et al. Differential effects of phosphorylation on DNA binding properties of N Oct-3 are dictated by protein/DNA complex structures. *Journal of Molecular Biology*; 2007. p. 687-700.
159. Reményi A, Tomilin A, Schöler HR, Wilmanns M. Differential activity by DNA-induced quarternary structures of POU transcription factors. *Biochem Pharmacol*; 2002. p. 979-84.
160. Schöler HR, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N, Gruss P. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J*; 1989. p. 2543-50.
161. Cauffman G, Liebaers I, Van Steirteghem A, Van de Velde H. POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Stem Cells*; 2006. p. 2685-91.

162. Shi G, Jin Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Res Ther*; 2010. p. 39.
163. Hay DC, Sutherland L, Clark J, Burdon T. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*; 2004. p. 225-35.
164. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*; 2000. p. 372-6.
165. Liedtke S, Stephan M, Kögler G. Oct4 expression revisited: potential pitfalls for data misinterpretation in stem cell research. *Biol Chem*; 2008. p. 845-50.
166. Wang X, Dai J. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells*; 2010. p. 885-93.
167. Gao Y, Wang X, Han J, Xiao Z, Chen B, Su G, et al. The novel OCT4 spliced variant OCT4B1 can generate three protein isoforms by alternative splicing into OCT4B. *J Genet Genomics*; 2010. p. 461-5.
168. Mizuno N, Kosaka M. Novel variants of Oct-3/4 gene expressed in mouse somatic cells. *J Biol Chem*; 2008. p. 30997-1004.
169. Imagawa M, Miyamoto A, Shirakawa M, Hamada H, Muramatsu M. Stringent integrity requirements for both trans-activation and DNA-binding in a trans-activator, Oct3. *Nucleic Acids Research*; 1991. p. 4503-8.
170. Brehm A, Ohbo K, Schöler H. The carboxy-terminal transactivation domain of Oct-4 acquires cell specificity through the POU domain. *Mol Cell Biol*; 1997. p. 154-62.
171. Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res*; 2002. p. 321-9.
172. Pan G, Qin B, Liu N, Schöler HR, Pei D. Identification of a nuclear localization signal in OCT4 and generation of a dominant negative mutant by its ablation. *J Biol Chem*; 2004. p. 37013-20.
173. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol Life Sci*.
174. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*; 2003. p. 255-61.
175. Tanaka M, Herr W. Differential transcriptional activation by Oct-1 and Oct-2: interdependent activation domains induce Oct-2 phosphorylation. *Cell*; 1990. p. 375-86.
176. Kapiloff MS, Farkash Y, Wegner M, Rosenfeld MG. Variable effects of phosphorylation of Pit-1 dictated by the DNA response elements. *Science*; 1991. p. 786-9.
177. Caelles C, Hennemann H, Karin M. M-phase-specific phosphorylation of the POU transcription factor GHF-1 by a cell cycle-regulated protein kinase inhibits DNA binding. *Mol Cell Biol*; 1995. p. 6694-701.
178. Rosfjord E, Scholtz B, Lewis R, Rizzino A. Phosphorylation and DNA binding of the octamer binding transcription factor Oct-3. *Biochem Biophys Res Commun*; 1995. p. 847-53.
179. Grenfell SJ, Latchman DS, Thomas NS. Oct-1 [corrected] and Oct-2 DNA-binding site specificity is regulated in vitro by different kinases. *Biochem J*; 1996. p. 889-93.
180. Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, et al. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem*; 2011. p. 11593-603.
181. Saxe JP, Tomilin A, Schöler HR, Plath K, Huang J. Post-translational regulation of Oct4 transcriptional activity. *PLoS ONE*; 2009. p. e4467.

