

# Aufklärung der Funktion von E-Cadherin in der Pluripotenz und Reprogrammierung somatischer Zellen

---

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

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

vorgelegt von

Torben Redmer  
aus Hamburg

2010

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. C. Scheidereit

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. P. Knaus

Disputation am 06.05.2011

Die Arbeit ist betreut worden von Herrn Dr. D. Besser am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin.

# Inhaltsverzeichnis

---

1. Inhalt	
<b>2. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>3. Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>4. Einleitung</b>	<b>10</b>
4.1 Zelladhäsion und Zelladhäsionsmoleküle	10
4.2 Die Cadherin-Superfamilie	11
4.3 E-Cadherin, der erste Vertreter der Cadherine	15
4.3.1 Molekulare Grundlagen der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion	17
4.3.2 Transkriptionelle und Posttranslationale Regulationen der E-Cadherin Expression	21
4.3.3 E-Cadherin während der frühen Embryogenese und Organogenese	25
4.4 Embryonale Stammzellen (ES-Zellen)	27
4.4.1 Isolierung Embryonaler Stammzellen	28
4.5 Das transkriptionelle Netzwerk in murinen embryonalen Stammzellen	29
4.5.1 ES-Zellen und Epigenetik	33
4.6 Induzierte Pluripotente Stammzellen	35
4.6.1 iPS-Induktion nach Takahashi und Yamanaka	35
4.7 Aufklärung von Signalwegen und Mechanismen während der iPS-Induktion	36
<b>5. Materialien und Methoden</b>	<b>40</b>
5.1 Zellkultur	40
5.1.1 Kultivierung von mES- und iPS-Zellen	40
5.1.2 Isolierung und Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)	40
5.1.3 Kultivierung von Platinum-E (Plat-E) Zellen, Virusproduktion und Transduktion von Zellen	41
5.1.4 Gewinnung von iPS Zellen	42
5.2 RNA-Isolierung und cDNA Synthese aus Zellen und Tumorgewebe	42
5.2.1 cDNA Synthese	43
5.2.2 Quantitative real-time RT-PCR (qPCR) und RT-PCR	44
5.3 Proteinexpressionsanalysen	46
5.3.1 Immunfluoreszenz und Immunhistochemie	46
5.3.2 Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS) und Durchflusszytometrie	47
5.3.3 Western-Blot Analyse	48
5.4 In vitro Differenzierung von iPS Zellen (Embryoid Body Formation)	48

# Inhaltsverzeichnis

---

5.5	In vivo Differenzierung .....	49
5.5.1	Teratokarzinom-Bildung.....	49
5.5.2	Blastozysten-Injektionen.....	49
5.6	Expressionsverlust und Überexpression von E-Cadherin.....	50
5.6.1	E-Cadherin shRNA und Expressionsplasmid .....	50
5.6.2	HTNcre/loxP vermittelte Reduktion des E-Cadherin und $\beta$ -Catenin Levels.....	50
5.7	Alkalische Phosphatase Aktivität .....	50
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
6.1	Die Expression von E-Cadherin in mES-Zellen ist essentiell für die Erhaltung der Pluripotenz.....	51
6.2	Der Verlust von E-Cadherin führt zur Reduktion des Proteinlevels von $\beta$ -Catenin und p120 Catenin aber nicht zu einer Kernlokalisierung .....	53
6.3	Die Expression von E-Cadherin und SSEA-1 klassifiziert induzierte pluripotente Zellen .....	54
6.4	Hepatozyten-iPS (Hep-iPS) können direkt, ohne Selektion generiert werden.....	58
6.5	Die Menge an E-Cadherin/ SSEA-1 positiven Zellen in OSKM Kolonien ist gering.	60
6.6	Der E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Komplex reguliert die Differenzierung .....	61
6.7	Ecad <sup>high</sup> iPS Zellen differenzieren in vivo unter Bildung von Teratokarzinomen .....	63
6.8	Ecad <sup>high</sup> Zellen integrieren in die Blastozyste und partizipieren an der Embryogenese.....	65
6.9	Die Abwesenheit von E-Cadherin und $\beta$ -Catenin führt zu einer ineffizienten Reprogrammierung von Fibroblasten .....	66
6.10	Die Überexpression von E-Cadherin als zusätzlicher Faktor führt nicht zu einer Erhöhung der Effizienz der Reprogrammierung .....	69
6.11	E-Cadherin Überexpression führt zur Bildung von stabilen iPS Zellen bei Abwesenheit von exogenem Oct4.....	70
6.12	ESKM Zellen besitzen alle Eigenschaften vollständig reprogrammierter iPS Zellen .....	72
6.13	Die in vivo Differenzierung von ESKM Zellen resultiert in der Bildung differenzierter Tumore .....	74
6.14	H3K4me3 und H3K27me3 Methylierungen sind präsent im Chromatin vollständig reprogrammierter iPS Zellen aber abwesend in partiell reprogrammierten Zellen .....	76
<b>7.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>78</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>9.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang I .....</b>	<b>106</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

11.	Anhang II .....	107
12.	Danksagung .....	108
13.	Lebenslauf .....	109

## Abkürzungsverzeichnis

### 2. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
ADAM	A disintegrin and metalloprotease	LTR	Long terminal repeat
AP	Alkalische Phosphatase	MEF	Maus embryonale Fibroblasten
AP-2	Aktivator Protein -2	MET	Mesenchymal-to epithelial transition
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat	MMP	Matrix metalloprotease
BMP	Bone morphogenetic protein	mRNA	Messenger RNA
CD	Cluster of differentiation	NBT	Nitroblautetrazolium
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	NOD	Non obese diabetic
DNA	Desoxyribonucleic acid	OSKM	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc
EMT	Epithelial-to mesenchymal transition	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ESKM	E-Cadherin, Sox2, Klf4, c-Myc	PFA	Paraformaldehyd
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RNA	Ribonucleic acid
FACS	Fluorescence-assisted cell sorting	SCID	Severe combined immune deficiency
GFP	Green fluorescent protein	SDS	Sodium dodecyl sulfate
GSK3	Glykogen-Synthasekinase 3	SMAD	Son of mother against decapentaplegic
H&E	Hämatoxylin & Eosin	SSEA-1	Stage-specific embryonic antigen 1
HTNcre	His-tat-NLS (Nuclear Localisation Sequence)-cre	STAT	Signal transducer and activator of transcription
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen	TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
ICM	Inner cell mass		
JAK	Janus-Kinase		
kDa	kilo Dalton = 1000 g/mol		
LIF	Leukemia inhibitory factor		

### 3. Zusammenfassung

Die Prozesse der frühen Embryogenese sind abhängig von der streng kontrollierten Expression von Zelladhäsionsmolekülen. Besonders die Expression des zur Familie der Cadherine gehörenden Moleküls E-Cadherin ist entscheidend für die Bildung der kompakten Morula, ein frühes Stadium der Embryonalentwicklung, aus der sich die Blastozyste bildet. Die Blastozyste enthält die innere Zellmasse (ICM), eine Ansammlung pluripotenter Zellen, die nicht nur alle Zellen des späteren Embryos bilden, sondern, aus denen in vitro auch embryonale Stammzellen (ES-Zellen) abgeleitet werden können. Embryonale Stammzellen stellen ein in vitro Modellsystem dar, das Einblicke in diese frühen Differenzierungsprozesse ermöglicht und, wie die Zellen der ICM, einen hohen Expressionslevel von E-Cadherin sowie der Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog zeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von E-Cadherin in murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen) und im Prozess der Reprogrammierung somatischer Zellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin nicht nur für die Morphologie von mES-Zellen essentiell ist. Eine starke Reduktion des E-Cadherin Levels in mES-Zellen führte zu deren Differenzierung sowie zu einer damit verbundenen Reduktion der Expression der Pluripotenzgene Oct4 und Nanog. Weiterhin konnte durch die Verwendung des Cre/loxP Systems gezeigt werden, dass die Störung der E-Cadherin bzw.  $\beta$ -Catenin Expression während der OSKM (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc)-induzierten Reprogrammierung zu einer starken Reduktion der Bildung von iPS-Kolonien führte. Die Etablierung des E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Komplexes ist somit ein entscheidender Schritt während der Konvertierung von Fibroblasten zu iPS-Zellen. Obwohl die E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion nicht unmittelbar mit der Regulation von Oct4 beteiligt zu sein scheint, führte die Überexpression von E-Cadherin in Kombination mit SKM, bemerkenswerterweise zur Bildung stabiler ESKM-iPS Klone. Die aus den Klonen erhaltenen iPS Zellen exprimierten endogene Level von Oct4 und Nanog, obwohl Oct4 nicht als exogener Faktor während der Reprogrammierung anwesend war. Weiterhin konnten die ESKM-iPS Zellen durch die Bildung von Embryoid Bodies und Teratomen differenziert werden und daher alle Eigenschaften von mES-Zellen. Durch diese unkonventionell erzeugten iPS-Zellen wird deutlich, dass Pluripotenz neben der transkriptionellen Regulation auch über die Etablierung von Zelladhäsions-

## **Zusammenfassung**

---

verbindungen definiert werden kann. Vor allem die E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion übernimmt für die Etablierung und die Erhaltung des pluripotenten Status eine Schlüsselfunktion.

## Abstract

---

During early embryogenesis the expression of cell adhesion molecules and the establishment of cell-cell contacts are crucial steps to ensure proper development of the embryo. Especially expression of the molecule E-Cadherin, a member of the cadherin superfamily, is crucial for the formation of the compacted morula, comprising an early stage of embryogenesis that forms the blastocyst. The latter bears the inner cells mass (ICM), a group of pluripotent cells, that forms all cells of the adult body. Cells of the ICM can be used to establish embryonic stem cells (ESCs) as an in vitro system that allows providing insights in these early differentiation processes. Embryonic stem cells like cells of the ICM display high expression levels of E-Cadherin and of the pluripotency markers Oct4 and Nanog.

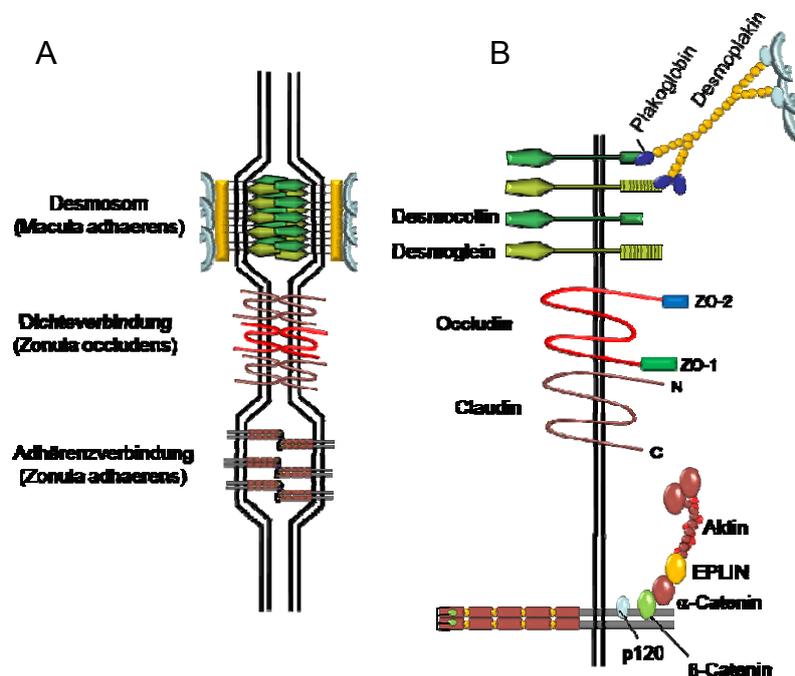
In the present work, the function of E-Cadherin in murine embryonic stem cells and during the process of somatic cell reprogramming was analysed. It could be shown in a shRNA mediated knock-down of E-Cadherin that its expression not only determines the morphology of ESCs but is also linked to regulation of the pluripotency genes Oct4 and Nanog. Further, cre/loxP mediated ablation of E-cadherin and  $\beta$ -catenin expression followed by the reprogramming with four viral factors Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc (OSKM) led to a strong reduction in the number of induced pluripotent stem cell (iPS-cell) colonies. Therefore, the establishment of the E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin complex is a crucial step in the process that governs the conversion of fibroblasts to iPS-cells. Although the link between E-Cadherin mediated cell adhesion and the regulation of Oct4 seems to be indirect, overexpression of E-cadherin in combination with SKM surprisingly, led to the formation of stable ESKM-iPS clones. Cells of these clones displayed endogenous expression of Oct4 and Nanog although exogenous Oct4 was absent during the reprogramming process. Established ESKM-iPS cells fulfilled all criteria tested so far, to establish their pluripotent state. ESKM-iPS cells were able to undergo embryoid body mediated differentiation and formed teratoma. The generation of these unconventional generated iPS cells points out that pluripotency, beside transcription factors, is also defined by the adhesive integrity of iPS and ES-cells. Especially E-Cadherin mediated cell adhesion plays a crucial role for the establishment and maintenance of the pluripotent state.

## 4. Einleitung

### 4.1 Zelladhäsion und Zelladhäsionsmoleküle

Unter Zelladhäsion wird die nicht kovalente Assoziation einer Zelle mit benachbarten Zellen verstanden, die über Oberflächenmoleküle vermittelt wird. Diese Oberflächenmoleküle sind in der Membran verankert und ermöglichen so eine mechanisch stabile Verbindung der Zellen. Unterschieden werden hauptsächlich drei Arten von Adhäsionsverbindungen: die Desmosomen (Macula adhaerens), die Dichteverbindungen (Tight junctions, *Zonula occludens*) und die Adhärenzverbindungen (Adherence junctions, *Zonula adhaerens*) (**Abb.1**).

Desmosomen bilden knopfartige, interzelluläre Kontaktpunkte, die für die Verankerung von Intermediärfilamenten verantwortlich sind und so eine netzartige Verknüpfung der Filamente von einer Vielzahl benachbarter Zellen ermöglichen. Welche Intermediärfilamente an dieser Verknüpfung beteiligt sind, ist abhängig von der Art der Zelle, so sind es z.B. in Epithelzellen Vertreter der Zytokeratine und bei Muskelzellen Vertreter der Desmine.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zell-Zell Verbindungen.**

(A) Macula adhaerens (Desmosom), Zonula occludens (Tight junction = Dichteverbindung) und die Zonula adhaerens (Adherence junction = Adhärenzverbindung). (B) Beteiligte Proteine und Proteinkomplexe.

## Einleitung

---

An der Bildung von Desmosomen sind vor allem die zur Cadherin-Superfamilie gehörenden Proteine Desmocollin und Desmoglein beteiligt, die miteinander in Interaktion stehen. Die zytoplasmatische Domäne der desmosomalen Cadherine ist mit Plakoglobin ( $\gamma$ -Catenin) assoziiert, dass über Desmoplakin mit den Intermediärfilamenten verbunden ist (Delva et al., 2009; Matter and Balda, 2003). Die Dichteverbindungen werden vor allem durch die Interaktionen von Transmembranproteinen aus der Familie der Claudine und Occludine vermittelt. Diese Proteine durchspannen die Membran viermal (daher auch als Tetraspannine bezeichnet), wobei sowohl der N- als auch der C-Terminus im Zytoplasma lokalisiert sind. Beide Domänen sind in der Lage Proteine der Zonula Occludens Familie wie z.B. ZO-1 und ZO-2 zu binden und so einen Kontakt zu Aktinfilamenten herzustellen (Furuse, 2010). Durch die Interaktion von Claudinen und Occludinen werden dichte Verschlussleisten zwischen Zellen gebildet und so die Abtrennung verschiedener Kompartimente gewährleistet. Diese Abtrennung ist vor allem dann erforderlich, wenn ein Ionenaustausch zwischen Kompartimenten mit einem unterschiedlichen pH-Wert verhindert werden muss. Durch diese Verschlussleisten werden z.B. Protonen aus dem sauren Milieu des Magens daran gehindert durch die Magenwand in umliegendes Gewebe zu diffundieren.

Zu den Adhärenz Verbindungen zählen vor allem die durch Cadherine vermittelten Zell-Zell Verbindungen, sie gehen vor allem von den klassischen Cadherinen aus. Adhärenz Verbindungen sind ubiquitär verbreitet, sie sind wichtig für die Morphogenese und Reorganisation von Zellverbänden und Geweben und essentiell während der frühen Embryogenese und Organogenese (Meng and Takeichi, 2009).

### **4.2 Die Cadherin-Superfamilie**

Cadherine sind Calciumionen-bindende Zelladhäsions-Glykoproteine, die sowohl in Vertebraten, als auch in Invertebraten, niederen und einzelligen Organismen wie Schwämmen und Choanoflagellaten verbreitet sind (van Roy and Berx, 2008). Während der Organogenese gewährleisten Cadherine die mechanische Stabilität und Organisation von Zellen in Geweben und Organen und bestimmen Eigenschaften wie Migration und Proliferation.

Die Familie der Cadherine umfasst über hundert Mitglieder, die in fünf große Untergruppen gegliedert sind. Hier sind vor allem die klassischen Cadherine wie das epitheliäre Cadherin (E-Cadherin, Uvomorulin, Cadherin-1), das neuronale Cadherin

## Einleitung

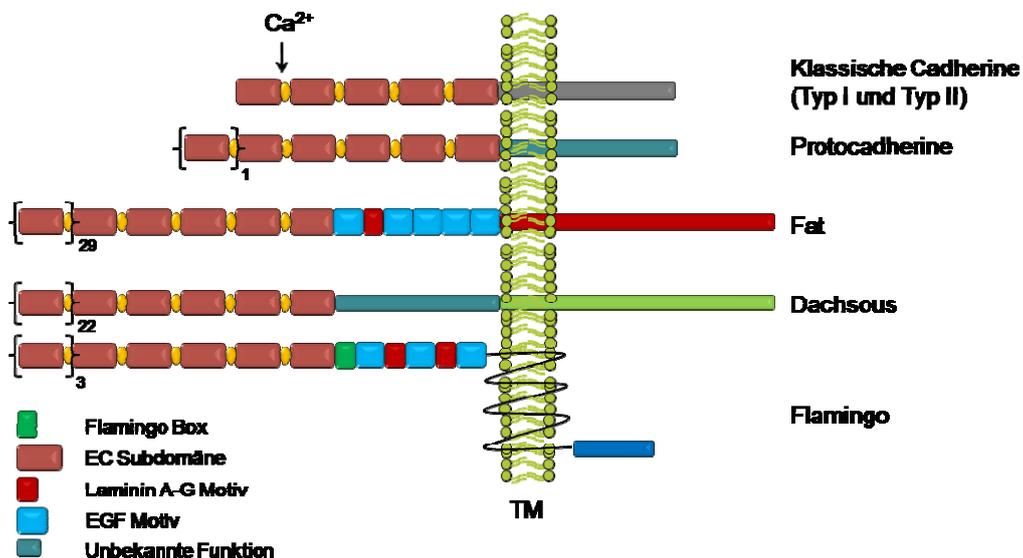
---

(N-Cadherin, Cadherin-2) sowie das vor allem in extraembryonalem Gewebe exprimierte, plazentare P-Cadherin (Cadherin-3), das retinale R-Cadherin (Cadherin-4) und das in der Niere vorkommende K-Cadherin (Cadherin-6) zu nennen. Neunzehn Cadherine sind im Vertebratengenom konserviert. Darunter sechs Typ I Cadherine und dreizehn Cadherine aus der eng verwandten Typ II Subfamilie. Die Typ I Cadherine sind verbreitet in den embryonalen Keimblättern. E-Cadherin ist in der Oozyte, den Blastomeren der Morula sowie während der gesamten Embryogenese exprimiert. Im adulten Organismus ist E-Cadherin an der Bildung von polaren Epithelien wie z.B. der Lunge, des Darms, der Leber und der Pankreas beteiligt. Die Polarisierung der Zellen entsteht durch die unterschiedliche Expression von E-Cadherin auf der Zelloberfläche, so dass zwei Seiten einer Epithelzelle unterschieden werden können. Die apikale Seite ist in das Organinnere gerichtet, während die basale Seite nach außen gerichtet ist und die Epithelzelle auf der Basallamina verankert. N-Cadherin wird ab dem Gastrulationsstadium gebildet, es ist im adulten Organismus in mesodermalen und neuronalen Geweben wie den Fibroblasten oder Neuronen exprimiert.

Während der Embryonalentwicklung und auch im adulten Organismus reguliert der Prozess der epithelialen-zu mesenchymalen Transition (EMT) den Übergang von E-Cadherin exprimierenden Zellen in N-Cadherin exprimierende Zellen. Dieser Vorgang verläuft nicht nur im Rahmen natürlich vorkommender Prozesse, wie der Gastrulation die für die Bildung des Mesoderms notwendig ist, sondern spielt auch für die Metastasierung von Tumoren eine große Rolle zusammengefasst in (Sleeman, 2000; Thiery and Sleeman, 2006). Bei der Umkehrung dieses Prozesses der als mesenchymale-zu epitheliale Transition bezeichnet wird, gehen mesenchymale, N-Cadherin exprimierende Zellen über in E-Cadherin positive Epithelzellen. Dieser Prozess ist entscheidend für die Strukturierung vieler Organe wie z.B. der Niere. Während dieses Prozesses transdifferenzieren mesenchymale Zellen der Niere in epitheliäre Zellen, welche anschließend die Nephrone bilden (Barasch et al., 1999). Die Entwicklung von Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen aus mesodermalen Zellen der Pankreas erfolgt ebenfalls nach dem MET Mechanismus (Gershengorn et al., 2004). Die Expression von P-Cadherin beginnt nach der Bildung extraembryonaler Strukturen wie der Plazenta und ist im adulten Organismus in Epithelien, im Endothel der Kornea und der Epidermis exprimiert (Nose and Takeichi, 1986). Der Verlust von Cadherinen, die bereits während der frühen Embryonalentwicklung exprimiert

## Einleitung

werden, führt zu schweren Defekten, die immer embryonal letal sind. So verhindert die Abwesenheit von E-Cadherin die Differenzierung der Morula zur Blastozyste (Larue et al., 1994) und der Verlust von N-Cadherin resultiert in einer fehlerhaften Herz- und Neuronalentwicklung (Radice et al., 1997). Die Expression der Typ I und Typ II Cadherine bilden unterschiedliche Verteilungsmuster. Während Typ I Cadherine ein relativ verbreitetes Auftreten zeigen, ist die Expression von Typ II Cadherinen nur auf bestimmte Zellen beschränkt. So reguliert OB(osteoblast)-Cadherin (Cadherin-11) spezifisch die Differenzierung von mesenchymalen Zellen in osteogene und chondrogene Linien (Kii et al., 2004) und VE(vaskuläres-endotheliales)-Cadherin (Cadherin-5) wird nur in Endothelzellen exprimiert. Dort spielt es eine wesentliche Rolle bei der Vaskularisierung. K-Cadherin wiederum ist für die Bildung der Nephrone in der Nierenentwicklung essentiell (Mah et al., 2000). Die klassischen Cadherine (Typ I und Typ II Cadherine) bestehen aus einer extrazellulären-, einer Transmembran- und einer zytoplasmatischen Domäne. Die extrazelluläre Domäne besteht mehreren sich wiederholenden Subdomänen (EC Domänen), deren Anzahl zwischen 5 – 34, in Abhängigkeit des jeweiligen Cadherins, variiert (**Abb. 2**).



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Vertreter der Cadherin-Superfamilie.**

Gezeigt sind die extrazellulären Domänen auf der linken Seite der Abbildung und die intrazellulären Domänen auf der rechten Seite. Dargestellt sind (von oben nach unten) klassische Cadherine, Protocadherine, Fat-Cadherine sowie Cadherine der Dachsous und Flamingo Familie. Der Farbcode identifiziert die verschiedenen Motive der einzelnen Domänen. Die Zahl der in eckige Klammern gesetzten EC-Subdomänen gibt die Anzahl der noch folgenden EC-Domänen an, TM = Transmembranbereich. Modifiziert nach (Halbleib and Nelson, 2006).

## Einleitung

---

Die Transmembrandomäne verankert das Molekül in der Zellmembran und die zytoplasmatische Domäne verbindet das Adhäsionsmolekül mit dem Zytoskelett. Diese Verbindung ist vor allem für morphologische Veränderung sowie für die gerichtete Bewegung von Zellen essentiell (Gumbiner, 1996).

Die klassischen Cadherine grenzen sich strukturell und funktionell deutlich von den nicht-klassischen Cadherinen ab. Die extrazelluläre Domäne der nicht-klassischen Cadherine weist so neben den typischen EC-Domänen auch andere Struktur motive auf, wie das EGF-Motiv. Des Weiteren scheint die zytoplasmatische Domäne dieser Cadherine eine andere Funktion zu besitzen, als in den klassischen Cadherinen, wie es z.B. durch die Familie der Protocadherine gezeigt werden konnte.

Protocadherin 1 (Pcdh1) wurde aus neuronalen Zellen von Mensch, Ratte und Maus isoliert. Dabei wurde deutlich, dass ihre extrazelluläre Domäne im Vergleich zu klassischen Cadherinen homolog aber um ein bis zwei EC-Subdomänen größer war. Funktionell konnte gezeigt werden, dass Zellen, welche Pcdh1 exprimierten, miteinander aggregieren konnten, dass aber die zytoplasmatische Domäne der Protocadherine keine Homologien zeigte. Bisher sind nur wenige Proteine, die an die zytoplasmatische Domäne der Protocadherine binden können, identifiziert worden. Einer dieser Interaktionspartner ist Sprouty (Wang et al., 2008). Interessanterweise können Proteine der Catenin-Familie wie  $\beta$ -Catenin nicht direkt binden. Die genaue Funktion der Protocadherine ist noch nicht verstanden, sie scheinen aber vor allem an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt zu sein.

Der erste zur Fat-Familie gehörende Vertreter Fat1 wurde erstmalig im Fat-Locus von *Drosophila* als ein zur Cadherin-Superfamilie gehörendes Adhäsionsprotein mit einer extrem großen extrazellulären Domäne (34 EC Domänen) beschrieben. Der Funktionsverlust von Fat1 führte zu schweren Defekten in der Differenzierung und während der Morphogenese der Larve und zu hyperplastischem Wachstum. Daher wurde Fat1 die Funktion eines Tumorsuppressors zugeschrieben (Mahoney et al., 1991). Die zur Fat-Familie strukturell vergleichbaren Dachsous-Cadherine besitzen ebenfalls eine große extrazelluläre Domäne (27 EC-Domänen) und wurden erstmalig in *Drosophila* identifiziert. Mutationen im Dachsous Gen resultierten während der *Drosophila*-Entwicklung in einer fehlerhaften Bildung von Beinen, Flügeln und der Morphogenese des Thorax (Oda et al., 1994). Cadherine der Fat- und Dachsous-

## Einleitung

cadherine sind in der Lage zu trans-dimerisieren und scheinen mit dem Zytoskelett assoziiert zu sein.

Flamingo-Cadherine stellen die wohl außergewöhnlichste Gruppe der Cadherin-Superfamilie dar. Die extrazelluläre Domäne ist vergleichbar mit der Domäne klassischer Cadherine, die Transmembrandomäne hingegen weist Homologien zu G-Protein assoziierten Rezeptoren auf und durchspannt die Membran sieben-fach. Es ist nicht bekannt, ob die Flamingo-Cadherine Adhäsionsverbindungen auszubilden können bzw. mit dem Zytoskelett assoziiert sind. Diese Proteine sind aber entscheidend an der Ausbildung der apikalen-basalen Achse von Epithelzellen, der planaren Zellpolarität (PCP) beteiligt.

Einen Überblick über einige klassische und nicht klassische Cadherine sowie deren Funktion fasst die Tabelle 1 zusammen:

**Tabelle 1:** Angaben zur Lokalisierung und Funktion der klassischen Cadherine E-, N- P- und T-Cadherin sowie der Protocadherine und der nichtklassischen Cadherine Fat, Dachsous und Flamingo. GPI = Glykosyl-phosphatidylinositol-Anker.

Cadherin-Subtyp	EC Domänen	Lokalisierung/ Funktion	Referenz
<i>E-Cadherin (Cdh1)</i>	5	<i>Früher Embryo, Epithelien</i>	(Hyafil et al., 1980)
<i>N-Cadherin (Cdh2)</i>	5	<i>Gastrulationsstadium, Mesoderm, Ektoderm</i>	(Hatta et al., 1985)
<i>P-Cadherin (Cdh3)</i>	5	<i>Extraembryonale Strukturen</i>	(Nose and Takeichi, 1986)
<i>R-Cadherin (Cdh4)</i>	5	<i>Neuronale, Nieren und Muskel Entwicklung</i>	(Inuzuka et al., 1991)
<i>VE-Cadherin (Cdh5)</i>	5	<i>Vaskularisierung</i>	(Nachtigal et al., 2001)
<i>K-Cadherin (Cdh6)</i>	5	<i>Entwicklung der Nieren</i>	(Xiang et al., 1994)
<i>T-Cadherin</i>	5 (GPI-verankert)	<i>Gerichtetes Wachstum neuronaler Axone</i>	(Ranscht and Dours-Zimmermann, 1991)
<i>Protocadherine</i>	6	<i>Zentrales Nervensystem</i>	(Sano et al., 1993)
<i>Fat-Cadherine</i>	34	<i>Planare Zellpolarität, Aktindynamik, Proliferation</i>	(Tanoue and Takeichi, 2005)
<i>Dachsous</i>	27	<i>Morphogenese/Planare Zellpolarität</i>	(Clark et al., 1995)
<i>Flamingo</i>	8	<i>Planare Zellpolarität</i>	(Usui et al., 1999)

### 4.3 E-Cadherin, der erste Vertreter der Cadherine

E-Cadherin (Cdh1) ist neben neuronalem Cadherin (N-Cadherin, Cdh2) der erste und am besten untersuchte Vertreter der Cadherine. Einen ersten Hinweis auf E-Cadherin ergab 1980 die Inkubation von murinen embryonalen Karzinomzellen (embryonic carcinoma, EC-Zellen) bzw. Blastomeren des frühen Embryos mit einem

## Einleitung

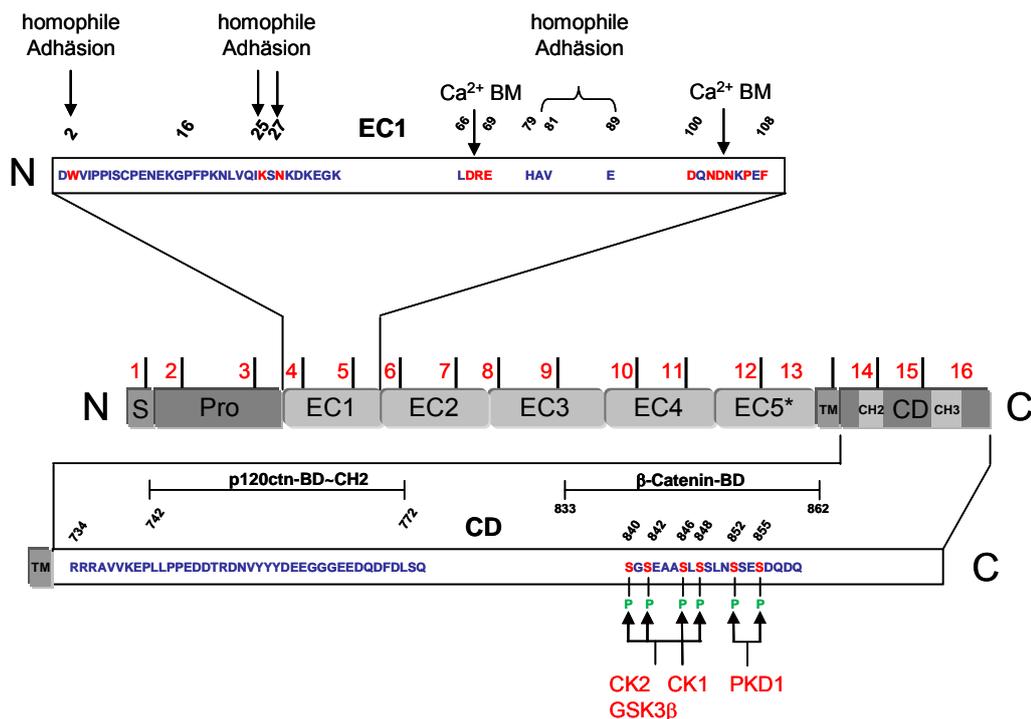
---

polyklonales Antiserum (anti-F9), das durch eine Immunisierung von Hasen gegen F9-Zellen (eine EC-Zell Linie), erhalten wurde (Babinet et al., 1977). Die Inkubation mit dem Antiserum führte zur Aufhebung des Zellverbandes der EC-Zellen bzw. zur Dekompaktierung der Blastomeren (Hyafil et al., 1980). Es wurde daher deutlich, dass an der Adhäsion der Zellen beider Systeme ein Protein beteiligt sein musste, dessen Funktion durch einen im anti-F9 Serum vorliegenden Antikörper inhibiert werden konnte. Über einen tryptischen Verdau von Membranen der EC-Zellen konnte ein Protein isoliert werden mit einer Masse von 84 kDa. Die Tatsache, dass das Protein durch immobilisiertes Concanavalin A retardiert wurde, deutete darauf hin, dass es sich um ein Glykoprotein handeln musste. Bestätigt werden konnte dies durch die Kultivierung von EC-Zellen mit radioaktiv markierten Monosacchariden wie Galaktose, Fukose und Mannose, die nach anschließender Analyse des isolierten 84 kDa Proteins wieder gefunden werden konnten (Hyafil et al., 1980). Etwas später wurde dann deutlich, dass die Kultivierung von Embryonen im Morulastadium unter Abwesenheit von Calciumionen, ebenso wie die Inkubation mit anti-F9 Serum, zur Dekompaktierung von Blastomeren führte (Hyafil et al., 1981). Die Zelladhäsion im frühen Mausembryo ist also auch abhängig von Konzentration an Calciumionen. Calciumionen sind essentiell für die Funktion von Cadherinen, wie durch die Behandlung von EC-Zellen mit Trypsin in Anwesenheit von Calcium (Brault et al., 2001) bzw. EDTA gezeigt werden konnte. Die Anwesenheit von Calciumionen schützte das als 84 kDa isolierte E-Cadherin Fragment, das aus der Membran-nahen Proteolyse der extrazellulären Domäne resultierte, vor einer weiteren Spaltung. Die Abwesenheit von Calcium führte zur Bildung eines 36 kDa Fragments. Es war daher offensichtlich, dass E-Cadherin nicht nur in der Lage war, Calciumionen zu binden sondern auch, dass diese Bindung an spezifischen Stellen erfolgen musste wodurch die Assoziation von Trypsin mit diesen Regionen und die damit verbundene Spaltung (Hyafil et al., 1981) blockiert wurde. Über diese Methode wurde E-Cadherin (wie andere Cadherine ebenfalls) zunächst nur über kleinere Fragmente aus unterschiedlichen Spezies wie Maus (gp84) (Shirayoshi et al., 1983), Mensch (Uvomorulin, cell-CAM120/80) (Damsky et al., 1983), Huhn L-CAM (Gallin et al., 1983) und Hund (Arc-1) (Behrens et al., 1985; Imhof et al., 1983) identifiziert. Die Identifikation des vollständigen Proteins gelang dann 1984 durch die Bindung des monoklonalen Antikörpers ECCD-1 als ein 124 kDa Protein auf der Oberfläche von Hepatozyten (Ogou et al., 1983).

## Einleitung

### 4.3.1 Molekulare Grundlagen der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion

Die E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion erfolgt wie bei allen Vertretern der klassischen Cadherine über die etwa 80 – 150 kDa große, extrazelluläre Domäne, die sich in mehrere Subdomänen unterteilt. Jede dieser Subdomänen besteht aus über 110 sich wiederholenden Aminosäureresten, die sich zu zwei gegenüberliegenden  $\beta$ -Faltblättern arrangieren (Shapiro and Weis, 2009). E-Cadherin besitzt wie die anderen Vertreter der Typ I Cadherine, fünf EC Domänen (EC1 bis EC5), die tandemartig angeordnet sind. Jede EC-Domäne wird von zwei bis drei Exons codiert (van Roy and Berx, 2008), (**Abb. 3**). Am Übergang zweier Subdomänen sind drei Calciumionen lokalisiert, bei E-Cadherin sind es insgesamt 12 Ionen pro Molekül. Daraus resultiert eine bestimmte Konformation und Rigidität der extrazellulären Domäne. Die Bindung der Calciumionen erfolgt durch das am stärksten konservierte Bindungsmotiv der Cadherine DRE (AS 67-69) bzw. DXNDN (AS 100-104), zusammengefasst in (van Roy and Berx, 2008).



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau der extrazellulären Domänen von humanem E-Cadherin.** Dargestellt sind die Abfolge der EC Domänen in Bezug zur Exon Zuordnung (rote Ziffern), im speziellen der Aufbau der EC1 Domäne und der zytosomatischen Domäne. In der zytosomatischen Domäne sind die Motive der homophilen Interaktion sowie die Bindemotive für Calciumionen gezeigt. Die zytosomatische Domäne gliedert sich in einen juxtamembranären und einen distalen Teil. Der juxtamembranäre Teil schließt unter anderem die Bindedomäne für das p120 Catenin (AS 742 – 772) ein, der distale Teil die Bindedomäne für beta-Catenin. S, Signalpeptid; Pro, Pro-Peptid; CD, Z(C)ytosomatische Domäne; BD, Bindedomäne; CK, Caseinkinase; GSK3β, Glykogen-Synthasekinase 3β; N, N-Terminus; C, C-Terminus, TM, Transmembrandomäne; BM, Bindemotiv; \* Epitop des Antikörpers DECMA-1. Modifiziert nach (van Roy and Berx, 2008) 17

## Einleitung

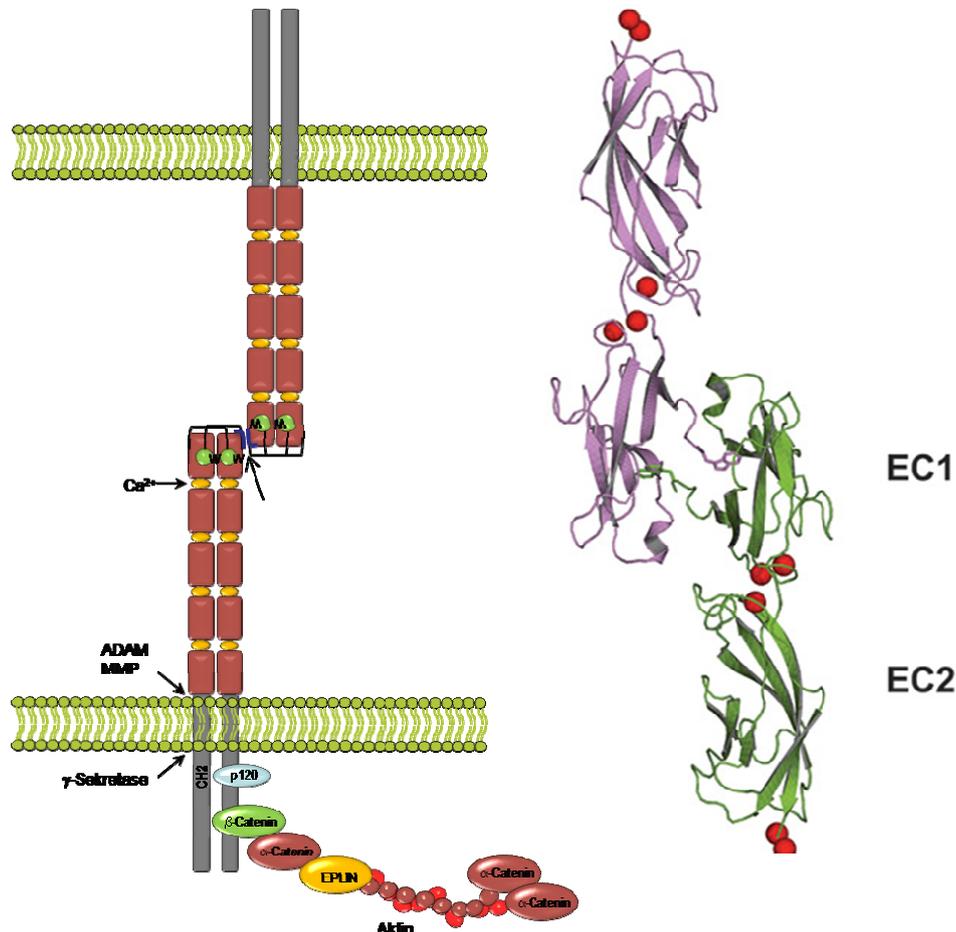
---

Erstaunlicherweise führt die Substitution D/K oder D/A in nur einer Calcium-Bindestelle bereits dazu, dass diese mutante Form von E-Cadherin nicht mehr fähig ist eine Adhäsionsverbindung zu bilden (Ozawa et al., 1990). Vor allem für die Interaktion von gegenüberliegenden Zellen (Transinteraktion) ist die Anwesenheit von Calciumionen und die damit verbundene Rigidität essentiell, bei Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  liegt die extrazelluläre Domäne vor allem als cis-Dimer vor. Die Interaktion zwischen Zellen erfolgt meist homotypisch und homophil, daher assoziieren bevorzugt Cadherinmoleküle derselben Subklasse miteinander. Die eher seltene Assoziation zwischen verschiedenen Cadherinen wie z.B. zwischen N-Cadherin und R-Cadherin ist allerdings auch beobachtet worden (Shan et al., 2000).

Die Extrazelluläre Domäne EC1 wurde als Schlüsseldomäne für die Zell-Zell Interaktion und Adhäsion identifiziert. Sie besitzt eine hydrophobe Tasche, in die ein Tryptophanrest an Position 2 (W2) eines kleinen an EC1 lokalisierten Peptids, binden kann. Über diese Bindung scheint zum Einen die Anlagerung von zwei gegenüberliegenden E-Cadherin Molekülen (**Abb. 4**) als auch die Anlagerung von Molekülen auf der gleichen Zelloberfläche reguliert zu werden. Die Dissoziationskonstante für die Dimerisierung von E-Cadherin liegt in Abhängigkeit dieser Regulation zwischen 80 – 720  $\mu\text{M}$  (Haussinger et al., 2004). Als weiteres Motiv konnte die HAV-Domäne (Histidin-Alanin-Valin) identifiziert werden. Diese, nur bei Typ I Cadherinen gefundene Domäne, scheint bei der Regulation der Anlagerung zweier Adhäsionsmoleküle eine entscheidende Rolle zu übernehmen. Die intrazelluläre Domäne von E-Cadherin (Exon 14-16; AS 677 – 706) bindet die zur Armadillo-Familie gehörenden Proteine  $\beta$ -Catenin und p120 Catenin über ihr sogenanntes Armadillo-Motiv. Die Bindung von  $\beta$ -Catenin an E-Cadherin erfolgt bereits nach der Proteinsynthese im endoplasmatischen Retikulum (Hinck et al., 1994). Die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit der zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin ist essentiell für die korrekte Faltung sowie der daraus resultierenden Funktionalität und der der Stabilität von E-Cadherin. Interessanterweise ist die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin in Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin ungefaltet (Huber et al., 2001), daher ist die Interaktion beider Proteine für die Lokalisierung an der Membran essentiell ist. Die Affinität von  $\beta$ -Catenin an die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin zu binden wird reguliert über verschiedene Phosphorylierungsstellen in der  $\beta$ -Catenin Bindedomäne (BD), die in einem Peptid der Aminosäuren 833 – 862 (murines E-

## Einleitung

Cadherin) bzw. 831 – 860 (humanes E-Cadherin, **Abb. 3**). Vor allem die Phosphorylierung der Serin-Reste (S-840, S-853 und S-855) durch Caseinkinase II (CK II) sind essentiell für die Bindung von  $\beta$ -Catenin an diese Domäne (Lickert et al., 2000).



**Abbildung 4: Trans-Dimerisierung von E-Cadherin.**

Im Schema dargestellt sind auf der linken Seite die extrazellulären Domänen des E-Cadherin Transdimers, sowie die Bindung von  $\beta$ -Catenin, das über  $\alpha$ -Catenin und EPLIN mit dem Aktinskelett verknüpft ist und p120 Catenin.  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen sind im Schema als gelbe Kugeln gezeigt. W bezeichnet den Tryptophanrest 2 des Linkerpeptids. Die Proteinstruktur eines EC1 Transdimers ist auf der rechten Seite dargestellt,  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen sind hier als rote Kugeln gezeigt. Modifiziert nach (Shapiro and Weis, 2009).

Neben seiner essentiellen Rolle als Bindungspartner für E-Cadherin, ist  $\beta$ -Catenin Mediator des Wnt-Signalweges und besitzt daher eine duale Rolle, zum einen an der Zellmembran und zum anderen im Zellkern. Der Wnt-Signalweg ist essentiell für viele Prozesse der Embryonalentwicklung. Der homozygote Verlust von  $\beta$ -Catenin führt während der Embryogenese bis zur Entwicklung der Blastozyste, bricht aber dann aufgrund einer gestörten Gastrulation, durch welche die Bildung des Primitivstreifens

## Einleitung

---

und die Entwicklung des Mesoderms initiiert wird, ab (Haegel et al., 1995). Liegt ein Überschuss an  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma vor z.B. in Zellen, die zwar über Cadherin vermittelte Zelladhäsion, nicht aber über einen aktiven Wnt-Signalweg verfügen, wird das Protein über einen Destruktionskomplex abgebaut. Der Komplex besteht aus Axin2 (Conductin) einem Adaptermolekül, dass die weiteren Moleküle APC (Adenomatöse Polipolis Coli) und Glykogen-Synthase Kinase 3 (GSK-3), Caseinkinase 1- $\alpha$  (CK1- $\alpha$ ) sowie  $\beta$ -Catenin bindet. Dieser Komplex führt bei Abwesenheit von Wnt-Liganden zunächst zur Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch CK1- $\alpha$  an Ser45, dann an Ser33/37 und Thr41 durch GSK-3. Die Phosphorylierung führt dann zur  $\beta$ -TrCP vermittelten Ubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau. Die Bindung eines Wnt-Liganden an den Rezeptor Frizzled (Fzd) führt zur Aktivierung des Wnt-Signalweges woraus die Inhibition der GSK-3 Aktivität resultiert. Daraufhin wird  $\beta$ -Catenin stabilisiert und transloziert in den Kern wo es an die Transkriptionsfaktoren LEF1/TCF1 (Lymphocyte enhancing factor1/ T-Cell factor 1) binden kann, zusammengefasst in (Klaus and Birchmeier, 2008). Die Bindung an diese Transkriptionsfaktoren verdrängt die Bindung des Inhibitors Groucho und aktiviert die Expression von Wnt-Zielgenen.

An E-Cadherin gebunden, vermittelt  $\beta$ -Catenin über das außerdem gebundene  $\alpha$ -Catenin das wiederum mit dem Linkerprotein EPLIN (Abe and Takeichi, 2008) assoziiert ist, die Verknüpfung des interzellulären Raums mit dem Zytoskelett.  $\alpha$ -Catenin kann nicht direkt mit dem Aktinskelett interagieren. Über in vitro Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Catenin nur in monomerer Form an  $\beta$ -Catenin binden kann, aber für die Bindung an das Aktinskelett als Dimer vorliegen muss. Juxtamembran-ständig bindet das ebenfalls zur Familie der Armadillo-Proteine gehörende p120 Catenin an die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin. Dessen Funktion und Bedeutung für die E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

---

### 4.3.2 *Transkriptionelle und Posttranslationale Regulationen der E-Cadherin Expression*

#### a.) Transkriptionelle Regulation

Die Expression von E-Cadherin ist streng reguliert, so bestimmen unterschiedliche Mechanismen den Beginn, die Dauer und den Ort der Expression z.B. während der Differenzierung der Morula zur Blastozyste, der Gastrulation oder während der Organisation von Zellen und Geweben. Eine andere entscheidende Rolle spielt die Regulation von E-Cadherin während der Tumormetastasierung. Zellen am Rand des Tumors verlieren ihre E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion und nehmen einen mesenchymalen Phänotypen an woraus eine starke Erhöhung ihrer Motilität resultiert.

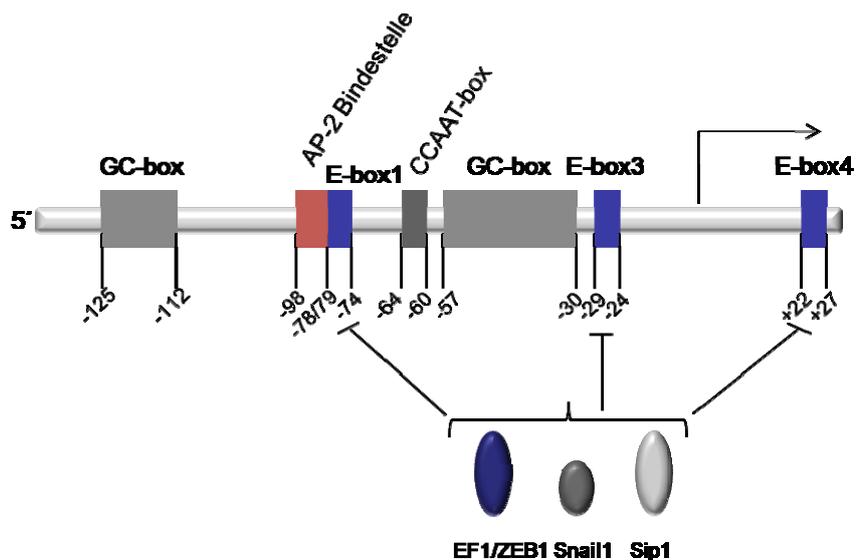
Auf genetischer Ebene kann die Transkription von E-Cadherin über verschiedene Mechanismen reguliert werden. Im Promotor des E-Cadherin Gens sind verschiedene regulatorische Elemente identifiziert worden, die E-Box Elemente, die an den Positionen -79 bis -74 (E-Box1), -29 bis -24 (E-Box 3) und +22 bis +27 (E-Box4) lokalisiert sind und die repressive Funktionen besitzen (**Abb. 5**) und zum anderen das Intron 2, das über cis-regulatorische Elemente verfügt und essentiell ist für die Aktivierung der E-Cadherin Expression (Stemmler et al., 2005).

Transkriptionsfaktoren, die an die E-Box Elemente im E-Cadherin Promotor binden und zu einer Repression der Expression führen sind vor allem Snail (Snail1) (Cano et al., 2000) sowie das Zink-finger/ Homeodomänen Protein Sip1 (Smad-interacting protein1, ZEB2) (Comijn et al., 2001) und der Zink-Finger Transkriptionsfaktor ZEB1(Park et al., 2008). Neben den repressorischen E-Box Elementen sind aber auch Bindestellen für c-Myc und Klf4 im E-Cadherin Promotor identifiziert worden, welche die Expression aktivieren. Während an der c-Myc vermittelten Aktivierung, c-Myc nur als Co-Faktor fungiert und zusammen mit dem Transkriptionsfaktor AP-2 binden muss (Batsche et al., 1998) scheint die E-Cadherin Expression in Fibroblasten direkt durch die Überexpression von Klf4 (durch Bindung an die möglichen Positionen -3615 und -3499; -2915 und -2853; -473 und -351 sowie bei +477 und +515 des E-Cadherin Gens) induziert zu werden (Li et al., 2010).

An der Expression dieser hauptsächlich Repressoren von E-Cadherin sind vor allem der MEK/ERK- und der TGF $\beta$ -Signalweg beteiligt. In MDCK Zellen konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 den EMT Prozess in einem Smad-unabhängigen

## Einleitung

Signalweg induziert und außerdem direkt die Expression von Snail1 aktivieren kann (Peinado et al., 2003). Außerdem sind MicroRNAs der Familie miR-200, welche die Expression von ZEB1/ZEB2 direkt auf mRNA Ebene negativ regulieren, beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von miR-200 in verschiedenen Tumorzelllinien zu einer Aktivierung der Expression von E-Cadherin führte (Park et al., 2008). Die Überexpression von Snail1, sowie Snail2 (Slug) und Proteine der ZEB-Familie führte in Epithelzellen zur epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT). Im Verlauf dieses Prozesses verlieren Epithelzellen ihren epithelialen Charakter und regulieren E-Cadherin über eine erhöhte Expression von Repressoren herunter und nehmen einen mesenchymalen Phänotyp ein (Thiery et al., 2009). Dieser Vorgang ist ein Kennzeichen der Metastasierung aber auch von natürlichen Prozessen wie der Mesodermbildung aus Epiblastzellen oder der in vitro Differenzierung embryonaler Stammzellen beobachtet werden (Eastham et al., 2007).



**Abbildung 5: Darstellung der Promotorregion des E-Cadherin Gens.**

Der E-Cadherin Promotor weist sowohl aktivierende als auch repressive Elemente auf. An die aktivierenden Elemente bindet AP-2 (Activator protein 2) zusammen mit c-Myc als Co-Faktor und initiiert so die Expression von E-Cadherin. Die Bindung von ZEB1/ZEB2 (Sip1) und/oder Snail1 an die E-box Elemente hingegen, führt zur Repression der E-Cadherin Expression. Modifiziert nach (van Roy and Berx, 2008).

### b.) Posttranslationale Regulation

Die Stabilisierung des E-Cadherin Proteins kann nach verschiedenen Mechanismen erfolgen. Neben der im Kapitel 3.3.1 besprochenen Stabilisierung durch die Bindung von  $\beta$ -Catenin an die zytoplasmatische E-Cadherin Domäne, bindet das ebenfalls zur Armadillo-Protein Familie gehörende p120 Catenin juxtamembran-ständig an E-

## Einleitung

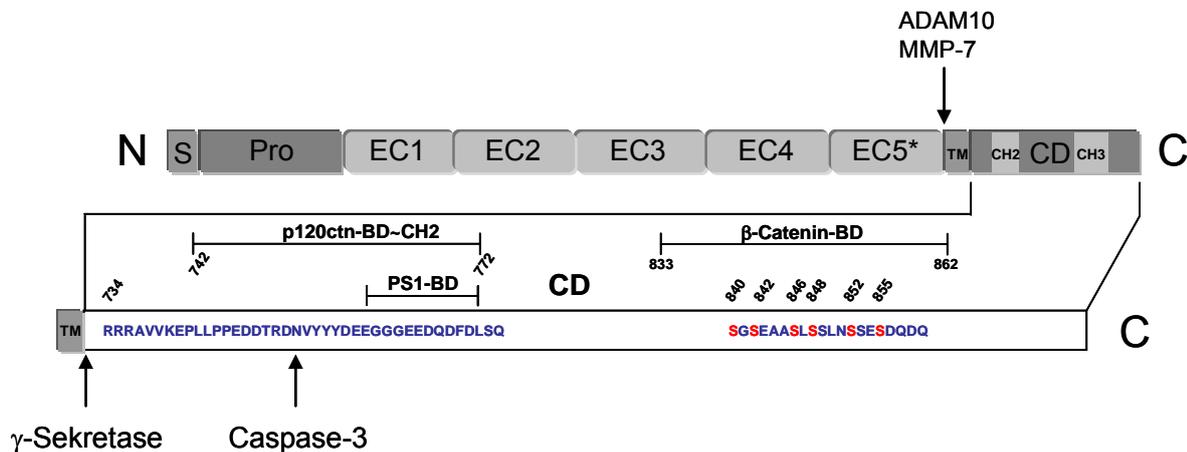
---

Cadherin. Durch die Bindung von p120 Catenin wird ein Motiv in der zytoplasmatischen Domäne besetzt, das durch die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin Kinasen wie den EGF-Rezeptor, phosphoryliert werden kann. Durch diese Phosphorylierung wird E-Cadherin für die Clathrin-vermittelte Endozytose markiert und im Folgenden entweder wieder verwendet und zurück an die Membran transportiert, oder es wird proteasomal degradiert. An beiden Prozessen ist die E3-Ubiquitinligase Hakai beteiligt (Fujita et al., 2002; Pece and Gutkind, 2002), die an das Phosphorylierungsmotiv bindet und die Polyubiquitinierung von E-Cadherin initiiert. Interessanterweise ist das Peptid, das Hakai bindet konserviert in allen klassischen Cadherinen, aber die Tyrosin-Reste, deren Phosphorylierung die Bindung von Hakai vermitteln, wurden nur bei E-Cadherin gefunden (Pece and Gutkind, 2002). Am Recycling-Prozess, dessen genauer Mechanismus noch nicht verstanden ist, nehmen Proteine der Rab-Familie (Rab5 und Rab7) teil und sorgen für die Dissoziation von Hakai und E-Cadherin, sowie für den Rücktransport von E-Cadherin an die Membran. Durch die Bindung von p120 kann daher die RTK-vermittelte Phosphorylierung von E-Cadherin und das Protein an der Membran stabilisiert werden (Ireton et al., 2002). Ähnlich wie  $\beta$ -Catenin kann p120 Catenin in den Zellkern translozieren und als transkriptioneller Aktivator fungieren (Reynolds, 2010; Rocznik-Ferguson and Reynolds, 2003). Wie  $\beta$ -Catenin kann p120 entweder an der Membran lokalisiert sein, oder es residiert im Kern wie es vor allem für viele Tumorzelllinien schon gezeigt werden konnte, die kein E-Cadherin exprimierten. Die Expression von E-Cadherin in diesen Zellen führte dann zu einem Export von p120 Catenin aus dem Kern, verbunden mit der Lokalisation an der Membran (van Hengel et al., 1999).

Der Protein Expressionslevel von E-Cadherin kann aber auch über die Aktivität von Proteasen reguliert werden. Intrazellulär kann die zytoplasmatische Domäne nahe der Membran unter Freisetzung eines 36 kDa Fragments durch Presenilin, eine Untereinheit des  $\gamma$ -Sekretase Komplexes, gespalten werden (Marambaud et al., 2002). Es wird diskutiert, ob dieses Fragment ähnlich wie  $\beta$ -Catenin die Fähigkeit besitzt in den Kern zu translozieren und dort Zielgene zu aktivieren, tatsächlich scheint diese Translokation aber auf die teilweise noch gebundenen Proteine p120 Catenin bzw.  $\beta$ -Catenin zurückzuführen sein (Ferber et al., 2008). Ein weiterer Mechanismus der in Zellen der humanen Mammarkarzinom Zelllinie MCF-7

## Einleitung

gefunden wurde, ist die über Matrixmetalloproteasen (MMPs) vermittelte proteolytische Spaltung der extrazellulären Domäne von E-Cadherin. Das dabei freigesetzte Fragment kann wiederum die E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion noch vorliegender Adhäsionsverbindungen stören. Vor allem MMP-3 (Stromelysin 1) und MMP-7 (Matrilysin) scheinen an diesem Prozess beteiligt zu sein. Humanes E-Cadherin konnte über diese Spaltungsprodukte aus Zellkulturüberständen von MCF-7 Zellen identifiziert werden. Ebenfalls für die Spaltung der extrazellulären Domäne von E-Cadherin ist ein Vertreter der ADAM-Proteasen, ADAM10, verantwortlich (Maretzky et al., 2005). Wie der  $\gamma$ -Sekretase Komplex sind auch die ADAM-Proteasen integrale Proteine und können so extrazelluläre Proteindomänen spalten (**Abb. 6**).



**Abbildung 6: Proteolytische Spaltungsstellen des E-Cadherin Proteins.**

Die Spaltung der extrazellulären Domäne erfolgt durch ADAM10 (A disintegrin and metalloprotease member 10) oder MMP-7 (Matrix metalloprotease 7, Stromelysin 1). Das „Shedding“ durch ADAM10 wurde in MCF-7 Zellen nachgewiesen. Die Spaltung durch  $\gamma$ -Sekretase erfolgt juxtamembranständig und resultiert in der Bildung eines zytoplasmatischen Fragments. Modifiziert nach (van Roy and Berx, 2008)

Eine zur Furin-Familie gehörende Endoprotease (Stemmler, 2008) ist an der Aktivierung von membranständigem E-Cadherin beteiligt. E-Cadherin wird zunächst als Prä-Protein auf der Zelloberfläche präsentiert und erst die Spaltung des Pro-Peptids führt zu seiner Aktivierung (Haussinger et al., 2004). Erst durch die Spaltung wird die EC1-Domäne freigegeben und die Bildung von Adhäsionskomplexen kann erfolgen.

### 4.3.3 E-Cadherin während der frühen Embryogenese und Organogenese

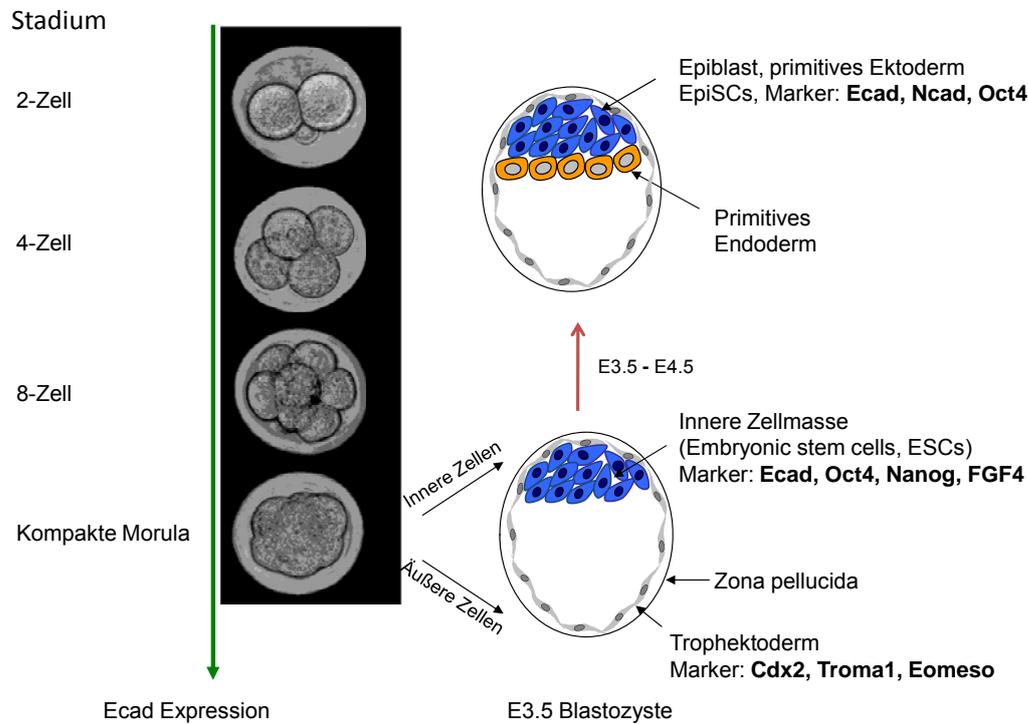
Die Embryogenese beginnt mit der Fusion der Gameten, der Oozyte und dem Spermium. Die folgenden Furchungsteilungen dieser Fusionszelle führen über das 2-Zell Stadium zur frühen Morula, dem 8-Zell Stadium. Während dieser Prozesse ist E-Cadherin bereits exprimiert, wird aber erst während des Überganges der frühen Morula zur kompakten 16-Zell Morula essentiell. Die Expression von E-Cadherin zum Zeitpunkt der Morulakompaktierung ist entscheidend für deren Differenzierung in die Blastozyste und für die weitere Entwicklung des Embryos (De Vries et al., 2004). Für diesen Prozess sind sowohl die Anwesenheit als auch die Bindung von Calciumionen durch E-Cadherin essentiell, so konnten Embryonen im Morulastadium in vitro dekompaktiert werden wenn diese unter Abwesenheit von Calciumionen kultiviert wurden (Shirayoshi et al., 1983). In einem Mausmodell konnte außerdem durch die gezielte Mutation der Calcium-bindenden Domänen von E-Cadherin bestätigt werden, dass die Bindung von Calcium essentiell war für die Adhäsion der Blastomeren. Die Mutation sämtlicher Calcium-Bindedomänen führte zur defekten Verdichtung der Morula und schließlich zum Absterben von Embryonen, die homozygot für diese Mutation waren (Riethmacher et al., 1995).

Die Störung der E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion durch neutralisierende Antikörper wie DECMA-1 führte ebenfalls zu einer Aufhebung der kompakten Strukturen des frühen Embryos (Vestweber and Kemler, 1985) und zur Abrundung der Blastomeren, die morphologisch einem Bündel Trauben ähnelten. Aus dieser morphologischen Erscheinung der dekompaktierten Morula leitet sich der Name Uvomorulin (uva = lat. Traube) ab (Hyafil et al., 1981). In einer folgenden Studie zeigte die Kultivierung von murinen Embryonen ab dem 8-Zellstadium unter Anwesenheit von ECCD-1 nicht nur einen Defekt in der Entwicklung des Embryos, sondern führte auch zur fehlerhaften Bildung der inneren Zellmasse (Shirayoshi et al., 1983).

Die Entwicklung der Blastozyste geht einher mit der Bildung des Trophektoderms, dem ersten Epithel, das sich im Verlauf der Embryogenese aus den außen liegenden Zellen der Morula entwickelt und das die innere Zellmasse (ICM, primitives Ektoderm) umschließt (**Abb. 7**). Das Trophektoderm ist selber wiederum umschlossen von der Zona pellucida, einer Schicht aus Glykoproteinen und Mucopolysacchariden, es exprimiert die Marker Cdx2, Troma1 und Eomesodermin (Eomeso) und bildet die Plazenta. Die innere Zellmasse (ICM), geht aus den innen liegenden

## Einleitung

Zellen der Morula hervor und exprimiert die Pluripotenzgene Oct4 und Nanog sowie die Oberflächenmarker E-Cadherin und SSEA-1 (in der ICM muriner Blastozysten).