182. Xu HM, Liao B, Zhang QJ, Wang BB, Li H, Zhong XM, et al. Wwp2, an E3 ubiquitin ligase that targets transcription factor Oct-4 for ubiquitination. *J Biol Chem*; 2004. p. 23495-503.
183. Zhang Z, Liao B, Xu M, Jin Y. Post-translational modification of POU domain transcription factor Oct-4 by SUMO-1. *FASEB J*; 2007. p. 3042-51.
184. Wei F, Schöler HR, Atchison ML. Sumoylation of Oct4 enhances its stability, DNA binding, and transactivation. *J Biol Chem*; 2007. p. 21551-60.
185. Xu H, Wang W, Li C, Yu H, Yang A, Wang B, et al. WWP2 promotes degradation of transcription factor OCT4 in human embryonic stem cells. *Cell Res*; 2009. p. 561-73.
186. Webster DM, Teo CF, Sun Y, Wloga D, Gay S, Klonowski KD, et al. O-GlcNAc modifications regulate cell survival and epiboly during zebrafish development. *BMC Dev Biol*; 2009. p. 28.
187. Segil N, Roberts SB, Heintz N. Mitotic phosphorylation of the Oct-1 homeodomain and regulation of Oct-1 DNA binding activity. *Science*; 1991. p. 1814-6.
188. Ahmad I, Hoessli DC, Walker-Nasir E, Rafik SM, Shakoori AR, Nasir-ud-Din. Oct-2 DNA binding transcription factor: functional consequences of phosphorylation and glycosylation. *Nucleic Acids Research*; 2006. p. 175-84.
189. Swaney DL, Wenger CD, Thomson JA, Coon JJ. Human embryonic stem cell phosphoproteome revealed by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2009. p. 995-1000.
190. Rigbolt KT, Prokhorova TA, Akimov V, Henningsen J, Johansen PT, Kratchmarova I, et al. System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Sci Signal*; 2011. p. rs3.
191. Chambers I, Tomlinson SR. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development*; 2009. p. 2311-22.
192. Scaffidi P, Bianchi ME. Spatially precise DNA bending is an essential activity of the sox2 transcription factor. *J Biol Chem*; 2001. p. 47296-302.
193. Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*; 2009. p. 228-36.
194. Rodda DJ, Chew J-L, Lim L-H, Loh Y-H, Wang B, Ng H-H, et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*; 2005. p. 24731-7.
195. Ambrosetti DC, Schöler HR, Dailey L, Basilico C. Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *J Biol Chem*; 2000. p. 23387-97.
196. Kuroda T, Tada M, Kubota H, Kimura H, Hatano S-y, Suemori H, et al. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol*; 2005. p. 2475-85.
197. Reményi A, Lins K, Nissen LJ, Reinbold R, Schöler HR, Wilmanns M. Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev*; 2003. p. 2048-59.
198. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*; 2007. p. 625-35.
199. Van Hoof D, Muñoz J, Braam SR, Pinkse MWH, Linding R, Heck AJR, et al. Phosphorylation Dynamics during Early Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Cell stem cell*; 2009. p. 214-26.

200. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*; 2003. p. 643-55.
201. Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res*; 2007. p. 42-9.
202. Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, Walter T, Stojkovic P, Przyborski S, et al. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells*; 2005. p. 1035-43.
203. Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development*; 2006. p. 1193-201.
204. Suzuki A, Raya A, Kawakami Y, Morita M, Matsui T, Nakashima K, et al. Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2006. p. 10294-9.
205. Greber B, Lehrach H, Adjaye J. Control of early fate decisions in human ES cells by distinct states of TGF β s pathway activity. *Stem Cells Dev*; 2008.
206. Ng H-H, Surani MA. The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nat Cell Biol*; 2011. p. 490-6.
207. Pei D. Regulation of pluripotency and reprogramming by transcription factors. *J Biol Chem*; 2009. p. 3365-9.
208. Moretto-Zita M, Jin H, Shen Z, Zhao T, Briggs SP, Xu Y. Phosphorylation stabilizes Nanog by promoting its interaction with Pin1. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2010. p. 13312-7.
209. Paul FE, Hosp F, Selbach M. Analyzing protein-protein interactions by quantitative mass spectrometry. *Methods (San Diego, Calif)*; 2011.
210. Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*; 1995. p. 1034-59.
211. Carter MD, Southwick K, Lukov G, Willardson BM, Thulin CD. Identification of phosphorylation sites on phosphotyrosinase-like protein by QTOF mass spectrometry. *J Biomol Tech*; 2004. p. 257-64.
212. Zhou J, Su P, Li D, Tsang S, Duan E, Wang F. High-efficiency induction of neural conversion in human ESCs and human induced pluripotent stem cells with a single chemical inhibitor of transforming growth factor beta superfamily receptors. *Stem Cells*; 2010. p. 1741-50.
213. Xu R-H, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol*; 2002. p. 1261-4.
214. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl*; 2005. p. 7342-72.
215. Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell stem cell*; 2008. p. 151-9.
216. Pesce M, Schöler HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*; 2001. p. 271-8.
217. Pardo M, Lang B, Yu L, Prosser H, Bradley A, Babu MM, et al. An expanded Oct4 interaction network: implications for stem cell biology, development, and disease. *Cell stem cell*; 2010. p. 382-95.
218. Shimosaki K, Nakashima K, Niwa H, Taga T. Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development*; 2003. p. 2505-12.