### Abbildung 7: Frühe Embryonalentwicklung und Differenzierung der Blastozyste.

Verschiedene Stadien der frühen Embryogenese und Entwicklung der Blastozyste der Maus ausgehend vom 2-Zellstadium. Der grüne Pfeil indiziert die Anwesenheit von E-Cadherin. Die Morula differenziert in die Blastozyste. FGF4, Fibroblast growth factor 4; Cdx2, Caudal type homeobox transcription factor 2; EpiSCs, Epiblast stem cells.

Im Verlauf der weiteren Entwicklung differenzieren Zellen der ICM und bilden das primitive Endoderm, das an der Bildung extraembryonaler Strukturen beteiligt ist. Die verbleibende ICM entwickelt sich zum primitiven Ektoderm oder Epiblast, aus dem der eigentliche Embryo hervorgeht. Mit dem Einsetzen der Gastrulation (E6,5 - E7,5 in der Embryogenese der Maus; E, embryonic day) bildet sich eine innere, aus etwa 1000 Zellen bestehende Höhle, mit der Form eines Bechers. An der Außenseite dieser Struktur bildet sich der Primitivstreifen, der Ort der Mesodermentwicklung. Proliferierende Epiblastzellen differenzieren in mesodermale Zellen nach dem Durchwandern des Primitivstreifens (Tam and Loebel, 2007). Dieser Übergang geht einher mit dem Verlust der E-Cadherin Expression und erhöhter Expression von N-Cadherin. Die Expressionen von E- und N-Cadherin werden nach der Gastrulation streng räumlich kontrolliert. Während einige ektodermale Zellen und die Zellen des Endoderms weiterhin E-Cadherin exprimieren, geht die Expression in einem großen Teil der ektodermalen Zellen und in Zellen des Mesoderms verloren und wird durch

## Einleitung

---

N-Cadherin ersetzt. Ein anderer Prozess, bei dem die Expression von E-Cadherin und N-Cadherin aber erhalten bleibt, ist die Bildung des Neuralrohrs, das sich von der Neuralplatte durch einen Zellsortierungsmechanismus ablöst. Die Zellen der Neuralplatte exprimieren als Teil des Ektoderms zunächst E-Cadherin, beginnen dann aber während der Ausbildung von Neuralwülsten die Expression von N-Cadherin und N-CAM. Das noch angrenzende Ektoderm exprimiert aber weiterhin E-Cadherin. Die Einstülpung der Neuralplatte führt dann zu einer Abtrennung von der ektodermalen Umgebung und einem separierten Neuralrohr, dessen Zellen N-Cadherin exprimieren. Die Ablösung des Neuralrohrs ist nur wegen der geringeren Adhäsionswirkung des N-Cadherins möglich (Detrick et al., 1990).

Obwohl E-Cadherin und N-Cadherin zu 64 % bzw. 70 % (Vergleich der extrazellulären bzw. intrazellulären Domänen) homolog sind, besitzen sie doch unterschiedliche Funktionen, wie in einem eleganten Mausmodell gezeigt werden konnte. In diesem Modell wurde die codierende Sequenz von N-Cadherin in den Locus des E-Cadherin Gens gesetzt (knock-in) und damit unter die Kontrolle des E-Cadherin Promotors. Die zeitliche und räumliche Expression von E-Cadherin wurde somit vollständig gegen N-Cadherin substituiert.

Interessanterweise konnte die Funktion von E-Cadherin während der Kompaktierung der Morula durch N-Cadherin substituiert werden, selbst wenn beide E-Cadherin Allele gegen N-Cadherin ausgetauscht wurden. Die weitere Entwicklung dieser  $Ecad^{NcadGFP/NcadGFP}$  Morula zur Blastozyste war aber durch eine fehlerhafte Bildung von Trophektoderm nicht möglich (Kan et al., 2007). Begründet werden kann dies sowohl mit der Tatsache, dass E-Cadherin stärkere Adhäsionsverbindungen bildet als N-Cadherin (drei bis vierfach) als auch mit der unterschiedlichen Aktivierung von Signalwegen, vermittelt durch die zytoplasmatischen Domänen. Der beobachtete Phänotyp des N-Cadherin knock-ins war auf der Ebene der ES-Zellen mit dem des  $Ecad^{-/-}$  Phänotypen vergleichbar. Dennoch waren die ES-Zellen der homozygoten N-Cadherin Mutanten in der Lage Teratome zu bilden, die neuro-epitheliäre Strukturen zeigten (Kan et al., 2007).

### **4.4 Embryonale Stammzellen (ES-Zellen)**

ES-Zellen stellen eine definierte Population pluripotenter Zellen dar, die in alle Zellen des Organismus außer in extraembryonale Linien wie Trophoblastzellen

## Einleitung

---

differenzieren können. Das Potential in alle Zellen des Organismus zu differenzieren, besitzen nur totipotente Zellen, wie die Zygote und die Blastomeren (Yu and Thomson, 2008). ES-Zellen werden aus der inneren Zellemasse (ICM) von Embryonen vor der Einnistung (Prä-Implantationsstadium, E3-E4 der Mausentwicklung) gewonnen und verfügen über ein hohes, theoretisch unendliches Proliferationspotential. Die Proliferation von ES-Zellen geht dabei einher mit der Erhaltung des vollständigen pluripotenten Potentials (*self-renewal*). Embryonale Stammzellen sind daher ein in vitro Modellsystem, das Einblicke in die frühe Embryonalentwicklung von Mensch und Maus erlaubt. Die gezielte Differenzierung dieser Zellen z.B. in Hepatozyten oder Kardiomyozyten ermöglicht außerdem die Analyse von pharmakologischen Wirkstoffen.

### 4.4.1 Isolierung Embryonaler Stammzellen

Erste Einblicke in die Natur pluripotenter Zellen wurden aus frühen Studien (um 1950) an malignen Tumoren der Keimbahnzellen, den Teratokarzinomen, erhalten. Diese Tumore traten spontan in einem Inzuchtstamm der Linie 129 mit einer Inzidenz von ~1% auf (Stevens and Little, 1954), konnten aber außerdem durch den ektopischen Transfer von Embryonen aus dem Uterus heraus in andere Organe wie den Nieren erzeugt werden. Da diese Tumore hochdifferenziert waren und Derivate aller drei Keimblätter enthielten wie z.B. neurale Rosetten (Ektoderm), einfache und komplexe (sekretorische) epitheliäre Strukturen (Endoderm) und Muskelfasern, die aus dem Mesoderm abstammen (Solter et al., 1970) lag der Schluss nahe, dass Embryonen Zellen enthalten mussten, die ein solches Differenzierungspotential besaßen. Weiterhin wurde deutlich, dass in den Teratomen ein geringer Anteil von Zellen residierte, die sich in einem undifferenzierten pluripotenten Zustand befanden und die weiterhin das Potential zur Bildung von Teratomen besaßen und die sich von den injizierten Embryonen ableiteten. Aus diesen Zellen konnten die ersten stabilen embryonalen Karzinomzelllinien (embryonic carcinoma, EC) etabliert werden (Kahan and Ephrussi, 1970). Diese EC-Zellen exprimieren Antigene und Proteine, die auch in Zellen der inneren Zellmasse identifiziert werden konnten (Solter and Knowles, 1978).

Bis 1981 erfolgte die Isolierung pluripotenter EC Zellen ausschließlich über die Bildung von Teratomen. Erst dann gelangt die Isolation von embryonalen Stammzellen direkt aus Blastozysten der Mauslinie 129/SvE. Die isolierten

## Einleitung

---

Blastozysten wurden auf mitotisch inaktivierten Fibroblasten co-kultiviert unter Bedingungen wie sie bereits für die EC-Zellen etabliert wurden (Martin and Evans, 1975). Die innere Zellmasse konnte so aus der Blastozyste herauswachsen und die erste stabile ES-Zelllinie etabliert werden (Evans and Kaufman, 1981). In einer Weiterentwicklung gelang dann die Etablierung von ES-Zellen auch aus einzelnen Blastomeren von Embryonen zwischen dem 2-Zell bis 8-Zellstadium (Chung et al., 2006).

Im Gegensatz zu ES-Zellen waren nur wenige der EC-Linien fähig in die Blastozyste zu integrieren und Chimäre zu bilden, zusammengefasst in (Yu and Thomson, 2008). Dieses geringe Entwicklungspotential war vermutlich auf die genetische Instabilität der EC-Zellen zurückzuführen (Atkin et al., 1974). Weiterhin sind neben den EC- und ES-Zellen auch Stammzelllinien etabliert worden, die sich z.B. aus dem Epiblasten ableiten, EpiSCs (Brons et al., 2007). Primordiale Keimbahnzellen (engl. primordial germ cells, PGCs), aus denen sich die Gameten entwickeln, leiten sich vom Epiblasten ab, und migrieren dann den Darm entlang in die Gonaden, dort angekommen differenzieren die dann als embryonale Keimbahnzellen (embryonic germ cells, EGs) bezeichneten pluripotenten Zellen zu Oozyten oder Spermien (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992)

### **4.5 Das transkriptionelle Netzwerk in murinen embryonalen Stammzellen**

Das transkriptionelle Netzwerk von Zellen kann allgemein unterteilt werden in ein extrazelluläres und ein intrazelluläres System, die beide miteinander interagieren. Das extrazelluläre System beinhaltet lösliche Faktoren oder Proteine der extrazellulären Matrix (ECM), die zum einen durch das Serum des Mediums zugeführt werden, die von den Zellen selber sezerniert werden und autokrin wirken, oder aber Faktoren, die in einem Co-Kultur System ausgetauscht werden, wie z.B. zwischen mitotisch inaktivierten Fibroblasten (INAKs) und embryonalen Stammzellen. Vor allem für die Kultivierung humaner embryonaler Stammzellen (hES Zellen) konnte gezeigt werden, dass INAKs, die im Medium humaner Stammzellen kultiviert wurden, eine Vielzahl löslicher Faktoren wie z.B. Cytokine sezernieren (konditioniertes Medium) (Diecke et al., 2008). Die Sezernierung war dabei abhängig von der Aktivierung des FGF Rezeptor I-Signalweges durch Bindung des Liganden FGF-2. Ein ähnliches System, das allerdings die Aktivierung des FGF-Signalweges durch FGF4 beinhaltet, konnte für die Etablierung von murinen Trophoblast-

## Einleitung

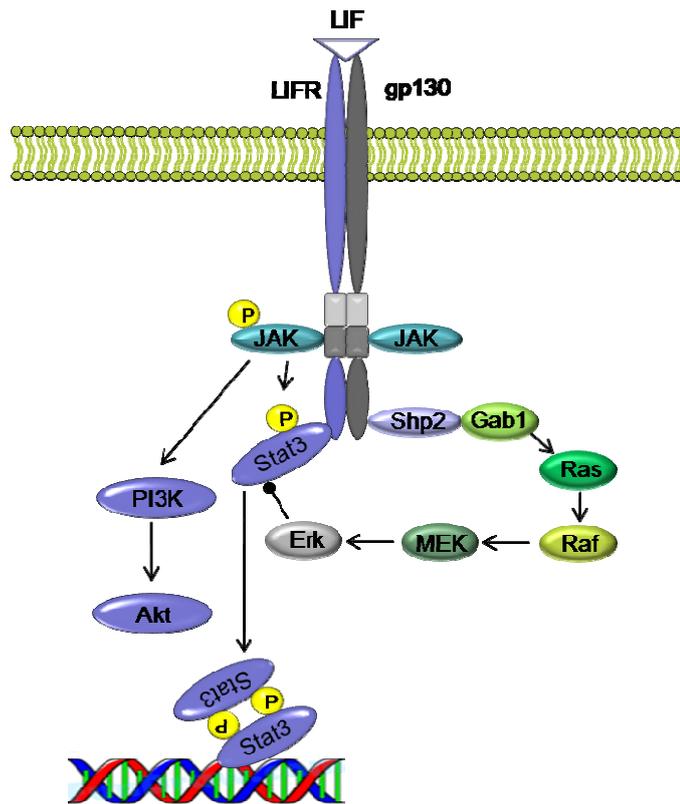
---

Stammzellen identifiziert werden (Quinn et al., 2006). Über die Aktivierung des FGF-Rezeptor Signalwegs kommt es zur Auslösung einer Signalkaskade, die durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Expression von Zielgenen führt. Im Gegensatz zum konditionierten Medium, das für die Kultivierung von hES-Zellen verwendet wird, konnte durch die Kultivierung von murinen ES-Zellen in Medium, das von Leberzellen der Ratte konditioniert wurde, ein einziger, löslicher Faktor identifiziert werden. Dieser Faktor ermöglichte das undifferenzierte Wachstum von murinen ES-Zellen in der Abwesenheit von Fibroblasten und wurde als Leukämie-inhibitorischer Faktor (Leukemia-inhibitory factor), LIF identifiziert (Smith et al., 1988). LIF/DIA (Differentiation inhibiting activity) ist ein Cytokin, das über die Bindung an den LIF-Rezeptor und das Glykoprotein 130 (gp130) zur Aktivierung des JAK/STAT (Januskinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription) Signalwegs führt (Yoshida et al., 1994). Zu den Cytokinen, die zur Aktivierung des STAT-Signalweges führen gehören außer LIF noch Interleukin-6 (IL-6) und Onkostatin M. Nach erfolgter Bindung des Liganden an den Rezeptor (LIFR- $\alpha$ , IL-6R, OSMR) heterodimerisieren diese mit gp130 und es kommt zur Rekrutierung von Januskinasen. Diese Kinasen verfügen über zwei aktive Zentren und können sowohl sich selber phosphorylieren (Autophosphorylierung), und den Rezeptor, an den sie rekrutiert wurden als auch die STATs, phosphorylieren. Die gegenseitige Phosphorylierung von Tyrosinresten der rezeptorgebundenen JAKs erhöht ihre Kinaseaktivität. Die JAKs phosphorylieren dann Tyrosinreste des Rezeptors. STAT3 bindet über seine SH2 (Src-Homologie) ein phospho-Tyrosin Motiv im gp130 und wird durch die JAKs an Tyrosin-705 phosphoryliert und somit aktiviert. Das aktivierte STAT3 dimerisiert über die SH-2 Domänen und transloziert so in den Kern um Zielgene wie c-Myc zu aktivieren (**Abb. 8**).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von STAT3 durch LIF bei Anwesenheit von Serum ausreichend ist, für die Selbsterneuerung von murinen embryonalen Stammzellen (Matsuda et al., 1999). Diese Aktivierung kann aber auch synchron zur Aktivierung des Ras/ MEK/ ERK-Signalweges führen (Takahashi-Tezuka et al., 1998), der die STAT3 Phosphorylierung und damit die Aktivierung inhibiert (Tian and An, 2004). Dieser Mechanismus scheint vor allem während der Differenzierung bei LIF Abwesenheit eine wichtige Rolle zu spielen. Im Serum-freien Medium kann LIF alleine allerdings den pluripotenten Zustand von ES-Zellen nicht erhalten, aber in Kombination mit Proteinen der BMP-Familie (Bone morphogenetic

## Einleitung

proteins), die im Serum vertreten sind. BMPs als Vertreter der TGF $\beta$ -Superfamilie signalisieren über die SMAD (son of mother against decapentaplegic) Proteine 1, 5 und 8 und induzieren die Expression von Inhibitoren der Differenzierung (ID Proteine), wie z.B. ID-1. Die BMP-induzierte Expression von ID-1, kann die Differenzierung von ES-Zellen inhibieren und zusammen mit STAT3 das Potential zur Selbsterneuerung erhalten (Ying et al., 2003).



**Abbildung 8: LIF-abhängige Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges.**

Die LIF-induzierte Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges führt zur Aktivierung der Janus-Kinasen (JAK), die wiederum die Dimerisierung von STAT3 initiieren. Die JAK vermittelte Phosphorylierung von gp130 kann außerdem zur Aktivierung des MEK/ERK- und PI3-Kinase Signalweges führen.

Tatsächlich aber spielen JAK/STAT3 und BMP *in vivo* keine Rolle für die Erhaltung der Pluripotenz der inneren Zellmasse, daher scheinen in der Blastozyste andere Signalwege essentiell zu sein. Es muss daher spekuliert werden, dass diese Signalwege bei anderen Prozessen der frühen Entwicklung eine essentielle Funktion übernehmen, die scheinbar *in vitro* noch vorhanden ist. Eine der Funktionen des gp130/STAT3 Signalweges scheint vor allem die Erhaltung des Entwicklungspotentials von Embryonen vor der Einnistung zu sein. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Embryonen im Blastozysten-Stadium verharren, wenn die Einnistung verhindert wurde. Im Gegensatz zu Embryonen, welche eine Expression von gp130 zeigten, konnten gp130 Mutanten (homozygoter Funktionsverlust von gp130) nicht in der Entwicklung fortfahren (Nichols et al., 2001). Dieser Arrest in der Embryonalentwicklung findet natürlicherweise in der Diapause statt, ein Ruhezustand den einige Säugetiere einnehmen beispielsweise während des Winterschlafs oder in der Laktationsphase. Da embryonale Stammzellen aus

## Einleitung

---

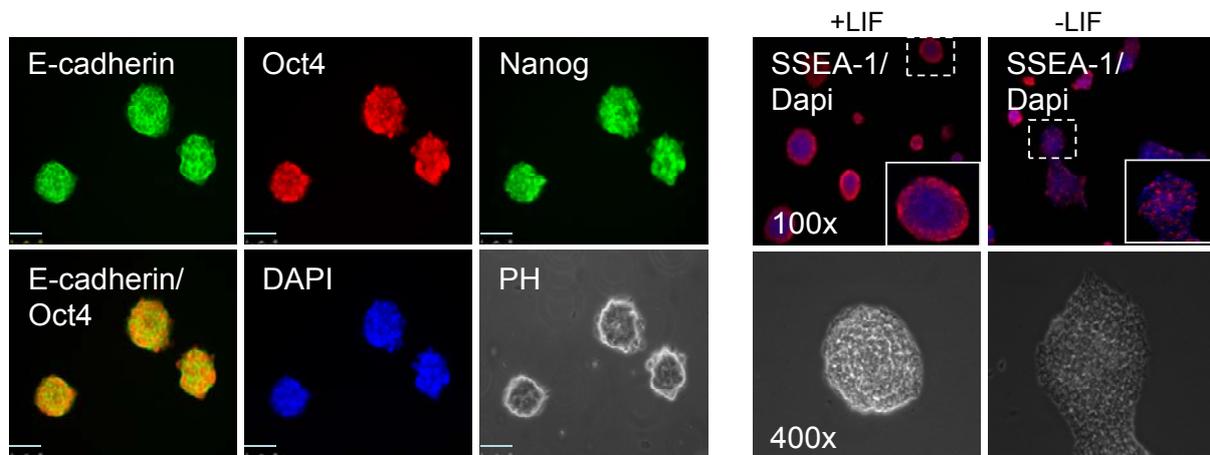
noch nicht eingenisteten Embryonen entnommen werden, scheint dieser Signalweg weiterhin in den späteren murinen embryonalen Stammzellen für die Erhaltung des pluripotenten Zustands notwendig zu sein. Außer diesen übergeordneten Signalwegen sind vor allem die Expression und die Interaktion der Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog für die Erhaltung bzw. die Induktion des Pluripotenten Zustands relevant. Oct4 gehört zur Familie der Octamer bindenden POU (Pit-Oct-Unc)-Familie von Transkriptionsfaktoren und bindet an die Sequenz 5'-ATTTGCAT-3' (Boyer et al., 2005).

Die Expression von Oct4 wird reguliert über einen distalen und einen proximalen Enhancer und ist stark eingeschränkt. So sind Oct4 positive Zellen nur in der inneren Zellmasse sowie in den Gonaden zu finden. Die Oct4 Level ist vor allem kritisch während der Embryonalentwicklung, so führt ein Verlust von Oct4 zur embryonalen Letalität (Kehler et al., 2004). Die Überexpression von Oct4 in embryonalen Stammzellen hingegen führt zu deren Differenzierung in primitives Endoderm und Mesoderm (Niwa et al., 2000). Oct4 heterodimerisiert mit dem zur SRY (sex determining region Y)-box-gehörenden HMG (high mobility group)-Box (SOX) Familie gehörenden Transkriptionsfaktor Sox2. Im Gegensatz zu Oct4 ist Sox2 in verschiedenen Geweben des Organismus exprimiert und ist neben Sox1 an der Entwicklung des Zentralnervensystems und der Augen beteiligt. Die Expression von Sox2 ist essentiell für die Selbsterneuerung undifferenzierter embryonaler Stammzellen. Sox2 reguliert zusammen mit Oct4 die Expression des zur Familie des Homeobox-Protein gehörenden Transkriptionsfaktors Nanog (abgeleitet aus dem irischen Tír na nÓg, „Land der ewigen Jugend“). Nanog wurde als ein Faktor identifiziert, der unabhängig von der STAT3-Aktivierung durch LIF exprimiert und reguliert wird (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Der LIF/LIFR/gp130 induzierte JAK/ STAT3-Signalweg spielt zwar für die in vitro Kultivierung von murinen ES-Zellen eine zentrale Rolle, ist aber nicht essentiell für die Erhaltung pluripotenter Zellen (in der ICM) des frühen Embryos und humaner Stammzellen (Thomson et al., 1998). Im Mausmodell konnten gezeigt werden, dass der komplette Verlust von gp130 die Gastrulation und die Organogenese von Embryonen nicht beeinflussten. Tatsächlich aber hat LIF während der Entwicklung von Nephronen der Niere einen erheblichen Einfluss. Während dieses Prozesses durchläuft das Nierenmesenchym eine mesenchymale-epitheliale Transition, die durch Ureterepithelzellen induziert

## Einleitung

wird. Letztere sezernieren LIF, das von den Nierenmesenchymzellen, die den LIF-Rezeptor exprimieren, gebunden wird (Barasch et al., 1999).

Die drei Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog bilden den zentralen Transkriptionsfaktorkomplex (TF-Komplex) für die Erhaltung des pluripotenten Status sowie der Fähigkeit zur Selbsterneuerung in pluripotenten Zellen, die entweder in der inneren Zellmasse residieren oder als in vitro System etabliert sind. Neben E-Cadherin und diesen Transkriptionsfaktoren exprimieren mES-Zellen auf der Oberfläche ein Kohlenhydratmotiv, dass von einer Fucosyltransferase (Fut4) auf Proteine und Lipoproteine transferiert wird. Dieses Motiv wird als LeX Antigen (CD15) bezeichnet und da es spezifisch von Zellen der inneren Zellmasse exprimiert (Solter and Knowles, 1978) wird, auch als Stadium-spezifisches embryonales Antigen 1 (SSEA-1 Stage-specific embryonic antigen 1) bezeichnet. Eine Expression von SSEA-1 wurde außerdem auf verschiedenen neuronalen Zellen gefunden (Pruszk et al., 2009), sie ist aber mit keiner bisher bekannten Funktion korreliert worden. In differenzierenden mES-Zellen ist dieser Marker früh herunter reguliert (**Abb. 9**).



### Abbildung 9: Expression von Pluripotenzmarkern in murinen embryonalen Stammzellen

Die Immunfluoreszenz von 129/Sv3 murinen ES-Zellen zeigt, dass diese Zellen E-Cadherin, Oct4 und Nanog auf einem hohen Level exprimieren (links) neben dem Pluripotenzmarker SSEA-1. Dieses Kohlenhydratmotiv, ist auf undifferenzierten mES-Zellen (+LIF) lokalisiert und wird durch die Differenzierung (-LIF) rasch herunter reguliert (rechts).

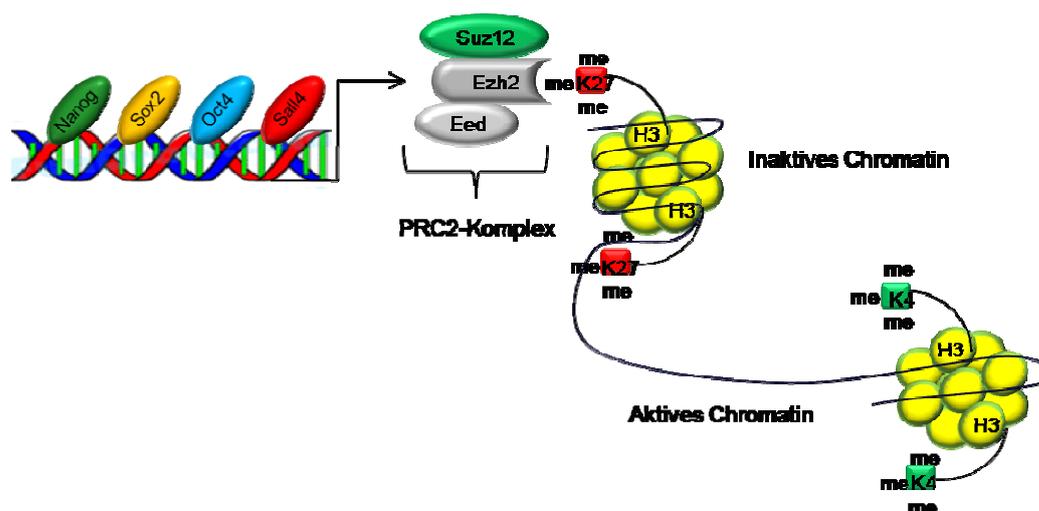
### 4.5.1 ES-Zellen und Epigenetik

Die Basis für die Erhaltung des pluripotenten Zustands und des Potentials zur Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen ist der Komplex aus Oct4, Sox2, Nanog und Sall4. Er reguliert neben Genen, die für diese beiden Prozesse essentiell

## Einleitung

sind, auch die Expression der einzelnen Faktoren des Komplexes und reprimiert Gene, welche für die Differenzierung der ES-Zellen in bestimmte Richtungen notwendig sind. Neben dem transkriptionellen Netzwerk spielen epigenetische Modifikationen und die Organisation des Chromatins eine wichtige Rolle. Die am besten verstandenen Modifikationen sind die Methylierungen und Acetylierungen am Histon H3. Die Repression von Genen, vermittelt über Proteine der Polykomb-Gruppe (PcG), erfolgt durch die Etablierung von Tri-Methylierungen von Lysin (K) 9 und 27 am Histon H3. Diese Motive markieren daher Gene, die sich in einem inaktiven Zustand befinden.

Es können somit drei hauptsächliche Motive unterscheiden werden, durch welche die Aktivität von Genen bzw. des Chromatins ermittelt werden kann. Das Motiv H3K4me3 markiert Gene in aktiven Bereichen des Chromatins. Solche Gene, die transient inaktiv sind, aber in einem späteren Prozess aktiviert werden sollen, sind doppelt markiert und weisen daher die Motive H3K4me3 und H3K27me3 auf. Gene, die permanent inaktiv sind, besitzen nur das H3K27me3 Motiv. Unterschiedliche Gene, wie z.B. Eed, Suz12 oder die Methyltransferase Ezh2 die im Polykomb-Repressions-Komplex vertreten sind, werden durch Oct4, Sox2, Nanog und Sall4 reguliert (**Abb. 10**). Eine der aktivierenden Modifikationen ist vor allem die Demethylierung von H3K9. So wird die Demethylase JMJD2C benötigt, um Methylgruppen an K9 von Histon H3 zu entfernen um somit z.B. das Nanog Gene in einem aktiven Zustand zu erhalten (Hemberger et al., 2009).



**Abbildung 10: Regulation des Polykomb-Repressor Komplexes 2 durch Pluripotenzgene.** Die Pluripotenzgene Nanog, Sox2, Oct4 und Sall4 regulieren Proteine des Polykomb-Repressor Komplexes 2 (PRC2). Dieser Komplex tri-methyliert durch die Methyltransferase Ezh2 Lysin (K) Reste des Histons H3 und setzt so das Chromatin in einen inaktiven Zustand.

---

### 4.6 *Induzierte Pluripotente Stammzellen*

#### 4.6.1 *iPS-Induktion nach Takahashi und Yamanaka*

In einem bahnbrechenden Experiment konnten Takahashi und Yamanaka zeigen, dass durch die Überexpression von definierten Transkriptionsfaktoren, die auch in embryonalen Stammzellen exprimiert werden, terminal differenzierte Zellen wie z.B. Fibroblasten (Takahashi and Yamanaka, 2006), B-Zellen (Hanna et al., 2008), Hepatozyten (Aoi et al., 2008) und Keratinozyten (Aasen et al., 2008) in Zellen mit Eigenschaften von embryonalen Stammzellen konvertiert werden können und als induzierte-pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) bezeichnet werden. Dieser Prozess führt daher ebenso zu einer Reprogrammierung des Genoms somatischer Zellen, wie der Prozess des Kerntransfers. Beim klassischen Kerntransfer (Erzeugung von Klonen) wird der Zellkern einer somatischen Zellen in eine Oozyte transferiert, deren Zellkern entfernt wurde (Yamanaka and Blau, 2010). Beide Prozesse führen mit unterschiedlicher Effizienz zu einer drastischen Änderung des Epigenoms, stillgelegte Gene wie z.B. Pluripotenzgene werden reaktiviert und das Genom des somatischen Zellkerns wird konvertiert in das Genom einer pluripotenten Zelle (Maherali et al., 2007). In einem höchst ineffizienten Prozess konnte so z.B. bei dem Klon-Schaf „Dolly“, gezeigt werden, dass der Zellkern einer terminal differenzierten somatischen Zellen in der Lage ist zu de-differenzieren und wieder einen Zustand zu erreichen, den es ihm ermöglicht, in alle Zellen des Organismus zu differenzieren (Wilmut et al., 2009).

Ausgehend von 24 verschiedenen Transkriptionsfaktoren, von denen bekannt war, dass sie wichtige Funktionen in embryonalen Stammzellen übernehmen, wie z.B. Stat3 konnte ein zentraler TF-Komplex aus den vier Faktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc identifiziert werden. Interessanterweise waren Nanog und  $\beta$ -Catenin nicht essentiell für die Reprogrammierung. Diese Tatsache lässt sich vermutlich damit begründen, dass die Expression von Nanog durch den Komplex aus Oct4/Sox2 reguliert wird und dass in Fibroblasten bereits über einen hohen  $\beta$ -Catenin Level verfügen. Der Transkriptionsfaktor Krüppel-like Faktor 4 (Klf4) war bis 2006 als ein Transkriptions-faktor bekannt, der am Prozess der Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen als regulierender Faktor beteiligt ist (Li et al., 2005). Vor allem aber ist Klf4 (liver-enriched factor) hoch in der Epidermis und in Epithelzellen wie z.B. in denen des Magens und Darms exprimiert (Garrett-Sinha et al., 1996). Während der

## Einleitung

---

Reprogrammierung scheint die Expression von Klf4 vor allem für die Etablierung epithelartige Zellen notwendig zu sein und die damit verbundene Expression von E-Cadherin (Li et al., 2010). Klf4 ist damit ebenso wie Sox2 und Oct4 essentiell ist für die Gewinnung der induziert-pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen).

Die generierten iPS-Zellen hatten alle Eigenschaften der auf klassischem Wege durch Isolation aus der Blastozyste gewonnenen Stammzellen. Allerdings konnten die ersten iPS Zellen zwar in virtuell alle Zelllinien der drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm und Ektoderm) differenzieren und waren zur Bildung von Teratokarzinomen fähig, sie waren aber unfähig sich in die Blastozyste zu integrieren. Erst die iPS Zellen, die aus der Selektion auf Oct4 bzw. Nanog Expression (Brambrink et al., 2008; Okita et al., 2007) erhalten wurden, waren fähig, sowohl nach Blastozysteninjektion an der Mausembryogenese Teil zu nehmen, als auch an der Bildung von Keimbahnzellen.

Diese Methode erlaubt die Generierung von Zellen mit Stammzell-Eigenschaften ohne die Verwendung von Embryonen, ein Aspekt der vor allem von ethischem Interesse ist. Viel entscheidender aber ist, dass die Möglichkeit einer Zell-basierten Therapie besteht mit Zellen, die sich vom Immunphänotypen her nicht von den Zellen des Empfängers unterscheiden. Theoretisch können so iPS Zellen von z.B. humanen Fibroblasten eines Spenders erzeugt und gezielt in eine bestimmte Linie differenziert werden. Die so differenzierten Zellen würden dann in geschädigtes Gewebe injiziert werden und so an der Regeneration teilnehmen (Park et al., 2008). Tatsächlich aber ist dieser Prozess so noch nicht durchführbar, vor allem wegen der Verwendung von viralen Expressionsvektoren, die zwar während des Reprogrammierungsprozesses abgeschaltet werden, aber auch unkontrolliert wieder aktiviert werden können (Okita et al., 2007)

### **4.7 Aufklärung von Signalwegen und Mechanismen während der iPS-Induktion**

Der genaue Mechanismus der Reprogrammierung ist noch nicht vollständig geklärt, sicher aber ist, dass die virale Expression der vier Faktoren nach ca. vier Tagen durch u. a. Methylierung des viralen Promotors deaktiviert und die Expression der endogenen Gene der vier Faktoren aktiviert wird (Brambrink et al., 2008; Hotta and Ellis, 2008). Vor allem die Reaktivierung der Onkogene c-Myc und Klf4 können zum

## Einleitung

---

tumorigenen Wachstum von replantierten iPS-Zellen führen (Okita et al., 2007), so dass die Bestrebung diese beiden Faktoren zu ersetzen groß war.

Tatsächlich ist die Reprogrammierung von Fibroblasten auch bei Abwesenheit von exogenem c-Myc möglich, wenn der Wnt-Signalweg entweder durch den Liganden Wnt3a oder Inhibition der GSK3-Kinase durch einen spezifischen Inhibitor wie z.B. BIO, aktiviert wird (Wernig et al., 2008). Da c-Myc ein Zielgen des Wnt-Signalweges ist, führte die Wnt-aktivierte Expression von c-Myc zur Generierung von iPS-Zellen (Wernig et al., 2008). Die Abwesenheit von exogenem c-Myc und Blockierung der GSK3-Kinase führte ebenfalls zu iPS-Zellen, aber mit deutlich reduzierter Effizienz (Nakagawa et al., 2008)

Weiterhin konnte durch eine Wirkstoffsuche der GSK3-Kinase Inhibitor Kenpaullon identifiziert werden, der Klf4 ersetzen konnte (Lyssiotis et al., 2009). Diese Studie zeigt zusammen mit der von Wernig et al., dass die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin und die daraus resultierende Aktivierung des Wnt-Signalweges eine essentielle Rolle im Prozess der Reprogrammierung zu spielen scheint. Der Einsatz von Histon-Deacetylase Inhibitoren wie Valproinsäure konnte in Kombination mit Oct4 und Sox2 zusätzlich zeigen, dass die Konvertierung von humanen Fibroblasten auch in Abwesenheit von c-Myc und Klf4 erfolgen konnte (Huangfu et al., 2008). Weiterführende Studien verdeutlichen außerdem die Redundanz von Vertretern beider Transkriptionsfaktor-Familien. So konnte Klf4 durch Klf2 und Klf5 und außerdem gegen den Kernrezeptor Esrrb, dessen Ligand noch unbekannt ist, ausgetauscht werden (Feng et al., 2009). Der Austausch von c-Myc konnte gegen N-Myc und L-Myc erfolgen (Nakagawa et al., 2008) und auch Sox2 konnte mit Sox1 und Sox3 substituiert werden.

Die Substitution des als Schlüsselprotein der Pluripotenz gesehenen Transkriptionsfaktors Oct4, konnte bisher selbst durch andere Vertreter der Familie der Oct-Proteine Oct1 und Oct6 nicht erfolgreich gezeigt werden. Allerdings gelang die Substitution wie kürzlich in einer aktuellen Studie gezeigt werden konnte, von Oct4 durch den Kernrezeptor Nr5a2 (Lrh-1). Die Überexpression dieses Orphan-Rezeptors führte sowohl zu einer Erhöhung der Reprogrammierungseffizienz als zusätzlicher Faktor als auch die Generierung von iPS-Zellen bei Abwesenheit von Oct4 (Heng et al., 2010). Nr5a2 war damit in der Lage, zusammen mit Sox2 und Klf4 Zielgene zu aktivieren, die für den pluripotenten Status von iPS Zellen entscheidend sind.

## Einleitung

---

Trotz dieser möglichen Substitutionen besteht weiterhin ein Risiko durch die Reaktivierung der ins Genom integrierten viralen Gene, so dass man bestrebt ist, die Anzahl der viralen Expressionsplasmide, die in die Zielzellen eingebracht werden, zu reduzieren.

Es konnten z.B. die cDNAs aller vier Faktoren getrennt voneinander durch selbstspaltende Linkersequenzen (F2A-Fragmente) auf einem polyzystronischen Vektor unter die Kontrolle eines Promotors gestellt werden. Auf diese Weise wird nur ein einziges Plasmid transduziert, so dass der Einfluss auf die Stabilität des Genoms durch die Integrationen reduziert werden kann. Außerdem konnte so gewährleistet werden, dass die Faktoren zu gleichen Anteilen und zum gleichen Zeitpunkt in die Zielzellen eingebracht und exprimiert wurden (Carey et al., 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die iPS-Induktion völlig ohne virale Transduktion und damit ohne Integrationen ins Genom der Zielzelle, alleine durch transiente Expression, möglich ist (Stadtfield et al., 2008) oder direkt durch die Zugabe von Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc als rekombinante Proteine, die entweder mit dem viralen TAT-Protein (transactivator of transcription, Reste 47 - 57) des HIV-1 (Humanes Immundefizienz Virus 1) fusioniert waren und in das Zellkulturmedium gegeben wurden (Pan et al., 2010), oder über einen Poly-Arginin Linker, der C-terminal an die jeweiligen Faktoren fusioniert wurde (Zhou et al., 2009).

Da der Prozess der Reprogrammierung extrem ineffizient ist (< 1 %) wurden Signalwege analysiert, die konträr und inhibitorisch auf die iPS-Generierung wirken. Die Aktivierung des p53-Signalweges in Fibroblasten führt zu einer deutlichen Reduktion der Konvertierungseffizienz (Hong et al., 2009). Sowohl p53 als auch das p53 Zielgen p21 sind in seneszenten Fibroblasten stark exprimiert und inhibieren die Reprogrammierung vermutlich durch einen p21-abhängigen Arrest des Zellzyklus. Der Prozess der Reprogrammierung ist mechanistisch dem der mesenchymalen-epithelialen Transition äquivalent (Li et al., 2010). Signalwege, die entweder zu MET, oder dem reversen Prozess, EMT führen, sind daher auch regulatorisch am Prozess der Bildung von iPS Zellen beteiligt. Der TGF $\beta$ -Signalweg hat einen inhibitorischen Einfluss auf die Stabilisierung von iPS Zellen und begünstigt EMT, Inhibitoren die diesen Signalweg blockieren, können daher die Effizienz der Reprogrammierung erhöhen (Maherali and Hochedlinger, 2009). Bei Bindung von Liganden wie TGF $\beta$  und TGF $\beta$  dimerisiert der TGF $\beta$  II-Rezeptor mit den Activin-like-kinasen 4, 5 und 7 (Hall et al., 2009) und transduziert das Signal über die Phosphorylierung der Smad-

## Einleitung

---

proteine 2/3. Ein Gegenspieler des TGF $\beta$ -Signalweges ist der BMP-Signalweg. Der BMP Rezeptor II dimerisiert mit ALK 2, 3 und 6 woraus die Phosphorylierung der Smad-proteine 1/5 und 8 erfolgt. Da beide Signalwege um die Bindung an das Co-Protein Smad4 konkurrieren, können sich gegenseitig blockieren. Eine Aktivierung des BMP-Signalweges kann daher den TGF $\beta$ -Signalweg inhibieren und so begünstigend auf die iPSC Bildung wirken (Samavarchi-Tehrani et al., 2010). Weiterhin gibt es einen TGF $\beta$ -Signalweg, der Smad-unabhängig zur Aktivierung des MEK1/2//ERK1/2 Signalweges führt, der auch über Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert wird. Die Aktivierung des MEK/ERK Signalweges führt wiederum zur Aktivierung des E-Cadherin Repressors Slug (Snail2) und damit zu EMT. Der Einsatz von Inhibitoren, welche die Aktivität des TGF $\beta$ -Rezeptors blockieren und die Blockierung des MEK/ERK Signalweges führen daher in Kombination mit der Inhibition der GSK3-Kinase zu einer deutliche Steigerung der Reprogrammierungseffizienz (Silva and Smith, 2008).

Die Induktion des MET und die Repression von EMT sind wichtige Voraussetzungen für die Bildung von iPS-Zellen. Da beide Prozesse vor allem die Expression von N-cadherin und E-Cadherin regulieren, scheint die Überexpression von E-Cadherin und die damit verbundene Etablierung von Zelladhäsionsnetzwerken als ein möglicher Schritt um den EMT-Prozess zu inhibieren. Die Differenzierung embryonaler Stammzellen scheint vor allem nach dem EMT zu verlaufen, während sich im Verlauf der Reprogrammierung das Gleichgewicht zwischen MET und EMT so einstellen muss, dass iPS-Zellen entstehen, die auch ohne die Verwendung von Feeder-Zellen wie den INAKs stabil expandiert werden können. Da vor allem die Einstellung des MET-EMT Gleichgewichtes der entscheidende Prozess für die Etablierung von iPS-Zellen ist, muss dieser erst verstanden und einzelne Signalwege aufgeklärt werden, um den Wirkungsgrad der Reprogrammierung deutlich zu erhöhen.

### 5. Materialien und Methoden

#### 5.1 Zellkultur

##### 5.1.1 Kultivierung von mES- und iPS-Zellen

Maus embryonale Stammzellen der Linie 129/Sv3 (erhalten von S. Noggle, NYSCF, New York) und etablierte iPS-Zellen wurden entweder auf mitotisch inaktivierten (Mitomycin C behandelten) Fibroblasten (INAKs) oder auf mit Gelatine (0,1 % Gelatine in PBS) beschichteten Zellkulturplatten (BD Falcon) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in mES-Zellen Medium kultiviert. Für das Medium wurde DMEM, Glutamax 4,5 g/L Glucose (Gibco, Invitrogen) verwendet und supplementiert mit 15 % FBS (Gibco, Invitrogen), 1 mM Natriumpyruvat, 0,1 mM Nicht-essentielle Aminosäuren, 50 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin (alle Invitrogen) und 0,1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Zur Erhaltung des undifferenzierten Wachstums wurde das Medium mit 1000 U/ml LIF versetzt. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage geteilt. Spontane Differenzierung erfolgte in Medium ohne Zusatz von LIF.

##### 5.1.2 Isolierung und Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)

Die Isolierung von Ecad<sup>flox/flox</sup> MEFs (loxP Sequenzen flankieren Exon 6 – 10 des E-Cadherin/ Cdh1 Gens) erfolgte aus den Embryonen der Mauslinie B6.129/Sv3-Cdh1<sup>tm2Kem/J</sup> (Boussadia et al., 2002) und  $\beta$ -Catenin<sup>flox/flox</sup> MEFs (loxP Sequenzen flankieren Exon 3 – 6 des  $\beta$ -Catenin Gens) wurden aus Embryonen einer Linie mit gemischtem 129XC57Bl6 (Huelsken et al., 2001) Hintergrund erhalten. Wildtyp (Wt) MEFs konnten aus Embryonen des Auszuchtstammes Cf1 erhalten werden. Die Embryonen wurden zwischen E12,5 - E13,5 aus dem Uterus entnommen, die inneren Organe und der Kopf entfernt und der Rumpf mit einem Skalpell zerkleinert. Die zerkleinerten Rümpfe wurden in 15 ml Trypsin (0,25 %, EDTA, Gibco, Invitrogen) aufgenommen und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen, (überwiegend Fibroblasten) wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, Zufügen von weiteren 10 ml Trypsin und weiterer Inkubation herausgelöst. Die Zellsuspension wurde in MEF-Medium, DMEM Glutamax 4,5 g/L Glucose (Gibco, Invitrogen) supplementiert mit 10 % FBS (Gibco, Invitrogen), 1 mM Natriumpyruvat; 0,1 mM Nicht-essentielle Aminosäuren, 50 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin (alle Invitrogen) und 0,1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) aufgenommen und

## Materialien und Methoden

---

auf 15 cm Zellkulturschalen plattiert (ca. 1 Platte/ Embryo). Das Medium wurde jeden Tag gewechselt und die Zellen nach erreichter Konfluenz kryokonserviert.

### 5.1.3 Kultivierung von Platinum-E (Plat-E) Zellen, Virusproduktion und Transduktion von Zellen

Plat-E Zellen leiten sich von HEK 293T Zellen ab. In das Genom der Zellen wurden unter dem EF1a Promotor die retroviralen Gene für gag, pol und env integriert, so dass es den Zellen möglich ist nach Transfektion mit einem viralen Expressionsplasmid, dieses zu amplifizieren und zu verpacken.

Die Zellen wurden in DMEM Glutamax 4,5 g/L Glucose (Gibco, Invitrogen) supplementiert mit 10 % FBS (Gibco, Invitrogen), 1 mM Natriumpyruvat ohne Zusatz von Antibiotikum bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und ein Tag vor der Virusproduktion zu 5,0 x 10<sup>6</sup> Zellen/ 10 cm Schale plattiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit 9 µg des entsprechenden Plasmids mit Hilfe der Calciumphosphat-Präzipitation transfiziert. Für die Transfektion wurden zunächst 9 µg Plasmid-DNA und 50 µl CaCl<sub>2</sub>, 2,5 mM vermischt und mit sterilem Wasser zu 500 µl ergänzt. Die so erhaltene Lösung wurde unter langsamem vortexen in 500 µl 2x HBS Puffer (Hepes-buffered saline: 50 mM HEPES, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 280 mM NaCl, pH = 6,5 – 7,0) getropft. Die Transfektionslösung wurde dann vorsichtig auf die Zellen getropft, und für 24 h auf den Zellen belassen. Zur Inhibition von lysosomalen DNAsen wurde dem Medium außerdem Chloroquin (25 µg/ml Endkonzentration) hinzugefügt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Da der Virustiter 48 h nach der Transfektion am höchsten ist, wurde der Virusüberstand des ersten Tages verworfen und über Nacht zum zweiten und den gesamten zweiten Tag gesammelt und auf Eis gelagert. Die Halbwertszeit des Virus beträgt bei Raumtemperatur ~8 Stunden. Der gesammelte Virusüberstand wurde filtriert (0,45 µm Filter) und mit Polybren, 4 mg/ml (8 µg/ml Endkonzentration), einem kationischen Polymer, versetzt. Der Virusüberstand wurde danach auf die zu infizierenden Zellen gegeben. Für die Infektionen von Zellen auf einer 10 cm Schale wurden 5 ml Virusüberstand verwendet, für die Infektion von Zellen auf einer 6-Well Platte wurde 1 ml Virusüberstand eingesetzt. Der Virus wurde für 24 h – 48 h auf den Zellen belassen, bei der Infektion von mES-Zellen wurde der Überstand mit 1000 U/ml LIF supplementiert.

## Materialien und Methoden

---

### 5.1.4 Gewinnung von iPS Zellen

#### a.) Yamanaka-Protokoll (OSKM-Induktion)

Maus embryonale Fibroblasten in den Passagen p1 – p3 wurden zu  $8,0 \times 10^5$  Zellen/ 10 cm Schale bzw. zu  $1,3 \times 10^5$ / 6-Well in MEF-Medium plattiert und nach 24 h mit einem Gemisch der vier Faktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc im Verhältnis 1 : 1 für 24 h induziert. Der Virusüberstand wurde nach 24 h von den Zellen genommen und gegen normales MEF-Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden nach 4 – 5 Tagen unter Verwendung von Trypsin (0,25 % mit EDTA, Gibco, Invitrogen) vereinzelt und auf mitotisch-inaktivierte MEFs zu  $0,5 \times 10^5$  Zellen/ 10 cm Schale in LIF-Medium plattiert. Kolonien die morphologisch analog zu mES-Zellen waren (nach ca. 5 – 10 Tagen), wurden als einzelne Klone gepickt und auf INAKs gesetzt. Angewachsene Klone wurden nach wenigen Tagen expandiert und analysiert.

#### b.) iPS-Induktion in Abwesenheit von exogenem Oct4 (ESKM-iPS)

Für die Generierung von ESKM-iPS wurden MEFs mit einem Gemisch aus ESKM (Ecad, Sox2, Klf4 und c-Myc) Virusüberständen im Verhältnis 1 : 1 nach dem obigen Protokoll transduziert. Die induzierten MEFs wurden nach 4 – 5 Tagen zu  $2,0 \times 10^5$  Zellen/ 10 cm Schale auf Matrigel in mES-Zellen Medium plattiert. Kolonien die morphologisch analog zu ES Zellen waren (12 – 14 Tage), wurden als einzelne Klone gepickt und auf INAKs gesetzt. Die Klone wurden nach wenigen Tagen expandiert und analysiert.

## 5.2 RNA-Isolierung und cDNA Synthese aus Zellen und Tumorgewebe

Für die Isolierung von RNA aus Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen in einem Volumen von 0,5 – 1 ml Trizol® (Gibco, Invitrogen) lysiert. Nach Zugabe von 100 µl – 200 µl wassergesättigtem Chloroform wurden die Proben mit einem Vortexer gemischt und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde abgenommen und die gesamte RNA durch Zugabe von 300 µl bzw. 600 µl Isopropylalkohol (100%) gefällt. Das nach dem Zentrifugieren bei 14.000 rpm für 10 min bei 4°C erhaltene Pellet, wurde mit Ethanol (70 %) 1x gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Das Pellet wurde in 10 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und anschließend für den DNase Verdau verwendet. Für den DNase Verdau wurde der folgende Ansatz verwendet:

## Materialien und Methoden

---

- 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 Roh-RNA
- 35 µl Gesamt

Der Verdau erfolgte für 1,5 Stunden, nach weiterer Zugabe von 0,5 µl DNase I wurde eine weitere Stunde verdaut. Der Ansatz wurde auf 100 µl aufgefüllt und mit 100 µl Phenol/ Chloroform (20 : 1) versetzt, gemischt und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (~90 µl) wurde separiert und die RNA nach Zugabe von 50 µl Ammoniumacetat (NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO; 7,5 M) und 400 µl Ethanol (100 %) zunächst für 5 min bei RT gefällt, anschließend bei 4°C, 10 min und 14.000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird wie oben gewaschen und getrocknet, dann in 22 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert.

### 5.2.1 cDNA Synthese

Für die Synthese von cDNA wurden 3 – 5 µg RNA in einem 50 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Für die Synthese wurde ein Random Hexamer Primer (3 µg/µl, Invitrogen) verwendet. Das entsprechende Volumen an gelöster RNA wurde auf 25 µl mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und 10 µl des verdünnten Primers (1µg/ µl) hinzu gegeben und das Gemisch zum Aufschmelzen von RNA-Sekundärstrukturen für 5 min bei 65 °C in einem Thermoblock erwärmt. Anschließend wurde das Gemisch schnell auf Eis abgekühlt, wodurch das Anlagern der Primer an die RNA erreicht wurde. 10 µl des Gemisches wurde als –RT Kontrolle abgenommen, die verbleibenden 25 µl zur cDNA Synthese verwendet. Der Synthese-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 10 µl 5X M-MLV Reverse Transkriptase Puffer (Promega)
- 2,5 µl DTT (20 mM)
- 1,25 µl RNase-Out (40 U/µl, Invitrogen)
- 2,5 µl dNTP Mix (10 mM, Invitrogen)
- 8,125 µl Nuklease-freies Wasser (Gibco)
- 0,625 µl M-MLV Reverse-Transkriptase (Promega)

## Materialien und Methoden

25 µl Gesamt

Nach Zugabe des gesamten Reaktionsgemisches (Endvolumen 50 µl), erfolgte die cDNA Synthese für 1 Stunde bei 42 °C. Bei einer Ausgangsmenge von 3 – 5 µg RNA wurde für die anschließende real-time RT-PCR bzw. für die RT-PCR zwischen 1,5 – 0,5µl cDNA eingesetzt.

### 5.2.2 Quantitative real-time RT-PCR (qPCR) und RT-PCR

Für die Expressionsanalyse wurde qPCR bzw. RT-PCR mit anschließender Separation der PCR Produkte auf einem Agarose-Gel (2% Agarose in TAE-Puffer), angewendet. Spezifische Primer wurden mithilfe der Software PrimerQuest, <http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/Default.aspx> designed (Tabelle 2). Dabei wurden nur die kodierenden Bereiche berücksichtigt.

**Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Primer**

<b>Gen</b>	<b>Identifikations Nr.</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
Ecad-total-s	NM_009864	TTGAGGCCAAGCAGCAATACATCC
Ecad-total-as		AGATGTGATTTCTGACCCACACC
Ecad-endo-s	NM_009864	CTCAGTGTGTTGCTCGGCGTCTGC
Ecad-endo-as		CAGGACATGGCCTCTCTCCAGGT
Ecad-viral-s		ACGGCGGTGGTGAGGACGACTAG
Ecad-viral-as		ATCCTGTTTGGCCCATATTCAGCT
Ncad-s	NM_007664	TTGCTTCTGACAATGGAATCCCGC
Ncad-as		AAGGAAAGATCAAACGCGAACGGC
Oct4, total-s	NM_002701	CTGAGGGCCAGGCAGGAGCACGAG
Oct4, total-as		CTGTAGGGAGGGCTTCGGGCACTT
Oct4, endo-s	NM_002701	TCTTTCCACCAGGCCCCCGGCTC
Oct4, endo-as		TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC
Oct4, viral-s		AAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGG
Oct4, viral-as		CTGTAGGGAGGGCTTCGGGCACTT
Sox2, total-s	NM_011443	GGTTACCTCTTCTCCCACTCCAG
Sox2, total-as		TCACATGTGCGACAGGGGCAG
Sox2, endo-s	NM_011443	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA
Sox2, endo-as		TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA
Klf4, total-s	NM_010637	CACCATGGACCCGGGCGTGGCTGCCAGAAA
Klf4, total-as		TTAGGCTGTTCTTTTCCGGGGCCACGA
Klf4, endo-s	NM_010637	GCGAACTCACACAGGCGAGAAACC
Klf4, endo-as		TCGCTTCTCTTCTCCGACACA
c-Myc, total-s	NM_010849	CAGAGGAGGAACGAGCTGAAGCGC

## Materialien und Methoden

c-Myc, total-as		TTATGCACCAGAGTTTTCGAAGCTGTTCCG
c-Myc, endo-s	NM_010849	GACCTAACTCGAGGAGGAGCTGGAATC
c-Myc, endo-as		AAGTTTGAGGCAGTTAAAATTATGGCTGAAGC
Nanog-s	NM_028016	AACCAAAGGATGAAGTGCAAGCGG
Nanog-as		TCTGGTTGTTCCAAGTTGGGTTGG
Dppa5-s	NM_025274	GAAATATCTGTTTGGCCCACAGGG
Dppa5-as		GCCATGGACTGAAGCATCCATTTAGC
Nr5a2-s	NM_030676	ACACAGAAGTCGCGTTCAACAACC
Nr5a2-as		TAGTTGCAAACCGTGTAGTCCAGC
Tbx5-s	NM_011537	CAAATGGTCCGTAACCTGGCAAAGC
Tbx5-as		ACGCAGTGTCTTTGAACCGAACC
GATA4-s	NM_008092	TCACAAGATGAACGGCATCAACCG
GATA4-as		GCAGGCATTACATACAGGCTCACC
Mef2c-s	NM_025282	AGCAGCAGCACCTACATAACATGC
Mef2c-as		ATGCGCTTGACTGAAGGACTTTCC
TropT2-s	NM_001130174	TCCAACATGATGCACTTTGGAGGG
TropT2-as		AGGTTGTGAATACTCTGCCACAGC
Myl7-s	NM_022879	TTCAGCTGCATTGACCAGAACAGG
Myl7-as		TGAGGAAGACGGTGAAGTTGATGG
Sox1-s	NM_009233	ATGCACAACCTCGGAGATCAGCAAGC
Sox1-as		AGTACTTGTCTTCTTGAGCAGCG
Sox17-s	NM_011441	ATGTAAAGGTGAAAGGCGAGGTGG
Sox17-as		ATCTTGCTTAGCTCTGCGTTGTGC
Brachyury (T)-s	NM_009309	ACCACCGCTGGAAATATGTGAACG
Brachyury (T)-as		AACTCTCACGATGTGAATCCGAGG
Nestin-s	NM_016701	AACAGAGCAAGATGAGGACAGAGC
Nestin-as		TCTTTGCCTTCACACTTTCTCCC
Msx2-s	NM_013601	AAATCTGGTTCCAGAACCGAAGGG
Msx2-as		CATGGTAGATGCCATATCCAACCG
Krt8-s	NM_031170	AGCATTACATACGAAGACCACCAGC
Krt8-as		TTGGACACGACATCAGAAGACTCG
Afp-s	NM_007423	AATGACTAGCGATGTGTTGGCTGC
Afp-as		TTCATGTGCTTTGCAACTCTCGGC
Isl-1-s	NM_021459	TGATTTCCCTGTGTGTTGGTTGCG
Isl-1-as		ATCACGAAGTCGTTCTTGCTGAAGCC
MMP2-s	NM_008610	AGATGCAGAAGTTCTTTGGGCTGC
MMP2-as		AAAGCATCATCCACGGTTTCAGGG
Ecad <sup>Ex6-7</sup> -s		TCGATGTCTCTGGTTCCCTAAACC
Ecad <sup>Ex6-7</sup> -as		TCTTTGTTCTGGTTATCCGCGAGC
$\beta$ -Catenin <sup>Ex4-5</sup> -s	NM_007614	AAGCTTCCAGACATGCCATCATGC
$\beta$ -Catenin <sup>Ex4-5</sup> -as		CAGACTTAAAGATGGCCAGCAAGC
$\beta$ -Aktin-s	NM_007393	TCGTGCGTGACATCAAAGAGAAGC
$\beta$ -Aktin-as		ATGGATGCCACAGGATTCCATACC

## Materialien und Methoden

---

Die qPCR/ RT-PCR erfolgte in 20 µl Reaktionsvolumen, das sich wie folgt zusammensetzte:

- 5 µl cDNA (1 :10 vorverdünnt)
- 5 µl Primer-Mix (sense und antisense, 10 µM; 1:10 vorverdünnt)
- 10 µl SYBR Green (Thermo Fischer)

Die PCR wurde mit dem folgenden Thermoprofil durchgeführt:

- 1. Zyklus 95 °C, 15 min
- 2. Zyklus 94 °C, 20 s  
60 °C, 45 s  
72 °C, 45 s } x30 bzw. 40
- 3. Zyklus 95 °C, 1 min

Für die Berechnung der relativen Expression wurde die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Probe B} - \Delta C_T \text{ Probe A}$  verwendet.  $\Delta C_T \text{ Probe B}$  ist der auf den  $C_T$ -Wert von  $\beta$ -Aktin normierte  $C_T$ -Wert der untersuchten Probe;  $\Delta C_T \text{ Probe A}$  ist der auf den  $C_T$ -Wert von  $\beta$ -Aktin normierte  $C_T$ -Wert der Bezugsprobe. Die relative Expression errechnete sich dabei zu  $\text{rel. Exp.} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

### 5.3 Proteinexpressionsanalysen

#### 5.3.1 Immunfluoreszenz und Immunhistochemie

Für die Immunfluoreszenz wurden die zu analysierenden Zellen zunächst auf 12-well Platten gesät. Nach Beendigung der entsprechenden Behandlung wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und dann mit 500 µl eiskaltem Methanol (100 %)/ Well auf Eis für 20 min fixiert. Die fixierten Zellen wurden 2x mit PBS/ 0,1% Triton-X100 gewaschen und permeabilisiert und danach für 1 h bei RT mit Blockierungspuffer (PBS/ 20 % FBS/ 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen mit den in Blockierungspuffer verdünnten Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper entfernt, die Zellen 2x für 5 min mit PBS/ 0,1% Triton-X100 bei RT gewaschen. Die sekundären mit Fluoreszenzfarbstoff (Cy2, grün; Cy3, rot und Cy5, blau) gekoppelten Antikörper wurden in Blockierungspuffer

## Materialien und Methoden

---

verdünnt (1:200) und die Zellen 1h bei RT lichtgeschützt inkubiert. Für die Färbung der Zellkerne wurde außerdem DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) zur Blockierungslösung (1:1000 verdünnt) gegeben. Die Zellen wurden nach dem Entfernen des sekundären Antikörpers erneut wie oben gewaschen und in Immumount (Thermo Scientific) mit einem Glasplättchen verschlossen. Die Anfertigung der Aufnahmen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Leica LAS AF 6000 Dekonvolution unter Verwendung der 10x und 40x Objektive.

### *5.3.2 Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS) und Durchflusszytometrie*

Für die Analyse der Oberflächenexpression von SSEA-1 und E-Cadherin wurden die zu analysierenden Zellen mit Trypsin (0,25 %, EDTA, Gibco, Invitrogen) abgelöst und die Zellsuspension in Medium aufgenommen. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl abgenommen und die Suspension für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml 1x PBS gewaschen und aufgenommen in Blockierungspuffer (PBS/ 20 % FBS/ 1 mM CaCl<sub>2</sub>). Die Zellzahl wurde auf  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ 100µl eingestellt und 200 µl für die Inkubation mit dem primären Antikörper eingesetzt. Die Antikörperbindung erfolgte auf Eis für 15 min, die primären Antikörper SSEA-1 (Spezies Maus, IgM, CD15, RnD) bzw. DECMA-1 (Spezies Ratte, IgG1 Abcam) wurden 1 : 100 (0,04 mg/ml) verdünnt eingesetzt ebenso wie die Isotypenkontrollen Maus IgM (Miltenyi) und Ratte IgG1. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 5 ml eiskaltem PBS versetzt und bei 4°C, 1200 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Blockierungspuffer aufgenommen und 1 µl des entsprechenden Sekundärantikörpers (Cy3 anti-Maus und Cy5 anti-Ratte) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen erneut wie oben gewaschen und das Pellet in 500 µl PBS aufgenommen und bis zur Verwendung auf Eis inkubiert. 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 <http://www.flowjo.com/>.

## Materialien und Methoden

---

### 5.3.3 Western-Blot Analyse

Die zu analysierenden Zellen wurden 1x mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit 100 – 200 µl HNTG Puffer, (50 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100; 10% Glycerol, 1 mM EDTA, eine Protease-Inhibitor Tablette [Boehringer Mannheim] und jeweils 100 µl Phosphatase-Inhibitor Cocktail 1 und 2 [beide Sigma-Aldrich] pro 10 ml Puffer) lysiert. 20 – 25 µg Gesamtprotein wurden auf einem Pre-cast Gel (NuPAGE Novex 10% Bis-Tris Midi Gel, Invitrogen) bei 200 V für 30 min separiert. Anschließend wurden die Proteine mit einem Elektroblotter auf eine PVDF Membran (Carl Roth GmbH + Co. KG) bei 90 mA/ Gel für 1h transferiert. Die folgenden primären Antikörper wurden verwendet und in 2,5 % Magermilch in PBS/ 0,1 % Tween-20 (Serva) nach Angaben des Herstellers verdünnt eingesetzt: anti-E-Cadherin (BD 610181, gegen C-Terminus), anti-N-Cadherin (BD 610920), anti-Oct4 polyklonal (H-134, Santa Cruz), anti-Nanog (Abcam, ab21603), anti-Sox2 und anti-Klf4 (beide polyklonal, RnD Systems), anti-c-Myc polyklonaler Antikörper (Sigma-Aldrich), anti-SSEA-1 monoklonal (Mab2155, RnD Systems) und anti- $\alpha$ -Tubulin monoklonal (T5168, Sigma-Aldrich). Sekundäre Antikörper waren anti-goat, -rabbit, und -mouse HRP-gekoppelt (Jackson Laboratories).

### 5.4 *In vitro* Differenzierung von iPS Zellen (Embryoid Body Formation)

Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA 0,25 % (Gibco, Invitrogen) abgelöst, in Medium aufgenommen und nach der Zentrifugation für 3 min bei 1000 rpm und Raumtemperatur (RT), in 10 ml mES-Zellen Medium ohne LIF resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zur Bildung der Embryoid Bodies auf eine bakteriologische Schale (geringe Adhärenz) plattiert. Das Medium wurde im Abstand von 2 Tagen erneuert. Nach 4 – 5 Tagen wurden die Zellaggregate auf mit Gelatine (0,1% in PBS) beschichtete 12-well Platten ausgesät. Nach 5 – 8 Tagen wurden die ausgewachsenen EBs für die Immunfluoreszenz wie unter 3.3.1 angegeben fixiert und verarbeitet. Für die Identifizierung von kardiomyogener/ myogener Differenzierung (Mesoderm) unterschiedlicher Zelltypen wurden die Antikörper anti-Cardiac actin (Progen, aus Hybridomaüberstand) und anti- $\alpha$ -Smooth muscle actin polyklonal (Abcam, ab5694, 1:100 verdünnt) verwendet. Anti-Cytokeratin 18 (Progen, Hybridomaüberstand), anti-E-Cadherin (Clone DECMA-1 abcam, 1:400 verdünnt) und anti-FoxA2 (Abcam, 1:400 verdünnt) wurden für die Identifizierung endodermaler

## Materialien und Methoden

---

Differenzierung verwendet. Ektoderm wurde durch anti-N-Cadherin (Beckton&Dickinson, 1:100 verdünnt) und anti-Nestin (C. Birchmeier, 1:400 verdünnt) identifiziert. Zur Identifizierung des undifferenzierten Status und für die Analyse der Markerexpression in Abhängigkeit der spontanen Differenzierung wurden die folgenden primären Antikörper verwendet: anti-Oct4 polyklonal (H-134, Santa Cruz), anti-Nanog (Abcam, ab21603) und anti-SSEA-1 monoklonal (Mab2155, RnD Systems).