219. Gianazza E. Isoelectric focusing as a tool for the investigation of post-translational processing and chemical modifications of proteins. *J Chromatogr A*; 1995. p. 67-87.
220. Sarioglu H, Lottspeich F, Walk T, Jung G, Eckerskorn C. Deamidation as a widespread phenomenon in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of human blood plasma proteins. *Electrophoresis*; 2000. p. 2209-18.
221. Yamagata A, Kristensen DB, Takeda Y, Miyamoto Y, Okada K, Inamatsu M, et al. Mapping of phosphorylated proteins on two-dimensional polyacrylamide gels using protein phosphatase. *Proteomics*; 2002. p. 1267-76.
222. Kasibhatla S, Tailor P, Bonefoy-Berard N, Mustelin T, Altman A, Fotedar A. Jun kinase phosphorylates and regulates the DNA binding activity of an octamer binding protein, T-cell factor beta1. *Mol Cell Biol*; 1999. p. 2021-31.
223. Schild-Poulter C, Shih A, Tantin D, Yarymowich NC, Soubeyrand S, Sharp PA, et al. DNA-PK phosphorylation sites on Oct-1 promote cell survival following DNA damage. *Oncogene*; 2007. p. 3980-8.
224. Roberts SB, Segil N, Heintz N. Differential phosphorylation of the transcription factor Oct1 during the cell cycle. *Science*; 1991. p. 1022-6.
225. Pevzner V, Kraft R, Kostka S, Lipp M. Phosphorylation of Oct-2 at sites located in the POU domain induces differential down-regulation of Oct-2 DNA-binding ability. *Biochem J*; 2000. p. 29-35.
226. Eisen T, Easty DJ, Bennett DC, Goding CR. The POU domain transcription factor Brn-2: elevated expression in malignant melanoma and regulation of melanocyte-specific gene expression. *Oncogene*; 1995. p. 2157-64.
227. Tang H, Sharp PA. Transcriptional regulation of the murine 3' IgH enhancer by OCT-2. *Immunity*; 1999. p. 517-26.
228. Ambrosetti DC, Basilico C, Dailey L. 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*; 1997. p. 6321-9.
229. Nishimoto M, Fukushima A, Okuda A, Muramatsu M. 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*; 1999. p. 5453-65.
230. van den Berg DLC, Snoek T, Mullin NP, Yates A, Bezstarosti K, Demmers J, et al. An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*; 2010. p. 369-81.
231. Sun C, Nakatake Y, Akagi T, Ura H, Matsuda T, Nishiyama A, et al. Dax1 Binds to Oct3/4 and Inhibits Its Transcriptional Activity in Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol*; 2009.
232. Augustijn KD, Duval DL, Wechselberger R, Kaptein R, Gutierrez-Hartmann A, van der Vliet PC. Structural characterization of the PIT-1/ETS-1 interaction: PIT-1 phosphorylation regulates PIT-1/ETS-1 binding. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2002. p. 12657-62.
233. Scully KM, Jacobson EM, Jepsen K, Lunyak V, Viadiu H, Carrière C, et al. Allosteric effects of Pit-1 DNA sites on long-term repression in cell type specification. *Science*; 2000. p. 1127-31.
234. Malin S, Linderson Y, Almqvist J, Ernberg I, Tallone T, Pettersson S. DNA-dependent conversion of Oct-1 and Oct-2 into transcriptional repressors by Groucho/TLE. *Nucleic Acids Res*; 2005. p. 4618-25.
235. Ang Y-S, Tsai S-Y, Lee D-F, Monk J, Su J, Ratnakumar K, et al. Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell*; 2011. p. 183-97.

236. Kang J, Shakya A, Tantin D. Stem cells, stress, metabolism and cancer: a drama in two Oct4s. *Trends Biochem Sci*; 2009. p. 491-9.
237. Sakamoto Y, Yoshida M, Semba K, Hunter T. Inhibition of the DNA-binding and transcriptional repression activity of the Wilms' tumor gene product, WT1, by cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of Ser-365 and Ser-393 in the zinc finger domain. *Oncogene*; 1997. p. 2001-12.
238. Besser D. Expression of nodal, lefty-a, and lefty-B in undifferentiated human embryonic stem cells requires activation of Smad2/3. *J Biol Chem*; 2004. p. 45076-84.
239. Tabibzadeh S, Hemmati-Brivanlou A. Lefty at the crossroads of "stemness" and differentiative events. *Stem Cells*; 2006. p. 1998-2006.
240. Paleologou KE, Schmid AW, Rospigliosi CC, Kim H-Y, Lamberto GR, Fredenburg RA, et al. Phosphorylation at Ser-129 but not the phosphomimics S129E/D inhibits the fibrillation of alpha-synuclein. *J Biol Chem*; 2008. p. 16895-905.
241. Musch T, Oz Y, Lyko F, Breiling A. Nucleoside drugs induce cellular differentiation by caspase-dependent degradation of stem cell factors. *PLoS ONE*; 2010. p. e10726.
242. Faherty S, Fitzgerald A, Keohan M, Quinlan LR. Self-renewal and differentiation of mouse embryonic stem cells as measured by Oct4 expression: the role of the cAMP/PKA pathway. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*; 2007. p. 37-47.
243. Wang Y, Adjaye J. A Cyclic AMP Analog, 8-Br-cAMP, Enhances the Induction of Pluripotency in Human Fibroblast Cells. *Stem Cell Rev*; 2010.
244. Jeong C-H, Cho Y-Y, Kim M-O, Kim S-H, Cho E, Lee S-Y, et al. Phosphorylation of Sox2 Cooperates in Reprogramming to Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells*; 2010.
245. Yoon BS, Jun EK, Park G, Jun Yoo S, Moon J-H, Soon Baik C, et al. Optimal suppression of protein phosphatase 2A activity is critical for maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem cells (Dayton, Ohio)*; 2010. p. 874-84.