### 5.5 *In vivo* Differenzierung

#### 5.5.1 *Teratokarzinom-Bildung*

Für die *in vivo* Differenzierung von mES- und iPS-Zellen wurden  $1,0 \times 10^6$  Zellen/ 50  $\mu$ l Medium mit 50  $\mu$ l Matrigel gemischt und subkutan in NOD/SCID Mäuse injiziert. Für jede verwendete Zelllinie wurden insgesamt drei Injektionen durchgeführt. Das Tumorstadium wurde nach 12, 18 und 21 bzw. 25 Tagen durch Ausmessen der Tumore verfolgt. Die Tumore wurden nach 21 bzw. 25 Tagen entnommen, vermessen (Größe und Gewicht) und in 4 % Formaldehyd über Nacht fixiert. Biopsien wurden zuvor für anschließende PCR-Analysen abgenommen. Die fixierten Tumore wurden in Paraffin eingebettet und anschließend Schnitte mit einer Schichtdicke von 4  $\mu$ m angefertigt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt und anschließend histologisch auf verschiedene Differenzierungsmuster analysiert. Ungefärbte Schnitte wurden für immunhistochemische Analysen verwendet.

#### 5.5.2 *Blastozysten-Injektionen*

Ecad<sup>high</sup> und Ecad<sup>low</sup> Zellen wurden retroviral mit dem GFP-Expressionsplasmid MP71-GFP (Karte im Anhang) transduziert und GFP positive Zellen nach 3 – 4 Tagen über FACS angereichert. Stabil GFP exprimierende Zellen wurden zu 10 -12 Zellen je Blastozyste injiziert und die Blastozysten in Empfängermäuse transplantiert. Die Jungtiere (JT) wurden 2 Tage nach der Geburt auf GFP-positive Areale/ Organe analysiert.

### 5.6 *Expressionsverlust und Überexpression von E-Cadherin*

#### 5.6.1 *E-Cadherin shRNA und Expressionsplasmid*

Für die shRNA vermittelte Reduktion der E-Cadherin Expression wurden die Haarnadel-bildenden Oligomere mit der E-Cadherin Zielsequenz 5'-AGCTTAAAAAAGAACCTGGTTCAGATCAAATTCTCTTGAAATTTGATCTGAAC AGGTTCTGGG-3' (sense) und 5'-GATCCCCAGAACCTGGTTCAGATC AAATTTCA AGAGAATTTGAT CTGAACCAGGTTCTTTTTTA-3' (anti-sense) komplementiert und über die Restriktionsschnittstellen HindIII und BglII in ein pSuperior Expressionsplasmid kloniert. Die Subklonierung erfolgte über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI in den viralen Expressionsvektor pMSCV.. Für die Überexpression von E-Cadherin wurde die kodierende Sequenz mithilfe von PCR Primern mit Sequenzen der Schnittstellen NotI und HindIII aus dem Plasmid pBAT-EM2 amplifiziert und in eine artifizielle, vorher in den viralen Expressionsvektor pMXs eingeführte MCS (multiple cloning site), eingebracht. Die Plasmidkarten sind in Abb. 28 im Anhang gezeigt.

#### 5.6.2 *HTNcre/loxP vermittelte Reduktion des E-Cadherin und $\beta$ -Catenin Levels*

Ecad<sup>flox/flox</sup> und  $\beta$ -Catenin<sup>flox/flox</sup> MEFs wurden für 24 h mit 3  $\mu$ M HTNcre in 5 ml MEF Medium ohne FBS behandelt. Die rekombinierten MEFs wurden trypsiniert und zur viralen Transduktion ausplattiert. Die Transduktion der  $\beta$ -Catenin<sup>flox/flox</sup> MEFs erfolgte erst als der  $\beta$ -Catenin Protein Level deutlich reduziert war (nach 3 - 5 Tagen).

### 5.7 *Alkalische Phosphatase Aktivität*

Zur Bestimmung der Aktivität von alkalischer Phosphatase wurden die Zellen gewaschen mit 1x PBS und in 4 % PFA (4% Paraformaldehyd in PBS) für 5 min bei RT fixiert. Nach Entfernung des PFA wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit Phospho-Detektions-Puffer (100 mM Tris, pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) für 15 min bei RT inkubiert. Nach nochmaligem waschen erfolgte die Inkubation mit 500  $\mu$ l BM-Purple (gebrauchsfertige Lösung von Nitroblautetrazolium, NBT/ 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, BCIP). Die Inkubation erfolgte bei RT bis zur deutlichen Bildung eines blauen Präzipitats in den Zellen (30 - 60 min).

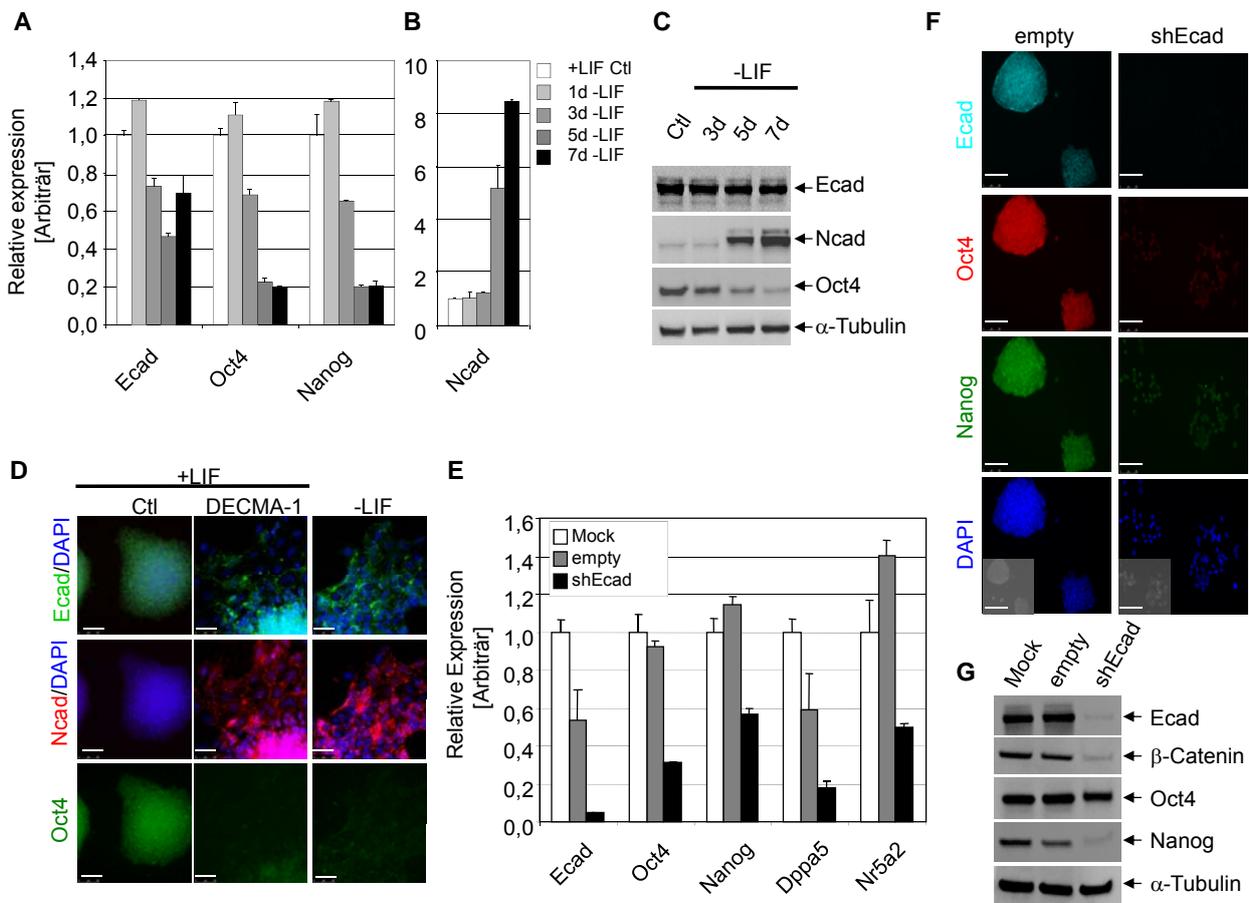
### 6. Ergebnisse

#### 6.1 *Die Expression von E-Cadherin in mES-Zellen ist essentiell für die Erhaltung der Pluripotenz*

In murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen) ist E-Cadherin (Ecad) neben den Pluripotenzgenen Oct4 und Nanog hoch exprimiert, wenn die Zellen unter Anwesenheit von LIF, d.h. undifferenziert, kultiviert werden. Die Kultivierung von mES-Zellen in LIF Abwesenheit führt zur spontanen Differenzierung. Um die Regulation der Expression von E-Cadherin, Oct4 und Nanog während der spontanen Differenzierung von 129/Sv3 mES-Zellen zu untersuchen, wurden diese für 1 Tag (d), 3d, 5d und 7d in Abwesenheit von LIF kultiviert und die mRNA Level dieser Gene ermittelt. Nach 5d Differenzierung, war die Expression von Ecad auf 46,7 %, die von Oct4 und Nanog auf 22,8 bzw. 20,1 % gesunken, gleichzeitig aber war eine 5,2fache Hochregulierung der N-Cadherin (Ncad) Expression zu beobachten (**Abb. 11A und 11B**). Auf Proteinebene konnte diese Regulation bestätigt werden, die Proteinlevels von Ecad und Oct4 hatten am Tag 5 der Differenzierung ein Minimum erreicht. Die Expression von N-Cadherin (Ncad) war zu diesem Zeitpunkt stark erhöht und hatte nach 7d ein Maximum erreicht (**Abb. 11C**). Diese simultane Änderung der Cadherin Expression konnte außerdem über die Lokalisierung beider Cadherine (Ecad und Ncad) durch Immunfluoreszenz gezeigt werden. Weiterhin war zu beobachten, dass sich die Expressionen der Cadherine in den meisten Zellen gegenseitig ausschlossen. Neben der spontanen Differenzierung unter LIF Entzug, konnten mES-Zellen auch bei Anwesenheit von LIF differenzieren, wenn die Ecad vermittelte Zelladhäsion gestört wurde. Wurde der neutralisierende Antikörper DECMA-1, der N-terminal an die Subdomänen EC 4/5 bindet, in das Medium gegeben, konnte nach wenigen Tagen eine deutliche morphologische Veränderung der Zellen beobachtet werden. Nach 4d wurden dann deutlich differenzierte Zellen erkennbar, die nur noch eine geringe Expression von Ecad und Oct4 aber einen hohen Ncad Proteinlevel zeigten (**Abb. 11D**). Weiterhin konnte nach einer viralen Transduktion von mES-Zellen mit einem shRNA Plasmid gegen Ecad (shEcad) bereits nach 2 - 3d ein erheblicher Einfluss der Reduktion des Ecad Levels auf die Integrität der Zellen beobachtet werden. Auf der mRNA und Proteinebene wurde deutlich, dass eine effiziente Reduktion des Ecad Levels mit einer massiven Verringerung der Expression der Pluripotenzgene Oct4, Nanog, Dppa5 und Nr5a2 korreliert war. Im Vergleich dazu, konnte dieser Effekt in Zellen, die mit einem leeren Vektor (empty)

## Ergebnisse

bzw. nicht transduziert wurden (Mock) nicht beobachtet werden (Abb. 11E).



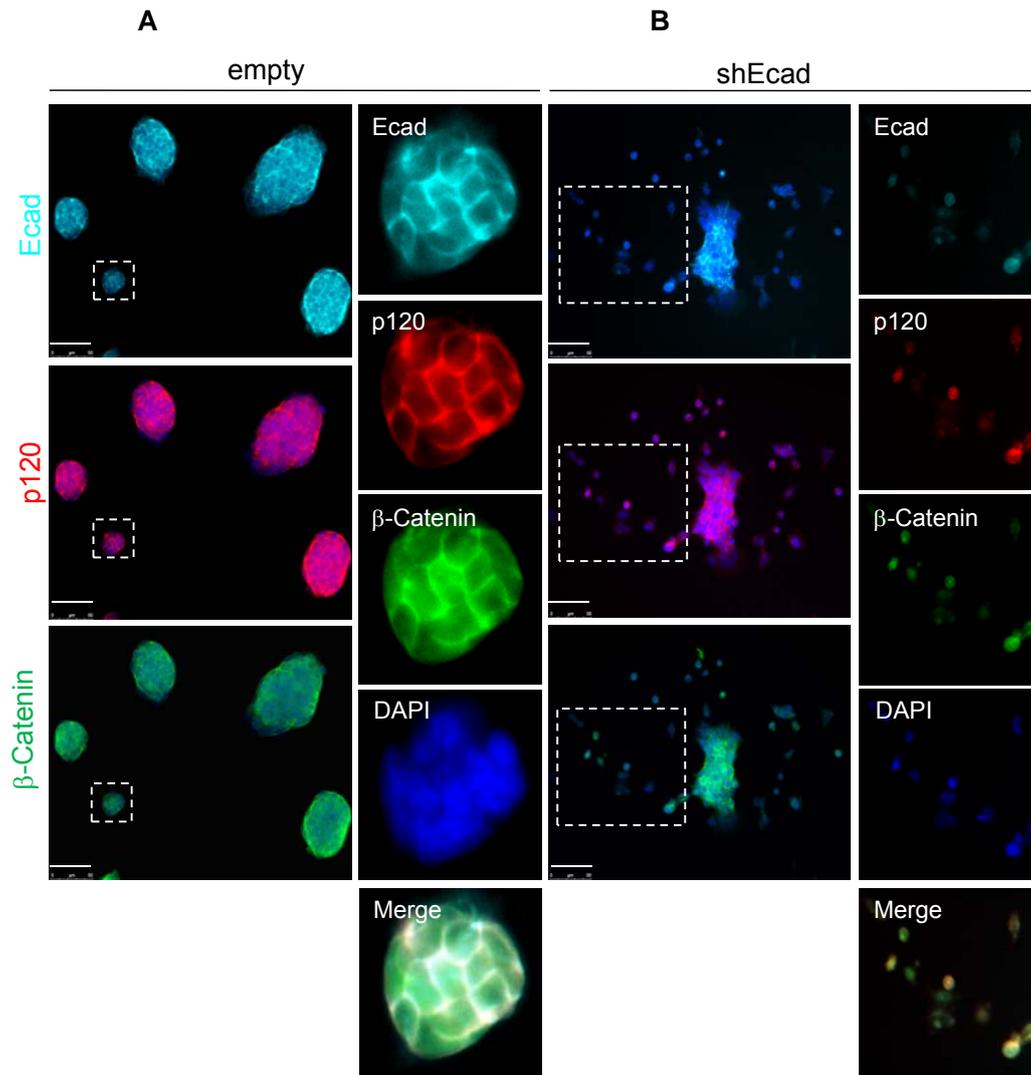
### Abbildung 11: Die Integrität von mES-Zellen ist reguliert über Ecad vermittelte Zelladhäsion.

**(A)** Relative mRNA Expressionslevel von Ecad, Oct4 und Nanog in 129/Sv3 mES-Zellen, die für 1d, 3d, 5d und 7d in Abwesenheit von LIF spontan differenziert wurden, gemessen durch Real-time RT-PCR. Die Expression der Gene wurde auf  $\beta$ -Aktin normiert und bezogen auf Expressionslevel in undifferenzierten Zellen, die bei Anwesenheit von LIF kultiviert wurden (+LIF Ctl). Die Fehlerbalken repräsentieren Varianzen von Duplikaten. Das Experiment ist repräsentativ für  $n = 3$  biologische Replikate. **(B)** Die Expression von Ncad mRNA wurde in Proben die wie unter (A) angegeben behandelt wurden, ermittelt. **(C)** Proteinlevel für Ecad, Ncad und Oct4 wurden in 129/Sv3 mES-Zellen bestimmt, die parallel zu Zellen in (A) für 3d, 5d und 7d in Abwesenheit von LIF bzw. unter Präsenz von LIF (Ctl) kultiviert wurden. Als Referenzprotein wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet. **(D)** Immunfluoreszenz von 129/Sv3 mES-Zellen kultiviert für 4d bei Anwesenheit von LIF und DECMA-1, 12  $\mu$ g/ml oder LIF Abwesenheit für Ecad, Ncad und Oct4. DAPI wurde zur Färbung des Zellkerns verwendet. Die Fotos wurden in 400x Vergrößerung aufgenommen, die Skala indiziert 50  $\mu$ m. **(E)** Real-time RT-PCR von mES-Zellen kultiviert unter Anwesenheit von LIF, die viral transduziert wurden mit einem shRNA Plasmid gegen Ecad (shEcad), einem Kontrollplasmid (empty) bzw. nicht transduziert wurden (Mock). Ermittelt wurden die mRNA Levels von Ecad, Oct4, Nanog, Dppa5 und Nr5a2. Die Expression der Gene wurde auf  $\beta$ -Aktin normiert und bezogen auf Expressionslevel in Mock Zellen. **(F)** Immunfluoreszenz von Zellen, behandelt wie in (E) für Ecad, Oct4 und Nanog. DAPI wurde zur Färbung des Zellkerns verwendet, Phasenkontrast-Aufnahmen sind als Einsätze (unten links) gezeigt. Die Fotos wurden in 400x Vergrößerung aufgenommen, die Skala indiziert 50  $\mu$ m. **(G)** Western Blot Analyse von 25  $\mu$ g Gesamtprotein aus Lysaten von 129/Sv3 mES-Zellen, die wie in (E) behandelt wurden für Proteinlevel von Ecad,  $\beta$ -Catenin, Oct4 und Nanog. Als Referenzprotein wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet.

Die shRNA vermittelte Reduktion der Expression von Ecad, Oct4 und Nanog konnte außerdem auf dem Proteinlevel durch Immunfluoreszenz gezeigt werden (**Abb. 11F**). Western Blot Analyse von Zelllysaten machte außerdem deutlich, dass die in der Immunfluoreszenz beobachtete verringerte Proteinexpression nicht nur auf einige Zellen beschränkt war, sondern in fast allen Zellen ermittelt werden konnte (**Abb. 11G**). Die zytoplasmatische Domäne von Ecad bindet u.a.  $\beta$ -Catenin, so dass sich die Frage stellte, ob der Proteinlevel von  $\beta$ -Catenin sich in Abhängigkeit des Ecad Levels veränderte. Tatsächlich machte die weitere Analyse der Lysate deutlich, dass auch die Expression von  $\beta$ -Catenin in shEcad transduzierten Zellen deutlich reduziert war.

### **6.2 *Der Verlust von E-Cadherin führt zur Reduktion des Proteinlevels von $\beta$ -Catenin und p120 Catenin aber nicht zu einer Kernlokalisierung***

Die proximale Bindung von  $\beta$ -Catenin und die distale Bindung von p120 Catenin an die zytoplasmatische Domäne von Ecad, stabilisierten das Protein an der Membran. Die Bindung von  $\beta$ -Catenin führt zu einer geordneten Konformation der zytoplasmatischen Domäne (Huber et al., 2001) während p120 Catenin scheinbar ein Motiv besetzt das sonst von RTKs und Kinasen der Src-Familie phosphoryliert wird. Sowohl  $\beta$ -Catenin, als auch p120 Catenin können in den Kern translozieren, für  $\beta$ -Catenin ist bereits vor allem in Tumorzellen gezeigt worden, dass der Verlust von Ecad zu einer Translokation von  $\beta$ -Catenin führt. Daher war interessant, ob der Ecad Verlust in mES-Zellen außer zu einer Reduktion des  $\beta$ -Catenin Levels (**Abb. 11G**), auch zu einer Translokation, führte. Die Lokalisierung von p120 Catenin in mES-Zellen war vor allem interessant, weil seine Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Zunächst konnte in 129/Sv3 Zellen, die nur mit einem Leervektor (empty) transduziert wurden, eine Co-Lokalisierung von Ecad,  $\beta$ -Catenin und p120 Catenin durch Immunfluoreszenz gezeigt werden (**Abb. 12A**). Der shRNA (shEcad) vermittelte Verlust der Ecad Expression führte zu einem Verlust von  $\beta$ -Catenin, wie bereits in **Abb. 1** gezeigt werden konnte und zu einem Verlust der Membranlokalisierung von p120 Catenin (**Abb. 12B und 27B**). Für beide Proteine konnte daher eine eindeutige Translokation in den Zellkern in Abhängigkeit der Reduktion des Ecad Proteinlevels nicht gezeigt werden (**Abb. 12B**).



**Abbildung 12: Die Proteinlevel von  $\beta$ -Catenin und p120 Catenin sind in Abwesenheit von E-Cadherin reduziert in 129/Sv3 Zellen.**

**(A)** Immunfluoreszenz von Ecad, p120 Catenin und  $\beta$ -Catenin in 129/Sv3 Zellen, transduziert mit einem Leervektor (empty) zeigt die Expressionen von Ecad, p120 Catenin und  $\beta$ -Catenin (linke Spalte und vergrößert dargestellt, rechte Spalte), sowie die Co-Lokalisierung (Merge). **(B)** Lokalisierung und Expression von Ecad, p120 Catenin und  $\beta$ -Catenin in 129/Sv3 Zellen, transduziert mit einem shRNA Konstrukt gegen Ecad (linke Spalte und vergrößert dargestellt, rechte Spalte) sowie als Merge. DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet. Die Vergrößerung beträgt 400x, der Maßstab indiziert 50  $\mu$ m.

### 6.3 Die Expression von E-Cadherin und SSEA-1 klassifiziert induzierte pluripotente Zellen

Es konnte bereits an 129/Sv3 mES-Zellen gezeigt werden, dass Ecad eine essentielle Funktion für die Erhaltung der Integrität pluripotenter Zellen besitzt. Daher war es interessant, ob die Expression von Ecad außerdem zur Klassifizierung von iPS-Zellen verwendet werden kann.

## Ergebnisse

---

Während der Reprogrammierung treten neben vollständig reprogrammierten iPSC-Zellen auch Zellen auf, die nur partiell reprogrammiert wurden. Diese Zellen können über die Expression des Oberflächenmarkers SSEA-1 (Stage-Specific Embryonic Antigen-1), einem Kohlenhydratmotiv von Glykoproteinen, die von murinen embryonalen Stammzellen exprimiert werden (Ling and Neben, 1997; Solter and Knowles, 1978), unterschieden werden. Während vollständig reprogrammierte iPSC-Zellen diesen Oberflächenmarker exprimieren, weisen partiell reprogrammierte Zellen diesen Marker nicht auf.

Zur Generierung von iPSC-Zellen wurden murine embryonale Fibroblasten viral mit den vier Yamanaka Faktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc (OSKM) transduziert (Takahashi and Yamanaka, 2006). Dadurch wurde der Reprogrammierungsprozess, der mechanistisch mit dem der mesenchymalen-zu epithelialen Transition vergleichbar ist, initiiert (Eastham et al., 2007). Nach 8d wurden SSEA-1 exprimierende Zellen durch FACS aus dem Gemisch der induzierten Fibroblasten isoliert und angereichert. Dadurch konnte eine Population, welche nur SSEA-1 positive (SSEA-1<sup>pos</sup>) Zellen umfasste, isoliert werden, sowie eine andere Population, die negativ (SSEA-1<sup>neg</sup>) für SSEA-1 war (**Abb. 13A**).

Die FACS Analyse machte deutlich, dass nur ein geringer Anteil der Zellen (12,5 %) eine Expression von SSEA-1 zeigte. Die isolierte SSEA-1<sup>pos</sup> Population konnte ebenso wie die Zellen SSEA-1<sup>neg</sup> Population, als Linie etabliert werden. Die etablierten Zellen beider Populationen wiesen eine stabile Verteilung der SSEA-1 Expression auf. Zellen der SSEA-1<sup>pos</sup> Population, zeigten eine stabile Expression von SSEA-1 (99,7 %), wobei die SSEA-1<sup>neg</sup> Zellen keine Expression von SSEA-1 (96,4 %) zeigten wie durchflusszytometrisch ermittelt werden konnte (**Abb. 13B**). Aus dem Pool der SSEA-1 positiv sortierten Zellen konnten nach einer Verdünnungsplattierung (1 Zelle/ 100 µl) mehrere stabile Zellklone etabliert werden.

Ein durch RT-PCR ermitteltes Expressionsmuster der SSEA-1<sup>pos</sup> Zellklone (Klon#4, #6 und #11) zeigte, dass sie eine zu mES-Zellen vergleichbare Expression von Ecad, Oct4, Nanog und Dppa5 besaßen, während diese Marker mit Ausnahme von Oct4 in den SSEA-1<sup>neg</sup> Zellen nicht exprimiert wurden. Im Gegensatz dazu wiesen diese Zellen eine hohe Expression von Ncad auf sowie eine hohe Expression von viralem Oct4. Beide Gene konnten in den SSEA-1<sup>pos</sup> Klonen bzw. mES-Zellen nicht detektiert werden (**Abb. 13C**). Die unterschiedliche Expression von Ecad und Oct4 konnte auf

## Ergebnisse

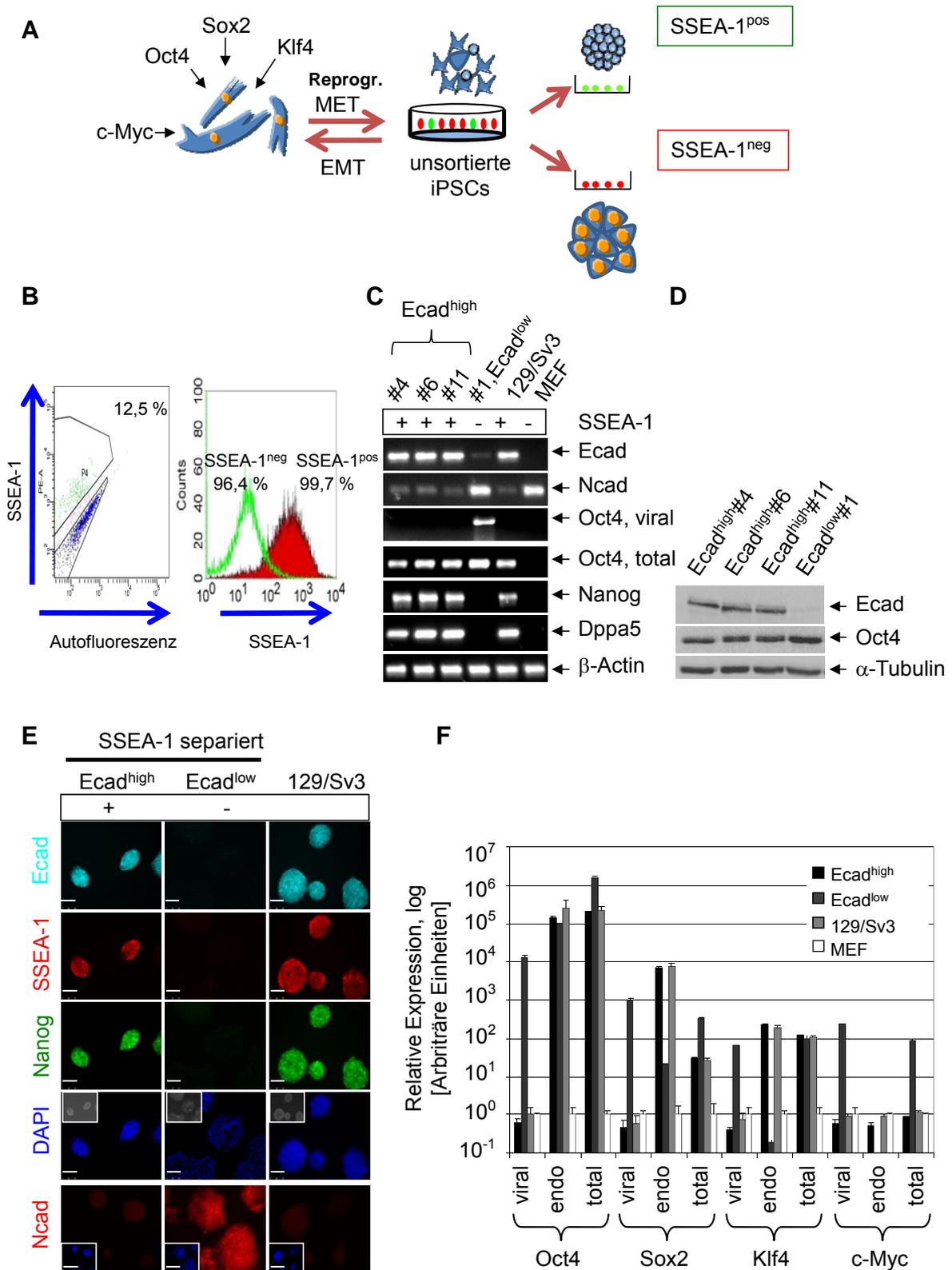
---

Proteinebene für die drei SSEA-1<sup>pos</sup> Klone (weiterhin als Ecad<sup>high</sup> Klone geführt) und SSEA-1<sup>neg</sup> Zellen (weiterhin als Ecad<sup>low</sup> Zellen geführt), gezeigt werden (**Abb. 13D**). Die differenzielle Expression von Ecad und Ncad der Ecad<sup>high</sup> bzw. Ecad<sup>low</sup> Zellen sowie die unterschiedlichen Expressionen der Marker Proteine SSEA-1 und Nanog konnten des Weiteren durch Immunfluoreszenz verifiziert werden. Wie auf mRNA Ebene bereits gezeigt werden konnte, bestätigt die Immunfluoreszenz die hohe Expression von Ecad, SSEA-1 und Nanog in Ecad<sup>high</sup> Zellen (Klon#4), die damit zu den mES-Zellen vergleichbar war. Für Ncad konnte eine gute Membran-assoziierte Lokalisierung in Ecad<sup>low</sup> Zellen ermittelt werden, die weder in den Ecad<sup>high</sup> Zellen noch in den mES-Zellen detektierbar war. Letztendlich wurde außerdem bestätigt, dass eine Expression von Ecad, SSEA-1 und Nanog in den Ecad<sup>low</sup> Zellen nicht detektierbar war (**Abb. 13E**).

Während der Stabilisierung der iPS-Zellen wird die Transkription der viralen Gene abgeschaltet und die endogene Expression von Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc bleibt erhalten (Hotta and Ellis, 2008). Daher können vollständig reprogrammierte iPS Zellen von partiell reprogrammierten, in denen die Expression der viralen Gene nicht stillgelegt wird, unterschieden werden.

Durch real-time RT-PCR wurde die relative Expression von Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc (OSKM) in Ecad<sup>high</sup> und Ecad<sup>low</sup> Zellen, im Vergleich zu 129/Sv3 Zellen und MEFs ermittelt, wobei unterschieden werden konnte zwischen viraler, endogener und totaler Expression. Die totale Expression berücksichtigte die virale und endogene Expression der Gene. Die Detektion der ausschließlich viralen Expression erfolgte mit Primern, die nur LTR (Long-Terminal Repeat)-flankierte Transkripte detektieren konnten. Die Analyse der Expressionsprofile machte deutlich, dass die Expression viraler OSKM-Transkripte in Ecad<sup>high</sup> und 129/Sv3 mES-Zellen mit der niedrigen Expression in MEFs vergleichbar war. Weiterhin wurde ersichtlich, dass in diesen Zellen eine hohe Expression von endogenen OSKM-Transkripten detektierbar war. Die Ecad<sup>high</sup> Zellen erwiesen sich nach diesem ersten Kriterium als vollständig reprogrammiert. Im Gegensatz dazu konnte eine hohe Expression von viralen Transkripten von Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc in Ecad<sup>low</sup> Zellen ermittelt werden, die endogen nur marginal exprimiert wurden (**Abb. 13F**).

# Ergebnisse



## Ergebnisse

---

### **Abbildung 13: Die Expression von E-Cadherin und N-Cadherin unterscheidet vollständig und partiell reprogrammierte iPS Zellen.**

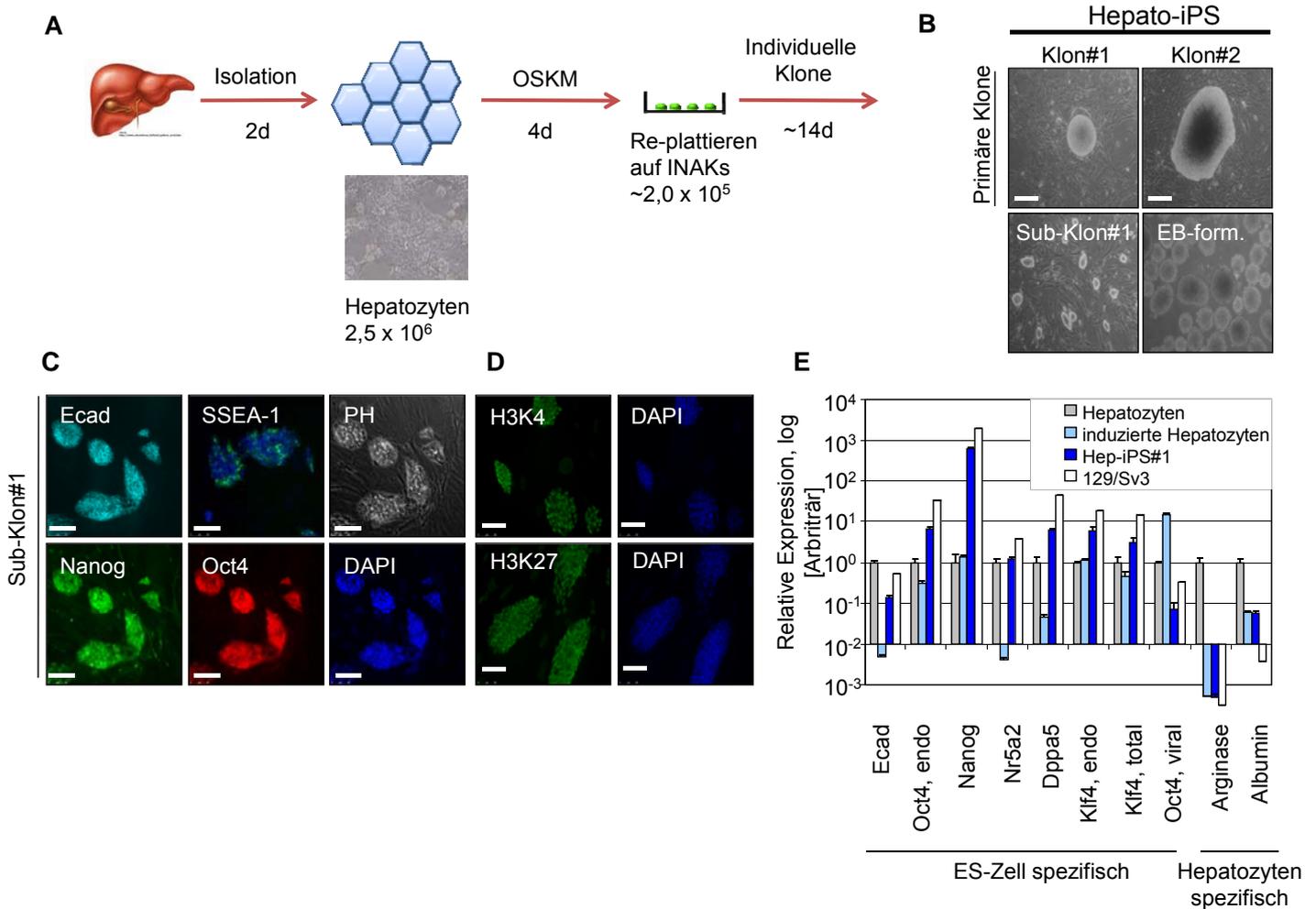
(A) Schematische Darstellung der iPS-Induktion sowie der Anreicherung von SSEA-1± exprimierender Zellen über FACS. (B) Induzierte MEFs wurden 8 Tage nach der Prozessierung des iPS Protokolls unter Verwendung der FACS in SSEA-1<sup>pos</sup> und SSEA-1<sup>neg</sup> Populationen getrennt (dargestellt im Dot-Plot, links). Die Reinheit bezogen auf den Anteil SSEA-1 exprimierender bzw. nicht exprimierender Zellen wurde durchflusszytometrisch nach einigen Passagen analysiert (dargestellt als Histogramm, rechts). (C) Die Expressionen von Ecad, Ncad, Oct4 (viral und total), Nanog und Dppa5 wurden in Zellen von etablierten SSEA-1<sup>pos</sup> Klonen (Ecad<sup>high</sup>#4, #6 und #11) und SSEA-1<sup>neg</sup> Zellen (Klon#1 Ecad<sup>low</sup>). (D) Die Proteinexpression von Ecad und Oct4 wurden in Ecad<sup>high</sup> und Ecad<sup>low</sup> Zellen durch Western Blot Analyse ermittelt. (E) Immunfluoreszenz von Ecad, Ncad, SSEA-1 und Nanog in Ecad<sup>high</sup> Zellen (Klon#4) und Ecad<sup>low</sup> Zellen im Vergleich zu 129/Sv3 mES-Zellen. Zur Detektion der Zellkerne wurde DAPI verwendet (für Ncad extra, links unten gezeigt), die Vergrößerung beträgt 400x, die Skala indiziert 50 µm. Die Phasenkontrast-Aufnahmen sind in den DAPI Aufnahmen integriert. (F) Expressionsanalyse von Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc (für alle viral, endo und total) in Ecad<sup>high</sup> und Ecad<sup>low</sup> Zellen im Vergleich zu mES-Zellen und MEFs. Die Daten sind logarithmisch in arbiträren Einheiten relativ zu MEFs dargestellt. Der Fehlerbalken repräsentiert die Varianz der Duplikate.

### **6.4 Hepatozyten-iPS (Hep-iPS) können direkt, ohne Selektion generiert werden**

Außer Fibroblasten konnten murine Hepatozyten durch die virale Transduktion mit OSKM in iPS-Zellen konvertiert werden. Da Hepatozyten bereits einen hohen Level an E-Cadherin aufweisen, eignen sie sich gut als Ausgangszellen für die Generierung von iPS-Zellen. Die Proliferation von kultivierten Hepatozyten ist allerdings sehr gering, das dass im Vergleich zur klassischen Konvertierung von Fibroblasten eine deutlich, geringere Effizienz der Reprogrammierung zu beobachten war. Tatsächlich konnten ca. 14 Tage nach der Plattierung der OSKM induzierten Hepatozyten, iPS-Klone erhalten werden, die morphologisch nicht von mES-Zellen zu unterscheiden waren (**Abb. 14A**). Auffällig war, dass zwar nur sehr wenige, dafür aber morphologisch perfekte Klone entstanden waren, ohne die Bildung von amorph geformten Kolonien, die immer während der Konvertierung von Fibroblasten auftreten. Die erhaltenen Klone waren stabil und konnten ohne weitere Selektion expandiert und über die Formation von Embryoid Bodies differenziert werden (**Abb. 14B**). Hep-iPS Kolonien waren positiv für Ecad, SSEA-1, Nanog und Oct4 wie durch Immunfluoreszenz ermittelt werden konnte (**Abb. 14C**). Neben den Pluripotenzmarkern konnten in den Hep-iPS Zellen auch H3K4me3 und H3K27me3 Motive identifiziert werden (**Abb. 14D**). Die Expressionsanalyse der Hep-iPS#1

## Ergebnisse

Zellen zeigte im Vergleich zu Hepatozyten, induzierten Hepatozyten (OSKM induz. Hepatozyten) und mES-Zellen keine Expression der Hepatozyten-spezifischen Marker Arginase und Albumin, aber Expressionen der Pluripotenzmarker Oct4, Nanog, Nr5a2, Dppa5 und Klf4. Die Zellen zeigte keine Expression von viralem Oct4.



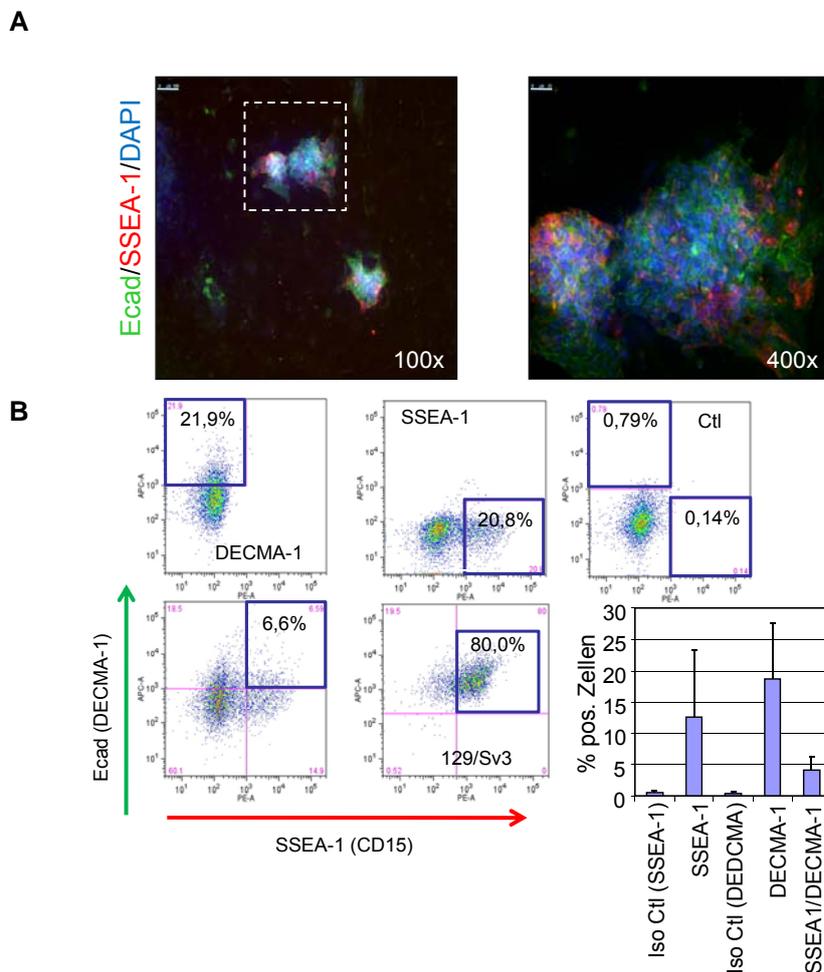
**Abbildung 14: Hepatozyten können in stabile iPS Zellen konvertiert werden.**

(A) Hepatozyten wurden 2 Tage (d) nach der Isolation und Plattierung zu  $2,5 \times 10^6$  Zellen mit OSKM transduziert und nach 4d replattiert auf INAKs. (B) Nach 14d konnten Kolonien identifiziert werden, die morphologisch vergleichbar waren mit mES-Zellen. Die Klone konnten expandiert und differenziert werden. (C) Durch Immunfluoreszenz der Hep-iPS Zellen konnte die Expression von Ecad, SSEA-1, Nanog und Oct4 sowie von (D) H3K4me3 und H3K27me3 gezeigt werden. Die Vergrößerung beträgt 400x, der Maßstab indiziert  $50 \mu\text{m}$ . (E) Real-time RT-PCR Analyse von Hepatozyten, induzierten Hepatozyten (OSKM induz. Hepatozyten), Hep-iPS Zellen (Hep-iPS#1) und 129/Sv3 Zellen für mRNA Level von Ecad, endogenes Oct4 (endo), Nanog, Nr5a2, Klf4 (endo und total), sowie Oct4 viral. Außerdem wurde die Expression der Hepatozyten-spezifischen Gene Arginase und Albumin analysiert. Die Expressionslevel sind logarithmisch in arbiträren Einheiten dargestellt und wurden bezogen auf Hepatozyten.

## Ergebnisse

### 6.5 Die Menge an E-Cadherin/ SSEA-1 positiven Zellen in OSKM Kolonien ist gering

Während der Generierung stabiler iPS Zellen treten während der Reprogrammierung der induzierten Fibroblasten Zellen auf, die nur positiv sind für Ecad und solche, die nur positiv sind für SSEA-1. Während die Ecad Expression natürlich auch als Marker für Zellen epitheliären Charakters dient, scheint auch SSEA-1 (CD15) ebenfalls nicht nur pluripotente Zellen zu markieren. Allerdings zeigen nur stabile iPS Zellen und mES-Zellen eine Co-Expression von Ecad und SSEA-1. Acht Tage nach der viralen Transduktion von MEFs mit OSKM konnten Kolonien ermittelt werden, die eine Co-Lokalisierung von Ecad und SSEA-1 zeigten. In diesen Kolonien konnten aber auch Zellen identifiziert werden, die entweder nur Ecad bzw. nur SSEA-1 positiv waren (Abb. 15A).



**Abbildung 15: Reprogrammierung führt nicht primär zur Bildung von Ecad/SSEA-1<sup>pos</sup> Zellen.**

**(A)** Immunfluoreszenz von Ecad und SSEA-1 in induzierten MEFs acht Tage nach der viralen Transduktion, DAPI wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet. Links werden OSKM-Kolonien in 100x Vergrößerung dargestellt, rechts zeigt die 400x Vergrößerung der markierten Kolonie. **(B)** Durchflusszytometrie von induzierten MEFs, wie in (A) auf Oberflächenexpression von Ecad (DECMA-1) und SSEA-1 Expression sowie von 129/Sv3 mES-Zellen. Die obere Reihe zeigt die Einzelfärbungen bzw. die Isotypen Kontrolle und die untere Reihe zeigt die Doppelfärbungen der OSKM-Kolonien bzw. 129/Sv3 Zellen. Das Diagramm gibt die Quantifizierungen aus n = 3 Expressionsanalysen wieder.

## Ergebnisse

---

Die Menge an Ecad/SSEA-1 doppelt positiven bzw. der Ecad und SSEA-1 positiven Zellen wurden außerdem in OSKM-Kolonien durchflusszytometrisch ermittelt. Obwohl durchschnittlich ~22 % Ecad positive und ~21 % SSEA-1 positive Zellen während der iPS-Generierung auftraten (nach 8d gemessen), war die Anzahl der doppelt positiven Zellen mit 6,6 % eher gering im Vergleich zu 129/Sv3 Zellen (80 %), (**Abb. 15B**). Das nebenstehende Diagramm gibt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Analysen wieder, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

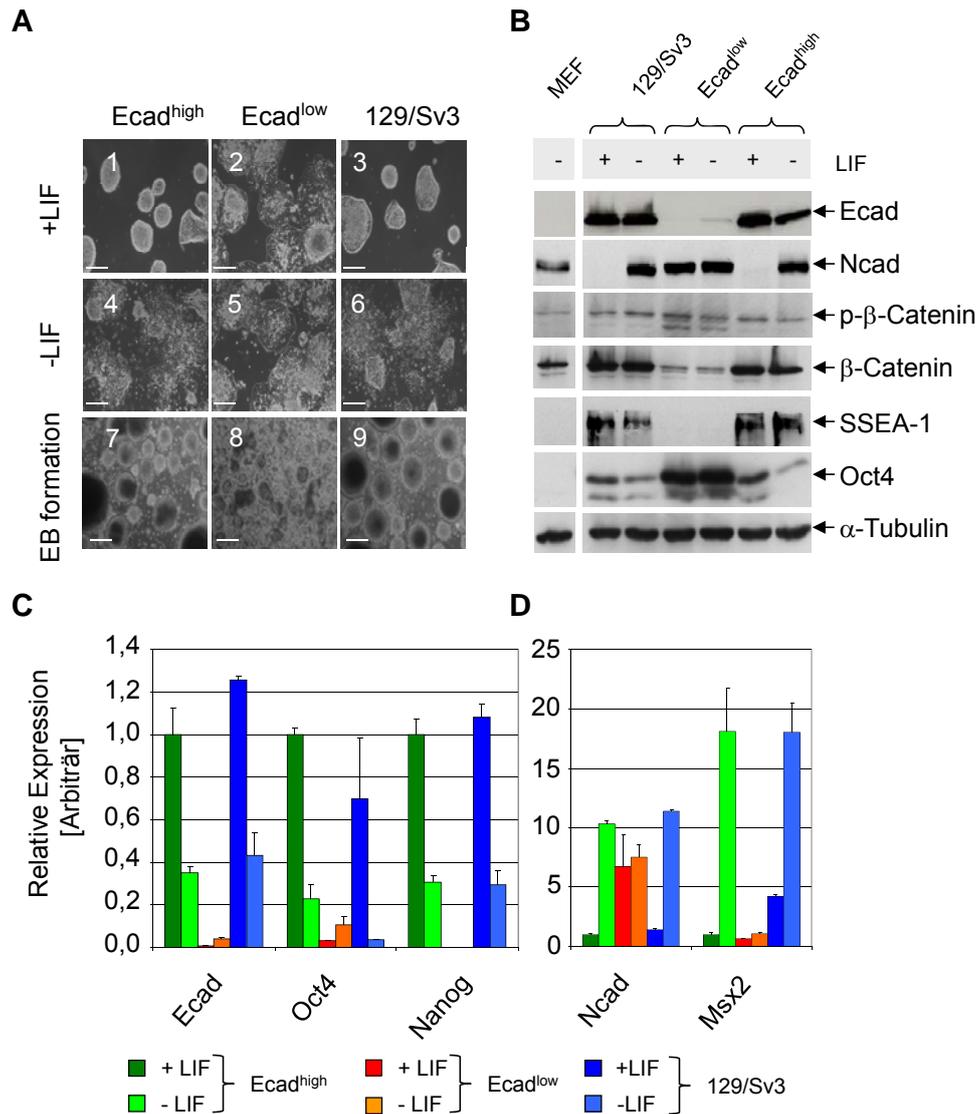
### 6.6 *Der E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Komplex reguliert die Differenzierung*

Zusätzlich zur unterschiedlichen Expression von Markern zeigen Ecad<sup>high</sup> und Ecad<sup>low</sup> Zellen ein sehr unterschiedliches Differenzierungspotential wie durch Kultivierung der Zellen in Abwesenheit von LIF beobachtet werden konnte. Während die Ecad<sup>high</sup> Zellen ebenso wie mES-Zellen unter LIF Entzug spontan differenzierten woraus eine Abflachung der Kolonien resultierte sowie ein Migration von Zellen vom Rand der Kolonien, war dieser Effekt bei Ecad<sup>low</sup> Zellen nicht zu beobachten. In einem weiteren Differenzierungs-Assay wurden Zellen der drei Linien außerdem gerichtet, über die Bildung von Embryoid Bodies (EBs) differenziert. Auch in diesem Assay zeigten nur die Ecad<sup>high</sup> und 129/Sv3 Zellen die Fähigkeit zur Bildung von EBs, während die Ecad<sup>low</sup> Zellen amorphe Zellklumpen bildeten (**Abb. 16A**). Die molekulare Analyse der spontan differenzierten Ecad<sup>high</sup> und mES-Zellen zeigte die Expression von Ncad sowie eine Reduktion des Ecad, SSEA-1 und Oct4 Proteinlevels bei annähernd unveränderten Leveln an phospho- $\beta$ -Catenin und  $\beta$ -Catenin. Die Ecad<sup>low</sup> Zellen zeigten interessanterweise keine Regulation dieser Proteine. Ein Vergleich des Proteinexpressionsmusters von Ecad<sup>high</sup> bzw. mES-Zellen mit Ecad<sup>low</sup> Zellen machte deutlich, dass letztere nicht nur über einen sehr geringen Ecad Proteinlevel verfügten, sondern, dass auch  $\beta$ -Catenin nur marginal in diesen Zellen exprimiert war. Zudem war der detektierbare  $\beta$ -Catenin Level identisch mit dem Level der an Ser33/37/Thr41 phosphorylierten Form von  $\beta$ -Catenin (p- $\beta$ -Catenin), d.h. der niedrige  $\beta$ -Catenin Level resultierte aus der Degradation des Proteins (**Abb. 16B**).

Auf mRNA Ebene konnte die Regulation der mit Pluripotenz assoziierten Gene Ecad, Oct4 und Nanog sowie der Differenzierungsmarker Ncad und Msx2 während der spontanen Differenzierung verifiziert werden. Während Ecad<sup>high</sup> und mES-Zellen eine

## Ergebnisse

deutliche Reduktion der mRNA Level der Pluripotenzmarker sowie einen deutlichen Anstieg der Expression der Differenzierungsmarker zeigten, war eine LIF-abhängige Regulation dieser Gene in Ecad<sup>low</sup> Zellen nicht zu beobachten (**Abb. 16C und D**). Ein weiteres Kriterium zur Bestimmung des Differenzierungspotentials von ES- und iPS-Zelle ist die Bildung von Teratomen, differenzierten Tumoren, die Derivate aller drei Keimblätter aufweisen.



**Abbildung 16: Der E-Cadherin/ β-Catenin Komplex ist notwendig für die Differenzierung von mES- und iPS-Zellen.**

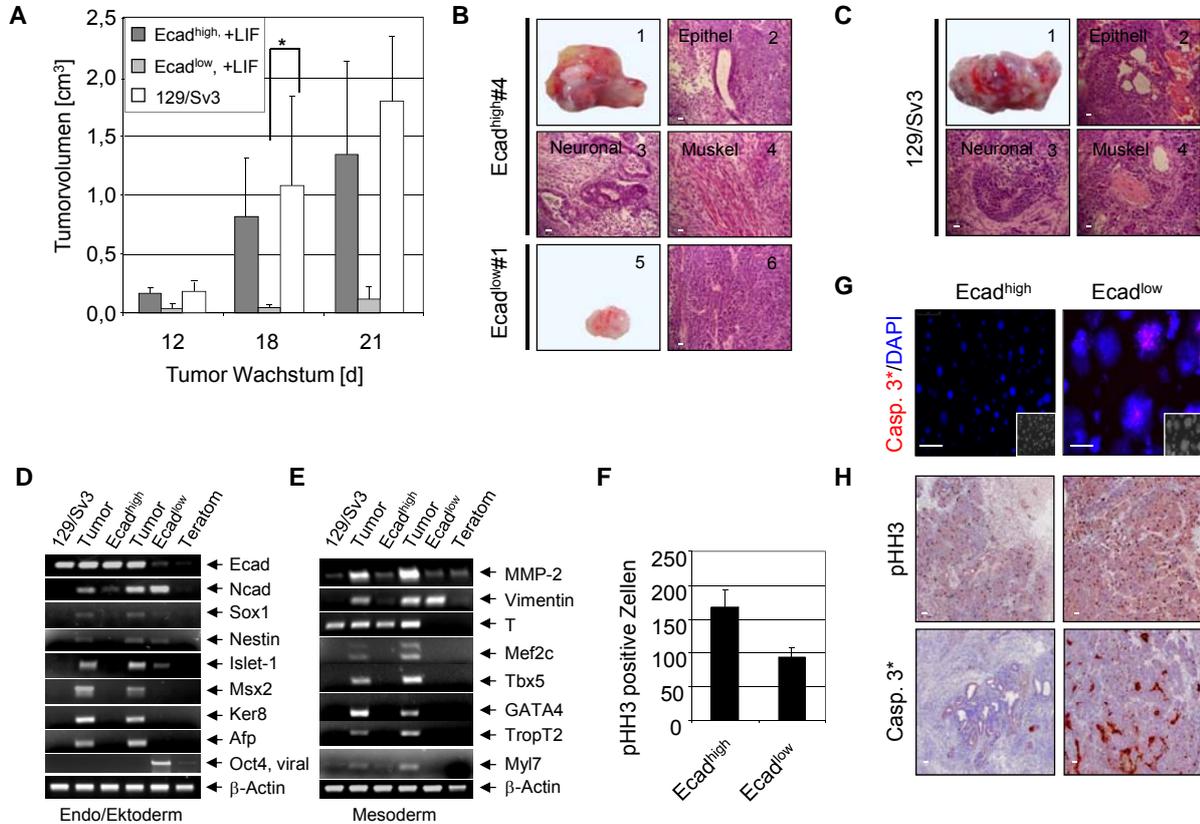
(A) Spontane Differenzierung für 4d von Ecad<sup>high</sup> und Ecad<sup>low</sup> Zellen in Abwesenheit von LIF (4, 5, 6) im Vergleich zu 129/Sv3 Zellen und in Anwesenheit von LIF (1, 2, 3). Die Fähigkeit zur Bildung von Embryoid Bodies wurde getestet (7, 8, 9). (B) Molekulare Analyse der spontan differenzierten Zellen von (A) auf die Proteinlevel von Ecad, Ncad, phospho-β-Catenin (Ser33/37, Thr41), β-Catenin, SSEA-1 und Oct4. Als Beladungskontrolle diente α-Tubulin. (C) Real-time RT-PCR Analyse der unter (A) gezeigten Zellen für die Expressionen von Ecad, Oct4 und Nanog, bezogen auf die Expression in Ecad<sup>high</sup> Zellen kultiviert in Medium mit LIF. (D) Expressionsanalyse wie unter (C) für Ncad und Msx2.

### 6.7 *Ecad<sup>high</sup> iPS Zellen differenzieren in vivo unter Bildung von Teratokarzinomen*

Die subkutane Injektion von Ecad<sup>high</sup> Zellen bzw. 129/Sv3 mES-Zellen führte zur Bildung von Tumoren, deren Größe bereits nach 12d (Ecad<sup>high</sup>-Tumor:  $0,165 \pm 0,045 \text{ cm}^3$ ; 129/Sv3-Tumor:  $0,176 \pm 0,073 \text{ cm}^3$ ) Wachstum ermittelbar war. Wurden Ecad<sup>low</sup> Zellen zeitgleich injiziert, so war weder nach 12d ( $0,040 \pm 0,039 \text{ cm}^3$ ), noch nach 21d ein deutliches Wachstum bzw. eine deutlich erkennbare Tumorbildung beobachtbar. (**Abb. 17A**). Die Tumore, die aus der Injektion resultierten, wurden nach 21d entnommen (Ecad<sup>high</sup>-Tumor:  $1,338 \pm 0,777 \text{ cm}^3$ ; Ecad<sup>low</sup>-Tumor:  $0,115 \pm 0,103 \text{ cm}^3$ ; 129/Sv3-Tumor:  $1,787 \pm 0,550 \text{ cm}^3$  und histologisch analysiert. Dabei wiesen Ecad<sup>high</sup>-Tumore eine starke Differenzierung auf und enthielten Derivate aller drei Keimblätter. So konnten epitheliäre und neuronale Strukturen (**Abb. 17B**) sowie Muskelfibrillen identifiziert werden, die denen von 129/Sv3-Tumoren entsprachen (**Abb. 17C**). Die Strukturen in Ecad<sup>low</sup>-Tumoren waren überwiegend undifferenziert bzw. vermutlich neuroepitheliären Ursprungs (**Abb. 17B**). Auf mRNA Ebene konnte der Grad der Differenzierung der Tumore nochmals bestätigt werden. Die aus der Injektion von Ecad<sup>high</sup> und 129/Sv3 Zellen resultierenden Tumore wiesen ein typisches Muster von Differenzierungsmarkern wie Ncad, Sox1, Nestin, Islet-1 (Neuroektoderm); Ker8, AFP (Endoderm) und MMP-2, Vimentin, Brachyury (Mesoderm) sowie Mef2c, Tbx5, GATA4, TropT2, Myl7 (herzspezifisches Mesoderm) auf. Eine Expression dieser Differenzierungsmarker war in Ecad<sup>low</sup>-Tumoren nicht detektierbar (**Abb. 17D-E**). Da die deutlich reduzierte Tumorgöße außer einem stark eingeschränkten Differenzierungspotential auch aus einer reduzierten Proliferationsrate bzw. erhöhter Apoptose der Ecad<sup>low</sup> Zellen resultieren konnte, wurde durch Immunfluoreszenz auf den Mitose-Marker phospho-Histon H3 (pHH3) und anschließender Quantifizierung der pHH3 positiven Zellen deutlich, dass Ecad<sup>low</sup> Zellen eine verringerte Proliferation gegenüber Ecad<sup>high</sup> Zellen zeigten (**Abb. 17F**). Außerdem wurde die Aktivierung der Caspase 3 (gespaltene, aktive Form, Casp. 3) in Ecad<sup>high</sup> und Ecad<sup>low</sup> Zellen analysiert und es konnte in einem geringen Anteil der Ecad<sup>low</sup> Zellen eine Aktivierung von Caspase-3 und damit eine Aktivierung der Apoptose-Kaskade nachgewiesen. In Ecad<sup>high</sup> Zellen konnte hingegen keine Aktivierung von Caspase-3 detektiert werden (**Abb. 17G**). Immunhistochemische Analysen der Expression von pHH3 und der aktiven Form von Caspase-3 auf Paraffinschnitten von Ecad<sup>high</sup>- und Ecad<sup>low</sup>-Tumoren konnte zum einen zeigen, dass

## Ergebnisse

eine größere Anzahl pHH3 positiver Zellen in  $Ecad^{low}$  Tumoren detektiert werden konnte, als in den  $Ecad^{high}$  Tumoren und zum anderen, dass in  $Ecad^{low}$ -Tumoren außerdem vermehrt apoptotische Zellen auftraten (**Abb. 17H**).



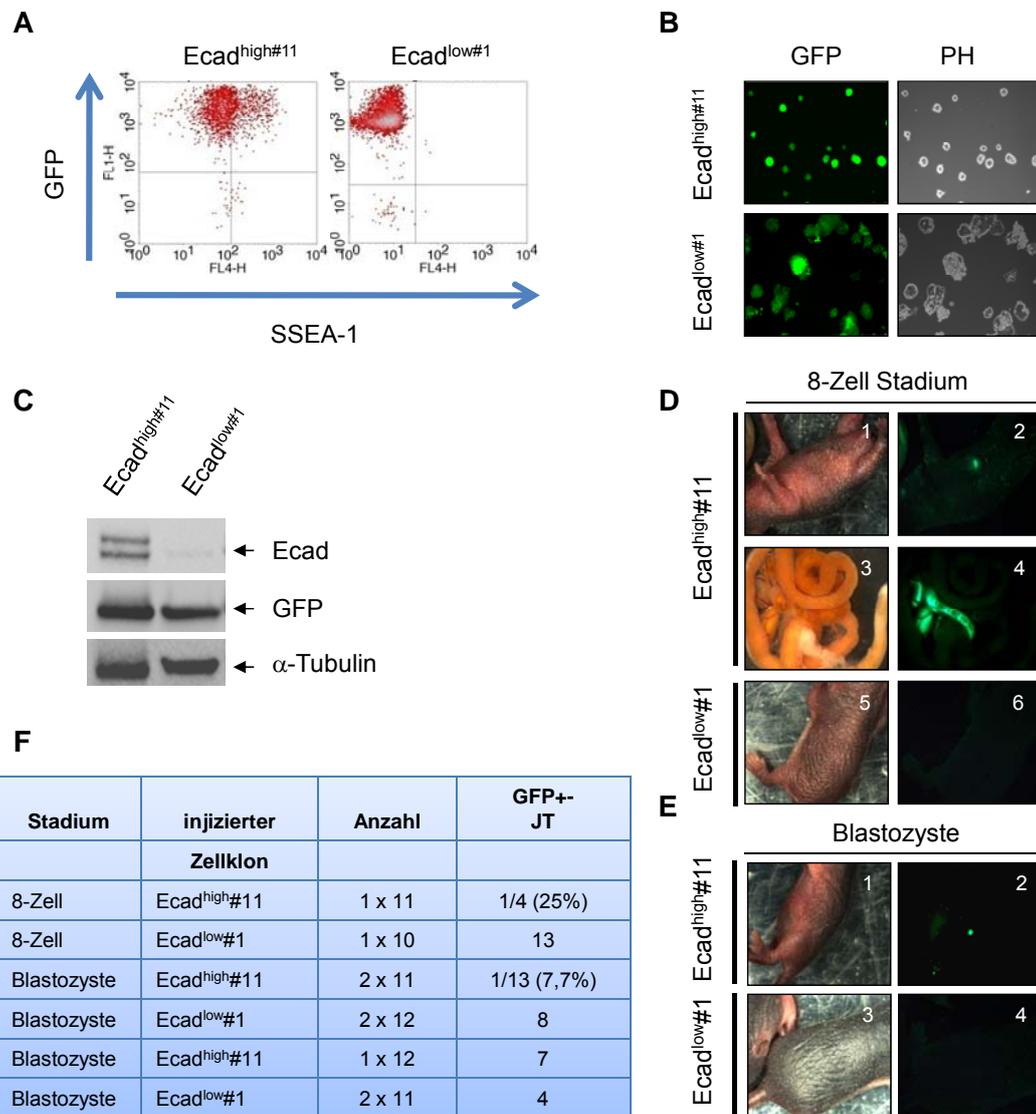
**Abbildung 17: Die Expression von E-Cadherin bestimmt das Differenzierungspotential von iPS Zellen.**

(A) Graphische Darstellung der Tumordaten von  $Ecad^{high}$ - und  $Ecad^{low}$ -Tumoren im Vergleich zu 129/Sv3-Tumoren. Gezeigt sind die Tumolvolumina (in cm<sup>3</sup>) aufgetragen gegen das Tumorstadium in Tagen (d) als Mittelwerte aus drei Injektionen (n = 3), die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Die Tumorgöße der  $Ecad^{high}$ -Tumore unterscheiden sich signifikant \*p = 0,05 von denen der  $Ecad^{low}$ -Tumore. (B) Histologische Analyse der  $Ecad^{high}$  (B1)- und  $Ecad^{low}$  (B5)-Tumore auf Differenzierungsmarker in H&E gefärbten Paraffinschnitten. Epitheliäre (B2), neuronale (B3) und mesodermale/ muskuläre (B4) Strukturen (C) Analyse wie in (B) von 129/Sv3 abgeleiteten Tumoren. (D) und (E) RT-PCR aus Tumorbiospien auf die angegebenen Marker, verglichen sind die undifferenzierten mit den in vivo differenzierten zu Tumoren gewachsenen Zellen. Die PCR wurde nach 30 Zyklen beendet, die PCR Produkte auf einem Agarosegel (2% in TAE) separiert. Hierin bedeuten: Ncad (N-Cadherin), Sox1, Nestin, Islet-1, Ker8 (Keratin8), Afp ( $\alpha$ -Fetoprotein), Matrix Metallo-Proteinease-2 MMP-2, Vimentin, T (Brachyury), Mef2c (Myocyte enhancing factor-2), Tbx5 (T-box protein 5), GATA4 (GATA Binding Protein 4), TropT2 (Troponin T2), Myl7 (Myosin regulatory light chain 7) (F) Quantifizierung von pHH3 positiven Zellen dargestellt als Mittelwerte aus n = 3 Zählungen, die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen. (G) Immunfluoreszenz von  $Ecad^{high}$  und  $Ecad^{low}$  Zellen für Caspase-3 (\*gespaltene, aktive Form, Casp.-3), wie angegeben, Phasenkontrast-Aufnahmen sind verkleinert, jeweils unten rechts dargestellt. Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert, die Vergrößerung beträgt 100x, die Skala indiziert 100  $\mu$ m. (H) Immunhistochemische Analyse von pHH3 und Casp. 3 auf Paraffinschnitten von Tumoren aus  $Ecad^{high}$  und  $Ecad^{low}$  Injektionen. Bereiche, die eine Expression für diese Proteine zeigen, sind bräunlich gefärbt. Die Vergrößerung beträgt 25x, der Maßstab 64 indiziert 500  $\mu$ m.