10 Publikationsliste

Redmer T, Diecke S, Grigoryan T, Quiroga-Negreira A, Birchmeier W, Besser D. E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. EMBO Rep. 2011 Jul 1;12(7):720-6. doi: 10.1038/embor.2011.88.

Diecke S, Quiroga-Negreira A, Redmer T, Besser D. Fgf2 signaling in mouse embryonic fibroblasts is crucial for self-renewal of embryonic stem cells. Cells Tissues Organs. 2008;188(1-2):52-61. Epub 2008 Mar 11.

Quiroga-Negreira A, Diecke S, Redmer T, Busch H, Besser D. BMP signaling induces canonical Wnt signaling in human embryonic stem cells during meso-endodermal differentiation and regulates the Cdx/Hox gene cluster. In preparation.

Diecke S, Redmer T, Quiroga-Negreira A, Besser D. The influence of the Oct4 phosphorylation on the differentiation of human embryonic stem cells and induction of pluripotency. In preparation.

11 Danksagung

Am Ende eines langen Weges steht diese Arbeit, die ohne die Unterstützung von vielen netten und hilfreichen Menschen wohl nie in dieser Form möglich gewesen wäre. Daher möchte ich an dieser Stelle allen Personen herzlich danken, die mir bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit stets hilfreich zur Seite standen.

Mein erster Dank gilt Dr. Daniel Besser der diese Arbeit betreute und es mir ermöglichte mich mit einem der spannendsten Themengebiete der Grundlagenforschung auseinanderzusetzen. Ein ganz großes Dankeschön gilt auch meinen beiden „Leidensgenossen“ Torben Redmer und Angel Quiroga-Negreira für die schönen gemeinsamen Jahre.

Bei Herrn Prof. Rupert Mutzel möchte ich mich besonders für die Begutachtung dieser Dissertation bedanken. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Birchmeier für die Bereitstellung des Laborplatzes und für die Zusammenstellung seiner Arbeitsgruppe bedanken. In diesem Zusammenhang gilt mein herzlicher Dank allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Walter Birchmeier, AG Ulrike Ziebold und AG Daniel Besser für ihre Hilfe, Unterstützung und für einfach alles. Aus einer Vielzahl von netten Kollegen entwickelten sich im Laufe der Zeit viele neue Freunde (Kumpel), die es mir ermöglichten auch in schwachen Momenten weiter immer weiter zu machen und zu denken. Insbesondere möchte ich mich bei Angel, Toma, Katja, Julian, Ondrej und Peter bedanken. Danke das ihr da wart und da seit, sei es für ein Bier, Burger, Sport oder ein Gespräch. Besonders möchte ich mich bei Björn bedanken der mir stets als Freund zur Seite stand und mir durch experimentelle Anregungen, durch Diskussionen und der Korrektur dieser Arbeit sehr viel geholfen hat.

Auch Helga Horn möchte ich für ihre schnelle Hilfe beim Korrekturlesen der Arbeit danken.

Mein Dank geht auch an Florian Paul, Matthias Leisegang, Björn Lamprecht und Kresche für ihre Hilfe bei der Ausführung einiger Experimente.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Klaus-Peter und Christine die mich immer, in allen Lebenslagen vollends unterstützen und mir diesen Weg erst ermöglicht haben. Danke.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin Isabel (Isen) bedanken, die in den letzten Jahren viele meiner Launen ertragen musste und es immer wieder schaffte mich aufzumuntern. Danke für deine Liebe und Unterstützung und für die schöne gemeinsame Zeit.

12 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

13 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe. Alle aus anderen Quellen oder indirekt übernommene Daten sind unter Angabe der Referenz gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 08.08.2011

Sebastian Diecke