## Ergebnisse

### 6.8 *Ecad<sup>high</sup>* Zellen integrieren in die Blastozyste und partizipieren an der Embryogenese

Die Integration in die Blastozyste und die Fähigkeit an der Entwicklung zum vollständigen Embryo teilzunehmen sind neben der Fähigkeit Teratokarzinome zu bilden, Eigenschaften pluripotenter Zellen.



**Abbildung 18: Die Expression von E-Cadherin bestimmt das Entwicklungspotential von iPS Zellen.**

(A) Durchflusszytometrische Analyse von FACS-angereicherten GFP positiven *Ecad<sup>high</sup>* und *Ecad<sup>low</sup>* Zellen für GFP und SSEA-1 Expression, dargestellt sind 10.000 Zellen. (B) Fluoreszenzmikroskopie für GFP der FACS angereicherten Zellen zeigt eine gleichmäßig verteilte GFP-Expression, die nicht von apoptotischen Zellen herrührt. (C) Analyse der Ecad und GFP Proteinexpression in etablierten *Ecad<sup>high</sup>* und *Ecad<sup>low</sup>* Zellen, gleichmäßig eingesetzte Proteinmengen wurde durch  $\alpha$ -Tubulin Expression bestätigt. (D) Analyse der aus der Injektion von *Ecad<sup>high#11</sup>* (Klon 11) und *Ecad<sup>low#1</sup>* Zellen erhaltenen Jungtiere (D1, E1) auf GFP positive Areale (D2, E2)/ Organe (D4) nach der Injektion in das 8-Zell Stadium, sowie (E) nach Injektion in Blastozysten. (F) Tabellarische Zusammenfassung der Injektionen von *Ecad<sup>high</sup>* sowie der *Ecad<sup>low</sup>* Zellen in Blastozysten bzw. in Embryonen des 8-Zell Stadiums und der resultierenden geborenen Jungtiere (JT) mit GFP positiven Bereichen.

## Ergebnisse

Zur Analyse des Entwicklungspotentials der etablierten Ecad<sup>high</sup> und Ecad<sup>low</sup> iPS-Zellen wurden unterschiedliche Zellmengen in das 8-Zell Stadium bzw. in Blastozysten injiziert. Zur Detektion des Chimärismus wurden Zellen beider Linien retroviral mit einem GFP-Expressionsplasmid infiziert und GFP<sup>high</sup> Zellen 3d nach der Infektion durch FACS angereichert. Dieser Schritt war vor allem für die Ecad<sup>low#1</sup> Zellen notwendig, da diese eine relativ geringe Transduktionseffizienz aufwiesen. Nach mehreren Passagen wurde die Stabilität der GFP Expression sowie die Expression von SSEA-1 durchflusszytometrisch ermittelt. So wurde ersichtlich, dass ca. 98% der Ecad<sup>high</sup> Zellen positiv waren für GFP und SSEA-1, wohingegen die Ecad<sup>low</sup> Zellen nur positiv waren für GFP (**Abb. 18A und 18B**). Die Anwesenheit von Ecad und GFP bzw. nur von GFP wurde in den transduzierten Ecad<sup>high</sup> bzw. Ecad<sup>low</sup> Zellen bestätigt (**Abb. 18C**). Jungtiere (JT) wurden 2d nach der Geburt auf GFP-positive Areale untersucht. Konklusiv zu den Daten der Teratombildung führten nur die Ecad<sup>high#1/GFP+</sup> Zellen zu chimären Mäusen mit GFP positiven Arealen/ Organen nach Implantation von 8-Zell Stadien (**Abb. 18D**) bzw. Blastozysten (**Abb. 18E**). Injizierte Ecad<sup>low#1/GFP+</sup> Zellen hatten nicht das Potential an der embryonalen Entwicklung teilzunehmen. Weder implantierte 8-Zell Stadien, noch implantierte Blastozysten führten zu chimären Jungtieren (**Abb. 18D, 18E**). Die bei den Injektionen verwendete Anzahl von Blastozysten, sowie die Anzahl erhaltener Jungtiere sind tabellarisch zusammengefasst (**Abb. 18F**).

### **6.9 Die Abwesenheit von E-Cadherin und $\beta$ -Catenin führt zu einer ineffizienten Reprogrammierung von Fibroblasten**

Die Expression von Ecad und die Etablierung des Ecad/  $\beta$ -Catenin Komplexes sind erste Prozesse, die bereits früh während der Reprogrammierung stattfinden und scheinen essentiell für die effiziente Etablierung stabiler iPS-Zellen zu sein. Im Gegensatz zu Ecad, dessen Expression erst induziert werden muss, weisen Fibroblasten schon einen relativ hohen  $\beta$ -Catenin Proteinlevel auf. Um den Effekt der Abwesenheit von Ecad und  $\beta$ -Catenin zu untersuchen, wurden MEFs aus transgenen Mäusen etabliert, die zum einen flankierende loxP-Sequenzen im Exon 6 - 10 des Ecad Genes, Ecad<sup>flox/flox</sup> (Boussadia et al., 2002) bzw. im Exon 2 – 6 des  $\beta$ -Catenin Genes,  $\beta$ -Catenin<sup>flox/flox</sup> (Brault et al., 2001; Huelsken et al., 2001), als Mutant bezeichnet, aufweisen. Durch die OSKM-Induktion von nicht rekombinierten

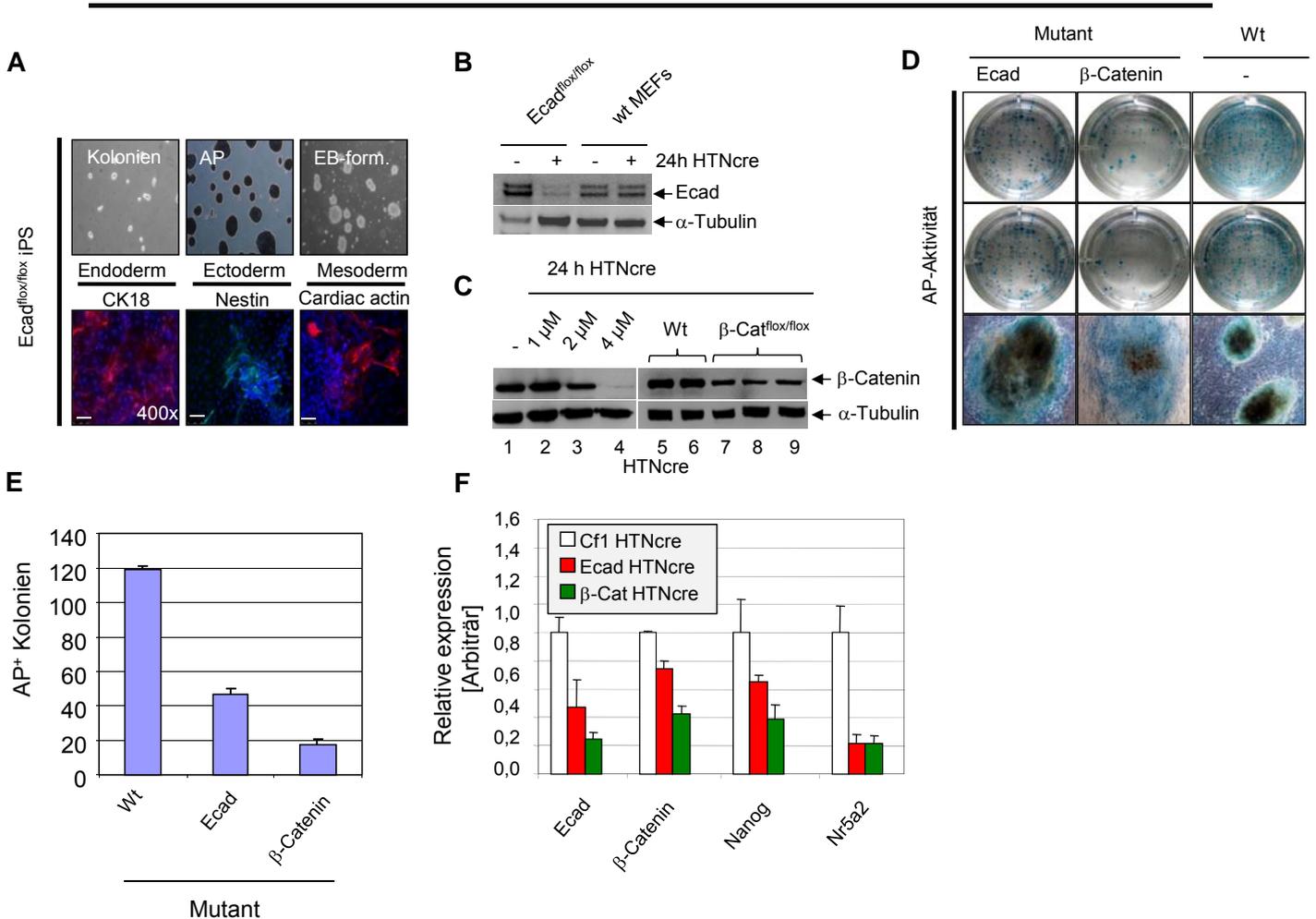
## Ergebnisse

---

Ecad<sup>flox/flox</sup> MEFs konnten stabile iPS-Zellen erhalten werden, die eine Aktivität von alkalischer Phosphatase zeigten und durch EB-Formation differenziert werden konnten in Derivate der drei Keimblätter, Endoderm (CK18), Ektoderm (Nestin) und Mesoderm (Cardiac Actin) (**Abb. 19A**). His-tat-NLS-Cre (HTNcre) Rekombinase vermittelte Deletion der loxP-flankierten Bereiche in den Ecad<sup>flox/flox</sup> bzw.  $\beta$ -Catenin<sup>flox/flox</sup> MEFs führte dazu, dass während des Reprogrammierens kein funktionelles Ecad Protein gebildet werden konnte (**Abb. 19B**) bzw. der Proteinlevel von  $\beta$ -Catenin in den zur OSKM Induktion verwendeten MEFs stark reduziert war (**Abb. 19C**). Da die  $\beta$ -Catenin<sup>flox/flox</sup> MEFs, wie Fibroblasten im Allgemeinen, über einen hohen endogenen Level an  $\beta$ -Catenin verfügen, erfolgte die virale Transduktion erst nach dem der  $\beta$ -Catenin Proteinlevel deutlich reduziert war.

Die so rekombinierten MEFs und separat behandelte Wildtyp (Wt) MEFs wurden, dem iPS-Protokoll folgend, mit OSKM transduziert und prozessiert. Nach 8 Tagen wurde die Anzahl der AP (Alkalische Phosphatase)-positiver Zellen ermittelt. Bereits ohne Quantifizierung war eine deutliche Reduktion der Anzahl der Kolonien die entweder von induzierten Ecad<sup>flox/flox</sup> bzw.  $\beta$ -Catenin<sup>flox/flox</sup> MEFs erhalten wurden im Vergleich zu Wt MEFs, ersichtlich (**Abb. 19D**). Die AP-positiven Kolonien der rekombinierten MEFs waren morphologisch deutlich unterschiedlich zu Kolonien der Wt MEFs (**Abb. 19D**).

# Ergebnisse



## Abbildung 19: Der Reprogrammierungsprozess benötigt den Ecad/β-Catenin Komplex.

(A) Charakterisierung von iPS-Zellen aus der OSKM-Induktion von *Ecad<sup>flox/flox</sup>* MEFs. Die obere Reihe zeigt die Morphologie als Phasen Kontrast Aufnahme, die Aktivität alkalischer Phosphatase und die EB-Formation. Die untere Reihe zeigt die Identifizierung von Endoderm, Ektoderm und Mesoderm abgeleiteten Zellen nach dem Ausdifferenzieren von EBs. (B) *Ecad<sup>flox/flox</sup>* MEFs wurden mittels HTNcre für 24 h rekombiniert und induziert mit OSKM, 8d nach der iPS-Induktion wurde die Proteinexpression der gesamten erhaltenen Kolonien analysiert im Vergleich zu HTNcre behandelten Wt MEFs, die gleichmäßige Beladung wird durch α-Tubulin gezeigt. (C) Proteinexpression von β-Catenin in HTNcre behandelten Wt MEFs, Spalten 1/2 im Vergleich zu rekombinierten β-Catenin<sup>flox/flox</sup> MEFs, 3d (Spalte 3) bzw. 5d (Spalte 4 und 5) nach der Rekombination und vor der OSKM Transduktion. (D) Alkalische-Phosphatase Aktivität von Kolonien 8d nach der Induktion von rekombinierten Ecad und β-Catenin MEFs (Mutant) bzw. HTNcre behandelten Wt MEFs von zwei unabhängigen Experimenten (erste und zweite Reihe). Morphologisch unterscheiden sich dennoch gebildete Kolonien der mutanten MEFs erheblich von Kolonien der Wt MEFs (untere Reihe). (E) Die Anzahl der AP-positiven Kolonien in (C) wurde durch Auszählung ermittelt, der Fehlerbalken repräsentiert die Varianz. (F) Real-time RT-PCR Analyse der gesamten erhaltenen Kolonien der OSKM transduzierten MEFs für Ecad (Primer bindet im Deletionsabschnitt der mRNA, Exon 6 – 7), β-Catenin (Primer bindet im Deletionsabschnitt der mRNA, Exon 3 – 6), Nanog und Nr5a2. Die Expression ist bezogen auf Wt MEFs.

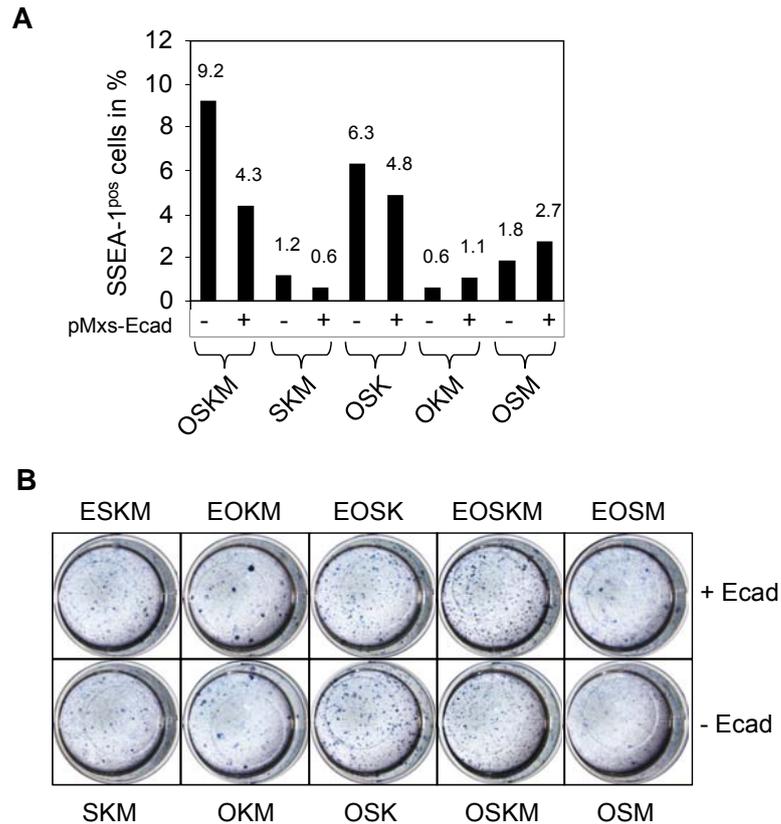
## Ergebnisse

---

Die Auszählung der AP-positiven Kolonien erfolgte aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten, der Fehlerbalken repräsentiert die Varianz dieser Zählungen und ergab für Ecad<sup>flox/flox</sup>  $47 \pm 4$  ( $p = 0,0013$ ) Kolonien,  $\beta$ -Catenin<sup>flox/flox</sup>  $18 \pm 4$  ( $p = 0,0006$ ) Kolonien und für Wt MEFs  $119 \pm 2$  Kolonien (**Abb. 19E**). Die Expressionsanalyse der mRNA Level von Ecad,  $\beta$ -Catenin, Nanog und Nr5a2 der gesamten, erhaltenen Kolonien aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten zeigte eine deutliche Reduktion der Expressionslevel. Interessanterweise sind Ecad und  $\beta$ -Catenin korreliert, eine Reduktion des  $\beta$ -Catenin Levels resultierte in einer verminderten Ecad Expression, gleicherweise führte die Verhinderung der Ecad Expression während der OSKM Induktion zu Zellen mit einem reduzierten  $\beta$ -Catenin Level (**Abb. 19F**).

### **6.10 Die Überexpression von E-Cadherin als zusätzlicher Faktor führt nicht zu einer Erhöhung der Effizienz der Reprogrammierung**

Wie bereits gezeigt ist Ecad für die Erhaltung der Integrität und des pluripotenten Zustands von 129/Sv3 Zellen essentiell. Die Ecad Expression hat während der iPS-Induktion außerdem einen entscheidenden Einfluss auf die Reprogrammierung, und ist maßgeblich an der Etablierung vollständig reprogrammierter iPS Zellen beteiligt. Interessanterweise konnte eine Überexpression von Ecad als zusätzlicher Faktor (EOSKM) die Effizienz der Reprogrammierung nicht bzw. in einigen Faktorkombinationen nur marginal erhöhen. Zehn unterschiedliche Kombinationen der Faktoren OSKM wurden getestet in An- oder Abwesenheit von Ecad und nach 10 – 12 Tagen die Anzahl SSEA-1 positiver Zellen durchflusszytometrisch ermittelt (**Abb. 20A**). Die Überexpression von Ecad hatte in 60 % der Kombinationen eher einen inhibitorischen Einfluss bezogen auf die SSEA-1 Expression, lediglich bei den Kombinationen OKM und OSM konnte bei Anwesenheit von Ecad eine leichte Erhöhung in der Anzahl SSEA-1 positiver Zellen beobachtet werden. Parallel dazu wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase in MEFs, transduziert mit den unterschiedlichen Faktorkombinationen, ermittelt (**Abb 20B**). In den Kombinationen EOKM/ OKM und EOSM/ OSM konnte ein leichter Anstieg der AP+ Zellen ermittelt werden, wodurch das Ergebnis der SSEA-1 Expressionsanalyse widerspiegelt wird. Allerdings war der Einfluss von Ecad auf OSKM nur marginal.



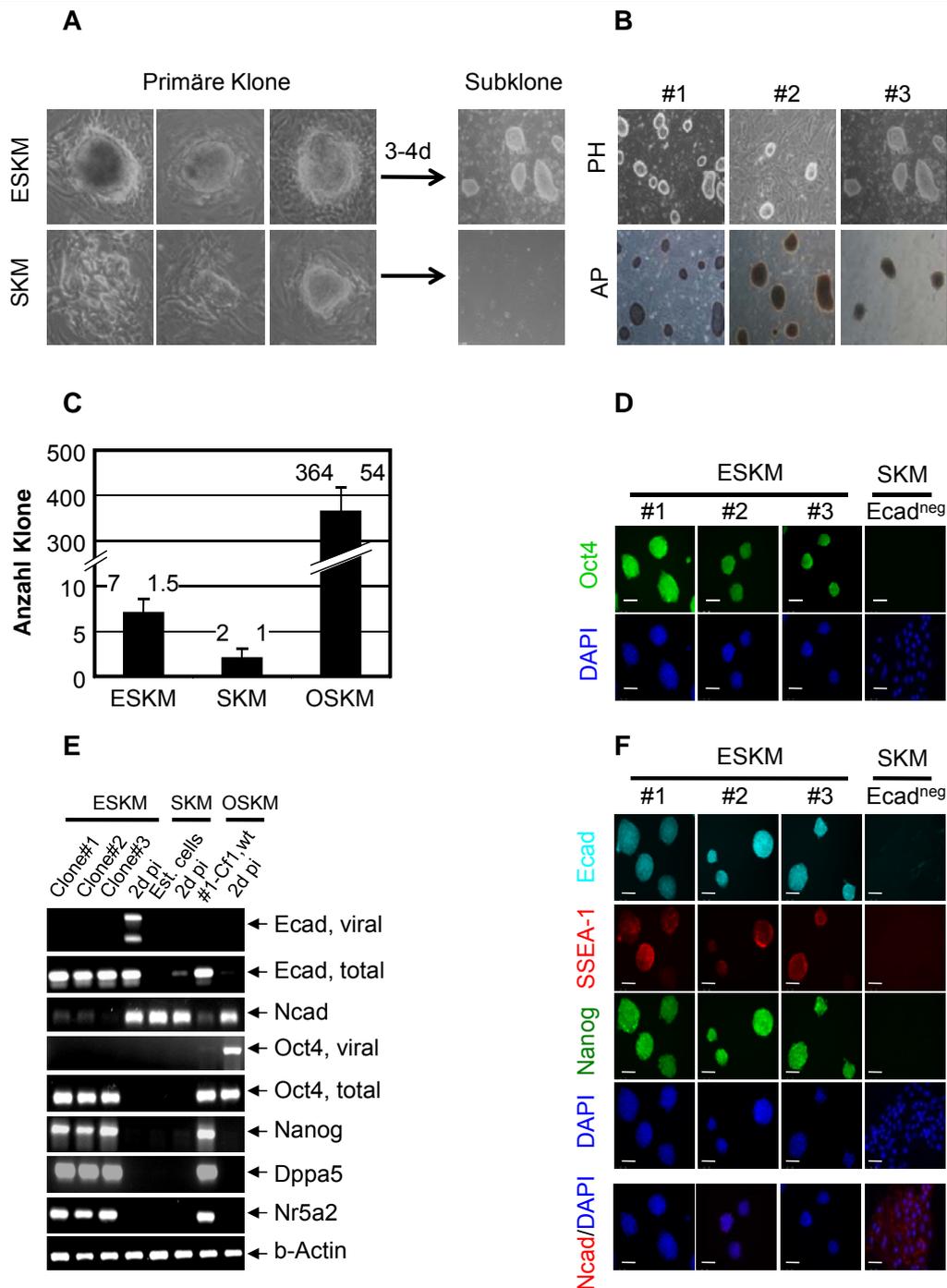
**Abbildung 20: Die Überexpression von E-Cadherin als zusätzlicher Faktor kann die Effizienz der Reprogrammierung nicht erhöhen.**

**(A)** Wt MEFs wurden transduziert mit den Faktorkombinationen SKM, OKM, OSK, OSKM und OSM in An- und Abwesenheit von Ecad und nach 10 bzw. 14 (bei Abwesenheit von c-Myc) Tagen die Menge an SSEA-1 positiven Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. **(B)** Die Aktivität von alkalischer Phosphatase wurde in MEFs, transduziert wie in (A), ermittelt.

## 6.11 *E-Cadherin Überexpression führt zur Bildung von stabilen iPS Zellen bei Abwesenheit von exogenem Oct4*

Obwohl die Überexpression von Ecad während der Reprogrammierung als zusätzlicher Faktor, also EOSKM oder als Substituent gegen Sox2, Klf4 oder c-Myc den Anteil SSEA-1- Zellen bzw. AP-positiver Zellen nicht erhöhen konnte (siehe Abb. 9), konnten MEFs überraschenderweise mit der Faktorkombination ESKM ohne Oct4 unter Anwesenheit extrazellulärer Matrix (Matrigel) und LIF reprogrammiert werden. Die Primärkolonien, die aus der ESKM-Induktion hervorgingen waren morphologisch sehr ähnlich zu mES-Zellen und die Subklonierung ergab ohne die Notwendigkeit einer weiteren Anreicherung durch FACS, stabile Klone (**Abb. 21A**). Die Analyse dieser Klone ergab, dass sie positiv waren für alkalische Phosphatase (**Abb. 21B**).

## Ergebnisse



**Abbildung 21: ESKM Klone exprimieren Oct4 und zeigen alle Eigenschaften von ES- Zellen.**

(A) Lichtmikroskopische Aufnahme von gepickten ESKM und SKM Primärklonen auf INAKs. Die Klone wurden nach 3 – 4 Tagen expandiert. (B) Morphologie und Detektion der Aktivität von alkalischer Phosphatase von etablierten ESKM Klonen. (C) Quantifizierung von ESKM, OSKM und SKM Klonen 14 Tage nach der Ausplattierung auf Matrigel. (D) Immunfluoreszenz von ESKM Klonen (#1 - #3) sowie SKM Zellen auf Oct4. (E) Expression von Ecad (viral und total), Ncad, Oct4 (viral und total), Nanog, Dppa5 und Nr5a2 von Zellen aller ESKM Klone sowie ESKM 2d pi; SKM Zellen, SKM 2d pi; OSKM Zellen und OSKM 2d pi, ermittelt durch RT-PCR nach 30 Zyklen, die Expression von  $\beta$ -Aktin wurde als Beladungskontrolle verwendet. Die PCR Produkte wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt. (F) Proteinexpression von Ecad, SSEA-1, Nanog und Ncad wie für (D) gezeigt. DAPI wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet, die Vergrößerung beträgt 400x, der Maßstab indiziert 50  $\mu$ m.

## Ergebnisse

---

Die Anzahl der ESKM Klone, die nach Plattierung von  $2,0 \times 10^5$  Zellen/ 10 cm Schale erhalten wurden, lag mit  $7 \pm 1,5$  deutlich niedriger, als für OSKM ( $365 \pm 55$ ) ermittelt werden konnte. Noch geringer war die Anzahl der nach Morphologie bestimmten SKM Klone, von denen nur  $2 \pm 1$  gefunden wurden (**Abb. 21C**). Während allerdings aus den ESKM Klonen drei stabile Linien (Klon#1, Klon#2, Klon#3) etabliert werden konnten, ergab die Subklonierung der SKM Klone keine morphologisch mit ESKM Kolonien bzw. mES-Zellen vergleichbaren Klone. Dennoch konnten die SKM Zellen stabil expandiert und als Linie etabliert werden. Die ESKM Zellen aller drei Klone waren positiv für Oct4, wie durch Immunfluoreszenz gezeigt werden konnte (**Abb. 21D**). Des Weiteren konnte durch RT-PCR für Ecad und Oct4 (beide viral und total), sowie für Ncad, Nanog, Dppa5 und Nr5a2 gezeigt werden, dass alle drei ESKM Klone eine hohe Expression von Ecad, und Oct4, Nanog, Dppa5 und Nr5a2 aufwiesen und sehr geringe Level an Ncad.

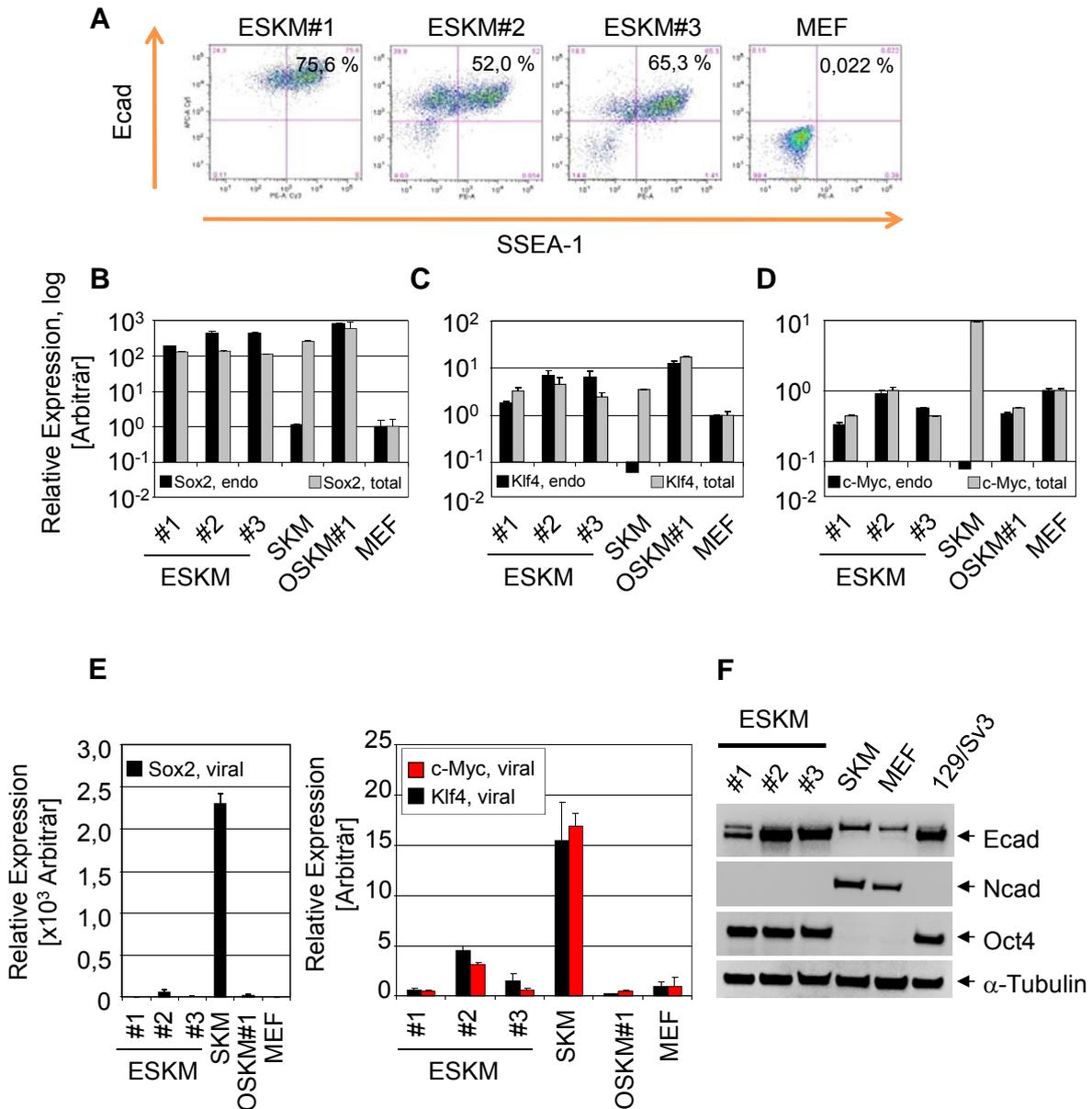
Die Expression von viralem Ecad war ausschließlich in ESKM transduzierten MEFs 2d nach der Induktion (post induction, pi) detektierbar. Da die ESKM Induktion in Abwesenheit von exogenem Oct4 erfolgte, konnte eine virale Oct4 Expression weder in ESKM abgeleiteten Zellen bzw. Klonen noch in SKM Zellen nachgewiesen werden. Lediglich in OSKM induzierte Zellen, die 2d nach der Induktion analysiert wurden, war eine hohe Expression von viralem Oct4 detektierbar (**Abb. 21E**). Die Markerexpression wie sie durch RT-PCR ermittelt wurde, konnte durch Immunfluoreszenz auf Ecad, SSEA-1, Nanog und Ncad in Zellen der ESKM Klone bzw. in SKM Zellen verifiziert werden (**Abb. 21F**).

### **6.12 ESKM Zellen besitzen alle Eigenschaften vollständig reprogrammierter iPS Zellen**

Die durchflusszytometrische Analyse der ESKM Klone konnte zeigen, dass diese Klone eine hohe Expression von Ecad auf der Oberfläche zeigen. Des Weiteren wurde deutlich, dass der überwiegende Anteil Ecad exprimierender Zellen auch SSEA-1 positiv war. Der Anteil an Ecad/ SSEA-1 doppelt positiven Zellen liegt zwischen 75,6 % für ESKM#1 und 52,0 % für ESKM#2, sowie 65,3 % für ESKM#3 (**Abb. 22A**). Diese Klone zeigten außerdem ein mit 129/Sv3 mES-Zellen vergleichbares Expressionsmuster für Sox2, Klf4 und c-Myc. Die endogene Expression dieser Gene war mit der Gesamtexpression (total) annähernd identisch

## Ergebnisse

und außerdem vergleichbar mit der Expression in einem konventionell generierten OSKM Klon (OSKM#1).



**Abbildung 22: ESKM Klone exprimieren OSKM auf endogenem Level.**

(A) Durchflusszytometrische Analyse der Expressionen von Ecad und SSEA-1, Ecad wurde N-terminal mit dem DECMA-1 Antikörper detektiert, als Negativkontrolle wurden MEFs verwendet. (B) Quantitative real-time RT-PCR für Level von Sox2, endo und total in ESKM Zellen aller drei Klone, SKM Zellen, sowie OSKM Zellen eines etablierten iPS Klons und MEFs. (C) Analyse wie unter (B) derselben Zelllinien für Klf4 endo und total. (D) Analyse wie unter (B) derselben Zellen für c-Myc endo und total. (E) Expressionsanalyse der unter (B) angegebenen Zellen für Level von viralen Transkripten von Sox2, Klf4 und c-Myc. Die unter (B) - (E) angegebenen Expressionslevel wurden auf die Expression in MEFs bezogen und entweder als logarithmische Werte (B) – (D) oder als lineare Werte (E) angegeben. (F) Proteinexpression von Ecad, Ncad und Oct4 in ESKM Zellen im Vergleich zu SKM Zellen, MEFs und 129/Sv3 mES-Zellen,  $\alpha$ -Tubulin wurde als Beladungskontrolle verwendet.

## Ergebnisse

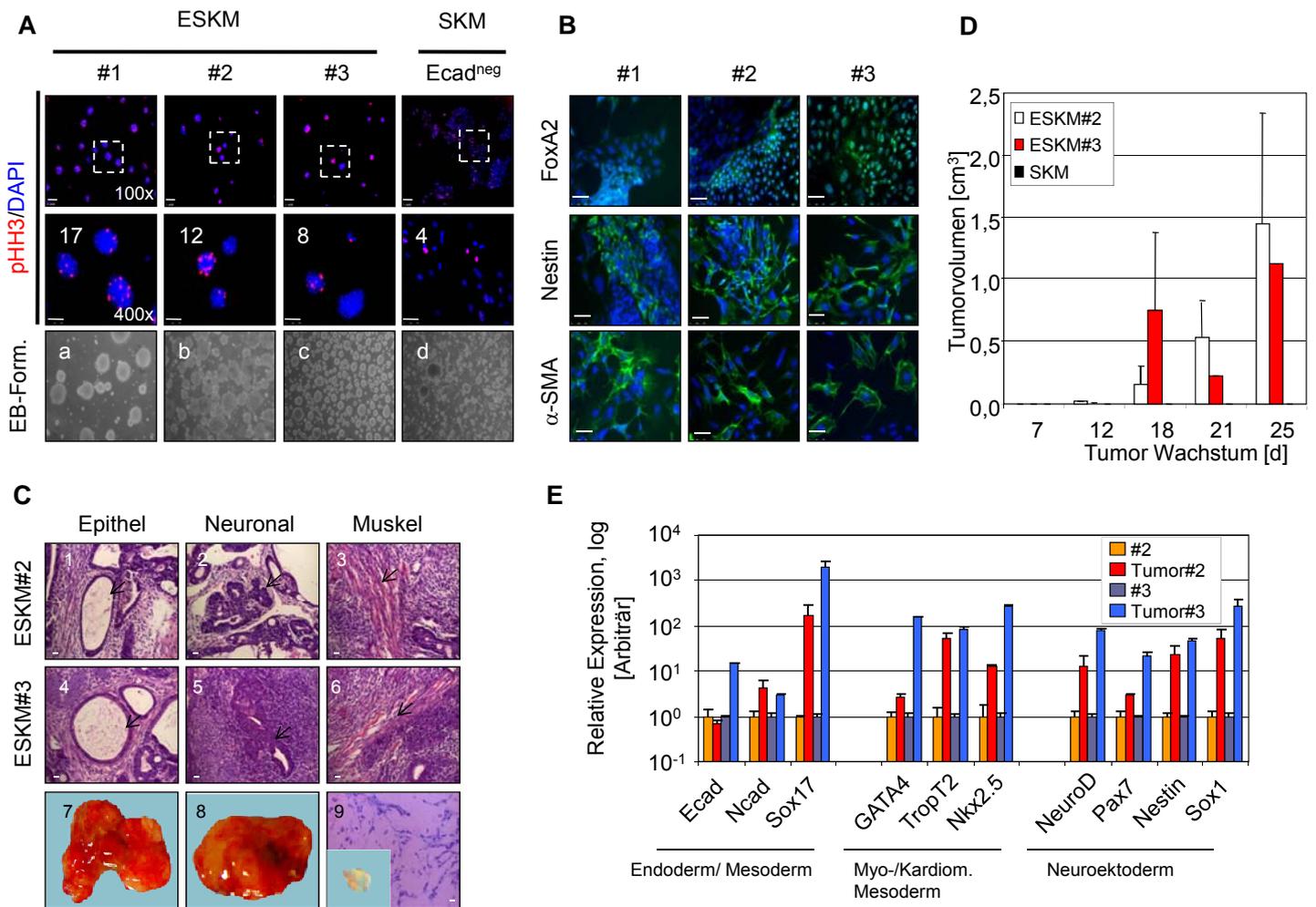
---

SKM Zellen hingegen zeigten eine klare Abgrenzung, die endogenen Level von Sox2, Klf4 und c-Myc waren niedrig gegenüber der totalen Expression (**Abb. 22B-D**). Der hohe Level der totalen Expression in den SKM Zellen rührte daher größtenteils von viralen Transkripten von Sox2, Klf4 und c-Myc her (**Abb. 22E**). Ein Vergleich der Proteinlevel von Ecad, Ncad und Oct4 in total Lysaten von ESKM Zellen und SKM Zellen zeigte im Vergleich zu MEFs und 129/Sv3, dass ESKM Zellen keine Expression von Ncad aufwiesen und dass SKM Zellen negativ waren für Ecad und Oct4. Das Ergebnis der Antikörperfärbung konnte so nochmals und vor allem bezogen auf das Gesamtprotein zeigen, dass ESKM Zellen keine Expression von Ncad, aber eine zu 129/Sv3 Zellen vergleichbare Expression an Ecad und Oct4 zeigen (**Abb. 22F**).

### **6.13 Die in vivo Differenzierung von ESKM Zellen resultiert in der Bildung differenzierter Tumore**

Zur Ermittlung des Differenzierungspotentials der ESKM-iPS Zellen der drei unabhängig etablierten Klone, wurden die Zellen in vitro über die Bildung von Embryoid Bodies und in vivo über die subkutane Injektion in NOD/SCID Mäusen und der daraus resultierenden Bildung von Teratomen, differenziert. Vor der Differenzierung wurde die Proliferation über das Auftreten der phosphorylierten Form von Histon H3 ermittelt (**Abb. 23A**). Die Proliferationsraten der ESKM Zellen waren untereinander vergleichbar, aber deutlich höher, als in den SKM Zellen. Das Differenzierungspotential der ESKM abgeleiteten Zellen ist hoch wie zunächst durch die Bildung von Embryoid Bodies gezeigt werden konnte (**Abb. 23A**). Immunfluoreszenz von ausdifferenzierten EBs konnte zeigen, dass Zellen gebildet wurden, die positiv waren für den aus dem Endoderm abgeleiteten Transkriptionsfaktor FoxA2 (Forkhead-box protein A2, HNF3 $\beta$ ), oder für das Intermediärfilament Protein Nestin, das vor allem in neuronalen Zellen exprimiert wird. Außerdem konnten Zellen identifiziert werden, welche eine Expression für die vorwiegend in der glatten Muskulatur residierende Form von Aktin,  $\alpha$ -Smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) aufwiesen (**Abb. 23B**). Dieses Ergebnis konnte in vivo durch die Bildung von differenzierten Teratomen nach subkutaner Injektion von ESKM Zellen (Klon #2 und #3) in NOD/SCID Mäuse bestätigt werden.

# Ergebnisse



## Abbildung 23: ESKM Zellen zeigen ein hohes in vivo Differenzierungspotential.

(A) Immunfluoreszenz von ESKM und SKM Zellen, wie gezeigt, für den Proliferationsmarker phospho-Histon H3 (pHH3). Zur Detektion der Zellkerne wurde DAPI verwendet, gezeigt sind 100x und 400x Vergrößerungen, die Maßstäbe indizieren 100  $\mu$ m bzw. 50  $\mu$ m. Die Menge an pHH3 positiven Zellen ist jeweils oben links angegeben. (A a-d) Embryoid Body Formation von ESKM und SKM Zellen. (B) Analyse von EB abgeleiteten Zellen nach dem Auswachsen von EBs der ESKM-iPS Zellen auf Gelatine für Differenzierungsmarker FoxA2 (Forkhead box protein A2), Nestin und  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -Smooth Muscle Actin) (alle grün), DAPI wurde als Kernmarker verwendet. Die Vergrößerung beträgt 400x, der Maßstab indiziert 50  $\mu$ m. (C) Histologische Analyse von Paraffinschnitten von ESKM (Klon#2 und #3) Zellen abgeleiteten Teratomen sowie von einem von SKM Zellen abgeleiteten Tumor. In ESKM Teratomen (7/8) sind epitheliäre (1/4), neuronale (2/5) sowie muskuläre (3/6) Strukturen erkennbar. Der SKM Tumor zeigt nur undifferenzierte Strukturen (9) und unten links in (9). Die Vergrößerung beträgt 25x, der Maßstab indiziert 500  $\mu$ m. (D) Grafische Darstellung des Tumorvolumens in cm<sup>3</sup> in Abhängigkeit des Tumor Wachstums in Tagen (d), dargestellt sind Mittelwerte aus n = 3 Tumoren, der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung. (E) Expressionsanalyse der mRNA Level von Differenzierungsmarkern in ESKM abgeleiteten Tumoren. Analysiert wurden Ecad, Ncad und SRY-box protein 17 (Sox17) als Endoderm und Mesoderm Marker; GATA4 (GATA Binding Protein 4), Troponin T2 (TropT2) und Nkx2.5 als Marker für kardiomyogenes Mesoderm, NeuroD (Neurogenic Differentiation Factor 1), Pax7 (Paired Box Gene 7), Nestin und Sox1 für neuronale Differenzierung.

## Ergebnisse

---

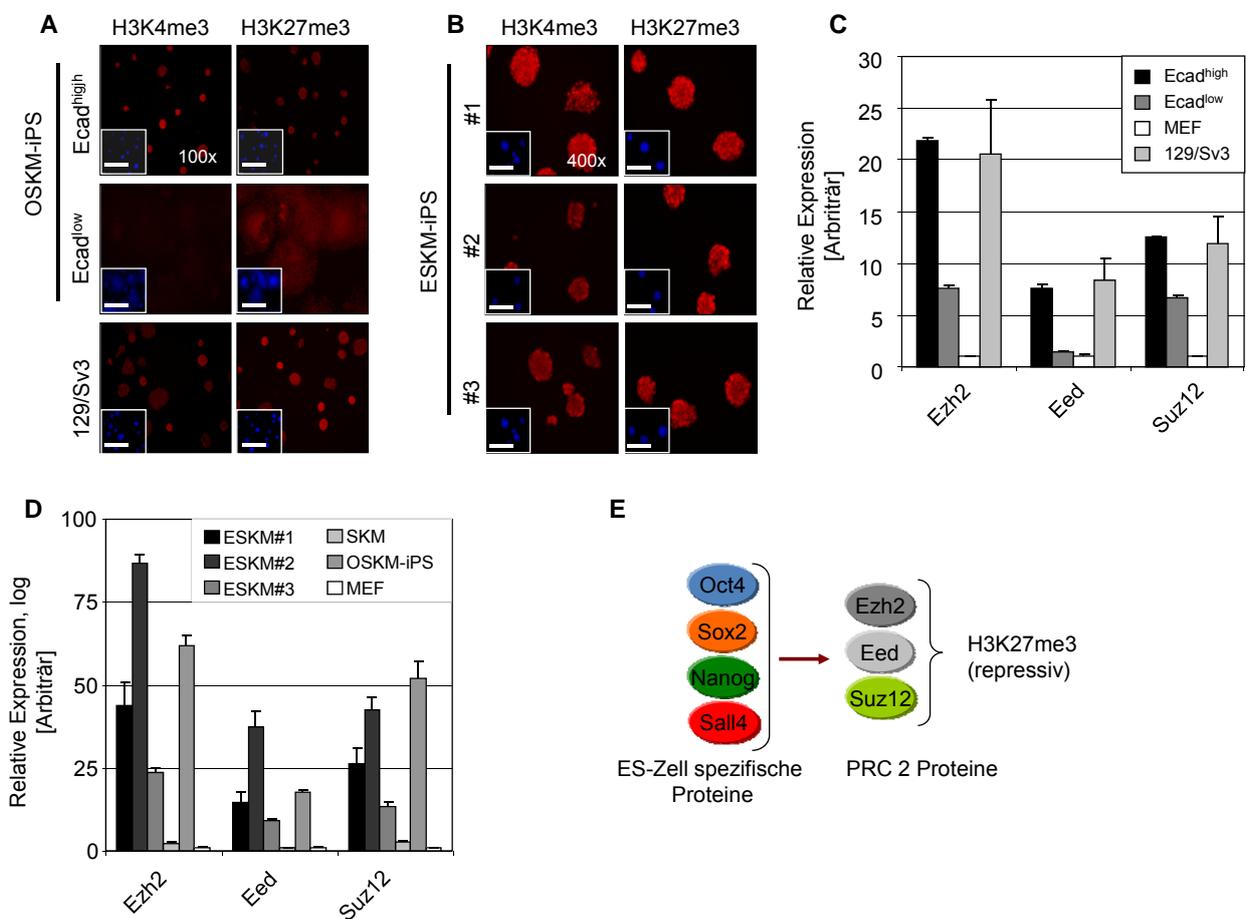
Die Teratome, die nach 25 Tagen analysiert wurden, besaßen epitheliäre, neuronale und muskuläre Strukturen (**Abb. 23C**). Im Gegensatz zu ESKM Zellen, zeigten SKM Zellen ein sehr begrenztes in vivo Differenzierungspotential. Bereits durch die Größe der Tumore wird deutlich, dass die ESKM Zellen (ESKM#2,  $1,447 \pm 0,898 \text{ cm}^3$ ; C7 und ESKM#3,  $1,120 \pm 0,040 \text{ cm}^3$ , C8) in gleicher Zeit ein deutlich stärkeres Wachstum zeigten, als die SKM Zellen ( $0,0013 \pm 0,001 \text{ cm}^3$ , links unten in **Abb. 23C**). Zudem ergab die histologische Analyse, dass es sich bei den SKM abgeleiteten Tumoren vor allem um undifferenzierte Tumore handelte (**Abb. 23C**). Die Tumorumfänge der ESKM und SKM abgeleiteten Tumore sind in Abhängigkeit zum Tumorstadium dargestellt (**Abb. 23D**). Die Expressionsanalyse der Tumore ergab im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen für beide Tumore ein deutliches Differenzierungsmuster. Die Tumore zeigten Expression von Ecad, Ncad und Sox17 als Marker für Endoderm/ Mesoderm; GATA4, TropT2 und Nkx2.5 als Marker für myo- und kardiomyo-mesoderm sowie NeuroD, Pax7, Nestin und Sox1 als Marker für neuronale Differenzierung (**Abb. 23E**).

### ***6.14 H3K4me3 und H3K27me3 Methylierungen sind präsent im Chromatin vollständig reprogrammierter iPS Zellen aber abwesend in partiell reprogrammierten Zellen***

Die Reprogrammierung von Fibroblasten zu iPS Zellen geht einher mit einer drastischen Veränderung des Epigenoms, vor allem die Modifikationen an Histon H3 sind dabei entscheidend. Unterschieden werden die deaktivierenden Modifikationen wie die Methylierungen von Histon H3 an Lysin (K) 27 und K9 von den aktivierenden Di- und Tri-Methylierungen an Lysin 4, H3K4me2/3, sowie die Acetylierung an K9. Embryonale Stammzellen, wie auch vollständig reprogrammierte iPS Zellen, weisen sowohl aktivierende, als auch deaktivierende Histon-Modifikationen auf (Hemberger et al., 2009). Eine Immunfluoreszenz für H3K4me3 und H3K27me3 in Ecad<sup>high</sup> iPS Zellen konnte zeigen, dass diese Zellen positiv für beide Modifikationen und damit vergleichbar zu 129/Sv3 mES-Zellen waren. Interessanterweise zeigten Ecad<sup>low</sup> nur die repressive Modifikation H3K27me3 auf, nicht aber auch gleichzeitig die aktivierende Modifikation H3K4me3 (**Abb. 24A**). Zellen der ESKM Klone #1 - #3 wiesen ebenfalls beide Methylierungsmuster auf, und waren damit vergleichbar zu konventionell erzeugten OSKM-iPS Zellen und zu mES-Zellen (**Abb. 24B**). Die Analyse von Ecad<sup>high</sup> Zellen für die mRNA Level von Genen, die für Faktoren des Polykomb-Repressor Komplexes (PRC) kodieren, ergab ein zu mES-Zellen

## Ergebnisse

vergleichbares Expressionsmuster und spiegelte somit das Ergebnis der Immunfluoreszenz wider. So waren vor allem die Proteine Ezh2, Eed und Suz12, die den Polykomb-Repressor Komplex, PRC2 bilden, und für die Etablierung des Repressionsmotives H3K27me3 essentiell sind, in Ecad<sup>high</sup> und 129/Sv3 Zellen vergleichbar exprimiert. In Ecad<sup>low</sup> Zellen waren die Level dieser Faktoren deutlich niedriger (**Abb. 24C**). Ein sehr ähnliches Expressionsmuster dieser Gene war auch in den ESKM Zellen vertreten, aber nur gering exprimiert in SKM Zellen (**Abb. 24D**). Die Expression der PRC2 Faktoren wird durch den Komplex aus Oct4, Sox2, Nanog und Sall4 reguliert (**Abb. 24E**).



**Abbildung 24: Ecad<sup>high</sup> und ESKM Zellen sind positiv für aktive und repressive Methylierungsmotive.**

(A) Die Präsenz von aktiven, H3K4me3 und repressiven, H3K27me3 Methylierungsmotiven wurde in Ecad<sup>high</sup> und Ecad<sup>low</sup> Zellen im Vergleich zu 129/Sv3 mES-Zellen durch Immunfluoreszenz untersucht, die Vergrößerung beträgt 100x, der Maßstab indiziert 100  $\mu$ m, sowie in (B) ESKM Zellen der Klone (#1 - #3), die Vergrößerung beträgt 400x, der Maßstab indiziert 50  $\mu$ m. Die Detektion der Zellkerne erfolgte mit DAPI, verkleinert dargestellt. (C) und (D) Analyse der Expressionslevel von Faktoren des Polykomb-Protein Komplexes, PRC. Hierin bedeuten: Ezh2 (Enhancer of Zeste homolog 2) eine Histon-Lysin N-Methyltransferase; Eed (embryonic ectoderm development) ein Interaktionspartner von Ezh2; Suz12 (Suppressor of zeste 12 protein homolog) die genaue Funktion ist unbekannt. Die Expressionslevel sind logarithmisch in arbiträren Einheiten dargestellt und wurden bezogen auf die Expression in MEFs. (E) Zusammenhang zwischen den Pluripotenzfaktoren Oct4, Sox2, Nanog, Sall4 und den PRC2 Proteinen.

### 7. Diskussion

Die Expression und die Funktion von E-Cadherin, stabile Adhäsionsverbindungen zu bilden, sind entscheidend während der frühen Embryogenese. Eine Störung der E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion z.B. durch den Verlust des E-Cadherin Gens (Larue et al., 1994), oder eine Störung der Zelladhäsion durch die gezielte Mutation der Calcium-Bindedomänen (Riethmacher et al., 1995) oder aber durch neutralisierende Antikörper (Shirayoshi et al., 1983) resultiert in einer fehlerhaften Entwicklung des Embryos und embryonaler Letalität. Da E-Cadherin bereits in der Oozyte exprimiert wird, ist es das erste Cadherin, das während der Embryonalentwicklung auftritt. Neben N-Cadherin, das erst im Verlauf der Gastrulation gebildet wird, reguliert E-Cadherin in Abhängigkeit der Zeit und der Lokalisierung, die Bildung von Geweben und Organstrukturen die aus der Differenzierung der Zellen der inneren Zellmasse hervorgehen. Die Bildung der inneren Zellmasse, sowie die Erhaltung ihres pluripotenten Potentials, das notwendig ist, um in nahezu jede Zelle des Organismus zu differenzieren, ist abhängig, von der E-Cadherin Expression. Ein Zusammenhang zwischen E-Cadherin und Pluripotenzgenen wie Oct4 und Nanog scheint daher plausibel zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von E-Cadherin in murinen embryonalen Stammzellen und im Prozess der zur Bildung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) führt, untersucht. Um eine eventuelle Korrelation zwischen der E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion und der Regulation der Pluripotenzgene wie Oct4 und Nanog zu identifizieren, wurden murine embryonale Stammzellen der Linie 129/Sv3, die über einen hohen endogenen Level an E-Cadherin verfügen, zunächst in Abwesenheit von LIF für 1d, 3d, 5d und 7d kultiviert wodurch die spontane Differenzierung der Zellen initiiert wurde (**Abb 11A**). Auf der mRNA Ebene konnte eine zeitabhängige Regulation von E-Cadherin (Ecad), N-Cadherin (Ncad), Oct4 und Nanog beobachtet werden im Vergleich zu undifferenzierten Zellen (+LIF Ctl). Während die mRNA Level von Ecad, Oct4 und Nanog nach 5d ein Minimum erreicht hatten, stieg der Ncad Level an und hatte nach 7d ein Maximum erreicht (**Abb. 11B**). Interessanterweise war auch ein Anstieg des E-Cadherin Levels zu beobachten, der vermutlich auf die Differenzierung der ES-Zellen in verschiedene endodermale Derivate zurückzuführen war. Die mRNA Level von Oct4 und Nanog hingegen waren von diesem Effekt nicht betroffen, so dass eine

## Diskussion

---

direkte Regulation dieser Gene durch E-Cadherin ausgeschlossen werden kann. Die Reduktion des E-Cadherin (Ecad) Proteinlevels war bezogen auf den Gesamtlevel nur marginal (**Abb. 11C**). Durch Immunfluoreszenz konnte aber der Verlust der Ecad Expression und die gleichzeitige Hochregulierung der Ncad Expression gut verfolgt werden (**Abb. 11D**). Dieser als „Cadherin-switch“ bezeichnete Übergang von E-Cadherin zu N-Cadherin unterliegt dem Mechanismus des EMT (Yang and Weinberg, 2008) bei dem epithelartige Zellen in mesenchymale Zellen konvertieren. Durch diesen Prozess schließt sich die Expression dieser beiden Cadherine oft gegenseitig aus. In differenzierenden mES-Zellen konnten ebenfalls nur Zellen beobachtet werden, die entweder nur E-Cadherin, oder nur N-Cadherin exprimierten, Zellen die eine Co-Expression zeigten, waren selten. Auch in der Entwicklung von Vertebraten, ist ihre Expression häufig gegensätzlich. Während E-Cadherin vor allem in Zellen, die sich vom Endoderm ableiten, wie Epithelzellen der Leber, der Lunge und des Gastrointestinaltraktes, zu finden ist, wird N-Cadherin vor allem in Zellen des Ekto- und Mesoderms exprimiert. Eine Co-Expression von E- und N-Cadherin ist nur selten zu finden wie z.B. im Epithel der Augenlinse oder in humanen embryonalen Stammzellen (**Abb. 27A**).

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob die gezielte Reduktion des E-Cadherin Expressionslevels eine Herunterregulierung von Oct4 und Nanog sowie der weiteren Pluripotenzmarkern Dppa5 und Nr5a2 induzieren konnte. Dppa5 ist im Zytoplasma lokalisiert und übernimmt eine wichtige aber noch unbekannt Funktion für die Erhaltung des pluripotenten Status von ES-Zellen. Nr5a2 ist ein Kernrezeptor mit unbekanntem Liganden, dessen Überexpression bei Abwesenheit von Oct4 zur effizienten Konvertierung von Fibroblasten zu iPS-Zellen führt (Heng et al., 2010).

Die virale Transduktion von 129/Sv3 Zellen mit einem spezifischen shRNA Expressionsplasmid gegen E-Cadherin, konnte tatsächlich zeigen, dass eine starke Reduktion des E-Cadherin Levels ebenfalls zu einer Reduktion der mRNA Level dieser Pluripotenzgene führte (**Abb. 11E**). Da die transduzierten Zellen unter Anwesenheit von LIF kultiviert wurden, kann ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt, der bereits nach 3d beobachtbar war, abhängig ist von LIF. Die Zellen waren allerdings morphologisch nicht vergleichbar mit Zellen, die unter Abwesenheit von LIF differenzierten. Es ist daher entscheidend, ob der E-Cadherin Level sich während der Differenzierung ändert, aber noch auf einem geringeren Level exprimiert wird, oder aber ob die E-Cadherin Expression rasch sinkt. Unter letzteren Bedingungen

## Diskussion

---

bilden sich nach 3d einzelne, abgerundete Zellen, die aber nicht apoptotisch sind und weiter expandiert werden können (**Abb. 26B**). Etablierte 129/Sv3-shEcad Zellen waren unfähig EBs zu bilden im Vergleich zu den Kontrollzellen (129/Sv3-empty). Durch Immunfluoreszenz und Western Blot Analyse konnte 3d nach der Transduktion von 129/Sv3 Zellen mit dem shEcad Konstrukt eine erhebliche Reduktion des Oct4 und Nanog Levels beobachtet werden (**Abb. 11F und 11G**). Durch die Analyse der Proteinlevel von Proteinextrakten wurde deutlich, dass tatsächlich nicht nur einige Zellen diese reduzierten Proteinlevel an Oct4 und Nanog aufwiesen, sondern der größte Teil ~90 % der Zellen. Die Reduktion des E-Cadherin Levels führte interessanterweise auch zur deutlichen Reduktion des  $\beta$ -Catenin und p120 Catenin Levels (**Abb. 11G und Abb. 12B**) bzw. zum Verlust der Lokalisierung der Proteine an der Membran (**Abb. 26B**). In vielen Tumorzelllinien ist beobachtet worden, dass der Verlust von E-Cadherin zu einer Freisetzung des gebundenen  $\beta$ -Catenins führt, das dann in den Kern translozieren kann (Heuberger and Birchmeier, 2010). Tatsächlich scheint dieser Mechanismus nicht auf mES-Zellen übertragbar zu sein, da eine eindeutige Kernlokalisierung bzw. eine Aktivierung von Wnt-Zielgenen nicht beobachtbar war. Dieser Translokationsmechanismus verläuft vor allem in Zellen, die über einen aktiven Wnt-Signalweg verfügen und so das im Zytoplasma vorliegende  $\beta$ -Catenin nicht phosphoryliert werden kann. Weiterhin konnte für p120 Catenin eine Kernlokalisierung bei Abwesenheit von E-Cadherin gezeigt in einigen Tumorzelllinien gezeigt werden. Die Expression von E-Cadherin resultierte dann in einem Export von p120 Catenin aus dem Kern und einer Rekrutierung an die Membran (van Hengel et al., 1999). Auch dieser Translokationsmechanismus ist so nicht direkt auf den Komplex aus E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin und p120 Catenin in mES-Zellen übertragbar.

Welche Bedeutung E-Cadherin in der induzierten Pluripotenz spielt, konnte in Zellen gezeigt werden, die aus dem Gemisch OSKM-induzierter Fibroblasten über die Expression des Oberflächenmarkers SSEA-1 isoliert wurden (**Abb. 13A und 13B**). SSEA-1 wird vor allem von murinen embryonalen Stammzellen und von embryonalen Karzinomzellen sowie von einigen neuronalen Zellen exprimiert. Ein Vergleich der mRNA Level von E-Cadherin und N-Cadherin, Oct4, Nanog und Dppa5 von etablierten Klonen der SSEA-1<sup>pos</sup> Population mit SSEA-1 negativen Zellen machte einen gravierenden Unterschied beider Populationen deutlich. E-Cadherin, Nanog

## Diskussion

---

und Dppa5 wurden nur von Zellen der SSEA-1<sup>pos</sup> Population auf einem hohen zu 129/Sv3 mES Zellen vergleichbaren Level exprimiert. SSEA-1<sup>neg</sup> Zellen zeigten nur eine marginale Expression von E-Cadherin, aber eine hohe Expression von N-Cadherin. Nanog wurde in diesen Zellen nicht exprimiert, dafür aber konnten hohe mRNA Level der viralen Transkripte von Oct4, So2, Klf4 und c-Myc detektiert werden (**Abb. 13C und 13F**). Eine Korrelation der E-Cadherin/SSEA-1 Expression konnte weiterhin auf Proteinebene gezeigt werden. Etablierte SSEA-1<sup>pos</sup> (Ecad<sup>high</sup>) iPS Klone exprimierten im Vergleich zu SSEA-1<sup>neg</sup> (weiterhin Ecad<sup>low</sup>) E-Cadherin und Oct4 (**Abb. 13D**) bzw. E-Cadherin, SSEA-1 und Nanog (**Abb. 13E**). N-Cadherin war nur in Ecad<sup>low</sup> Zellen detektierbar.

Zusammenfassend kann zunächst für Ecad<sup>high</sup> und Ecad<sup>low</sup> iPS-Zellen geschlossen werden, dass die Ecad<sup>high</sup> Zellen, vollständig reprogrammierte iPS-Zellen darstellen, die den Maturationsprozess bereits durchlaufen haben. Diese Zellen sind bezogen auf die Expression der spezifischen Marker wie E-Cadherin, SSEA-1, Nanog und Dppa5 vergleichbar mit mES-Zellen. Im Gegensatz zu den vollständig reprogrammierten iPS-Zellen, weisen die partiell reprogrammierten Ecad<sup>low</sup> Zellen ein Stadium auf, das vermutlich zwischen dem Fibroblasten-Stadium und den iPS-Zellen liegt. In diesen Zellen konnte die Konvertierung bzw. die Maturation nicht abgeschlossen werden, so dass sie noch eine Expression von Fibroblasten-spezifischen Markern wie N-Cadherin und Vimentin (nicht gezeigt) aufwiesen. Ob diese Zellen eine Zwischenstufe darstellen, oder einfach nur ein Nebenprodukt des Konvertierungsprozesses sind, ist unbekannt. Tatsächlich aber konnten über die Korrelation E-Cadherin/SSEA-1 verschiedene Ecad<sup>low</sup> Linien etabliert werden, die ähnliche Eigenschaften aufwiesen (nicht gezeigt).

Durch Studien, in denen somatische Zellen verwendet wurden, die bereits einen hohen endogenen E-Cadherin Level aufwiesen, konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin eine entscheidende Rolle für die Reprogrammierung zu spielen scheint. In diesen Zellen, die bereits über einen epitheliären Charakter verfügen, scheint das bereits vorhandene E-Cadherin Netzwerk mit den assoziierten Signalwegen die Konvertierung zu iPS-Zellen zu forcieren. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Effizienz der OSKM-induzierten Reprogrammierung von humanen Keratinozyten im Vergleich zu humanen Fibroblasten 100fach größer und doppelt so schnell ist (Aasen

## Diskussion

---

et al., 2008). Murine Hepatozyten, die ebenfalls über einen hohen E-Cadherin Level verfügen, zeigen allerdings eine deutlich niedrigere Effizienz, sie liegt nur bei 0,0006 % (Lowry and Plath, 2008). Diese geringe Effizienz ist aber höchstwahrscheinlich auf die sehr niedrige Proliferation von kultivierten Hepatozyten zurückzuführen. Für eine effiziente Retrovirale Transduktion werden aber proliferierende Zellen benötigt. Trotz dieser Diskrepanz, konnten im Rahmen dieser Arbeit Hepatozyten-iPS Zellen (Hep-iPS) etabliert werden. Ausgehend von  $2 \times 10^5$  induzierten Zellen (**Abb. 14A**) wurden nur zwei Kolonien erhalten, die morphologisch nicht zu unterscheiden waren mit mES-Zellen und iPS-Klonen, die aus der Konvertierung von murinen Fibroblasten entweder konventionell mit OSKM oder ESKM erhalten wurden (**Abb. 14B**). Die Zellen eines Hep-iPS Klons (Klon #1) wurden charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass die Hep-iPS Zellen alle charakteristischen Marker wie E-Cadherin, SSEA-1, Nanog und Oct4 exprimierten (**Abb. 14C**) und außerdem auch die Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K27me3 besaßen. Sie waren daher auch auf der Markerebene völlig identisch zu OSKM- und ESKM-abgeleiteten iPS-Zellen sowie ES-Zellen (**Abb. 14D**). Auf der mRNA Ebene konnte die Expression dieser Marker verifiziert und außerdem gezeigt werden, dass die Hepatozyten-spezifischen Marker nicht detektierbar waren in den etablierten Hep-iPS Zellen (**Abb. 14E**).

Dieses Experiment machte deutlich, dass E-Cadherin einen maßgeblichen Einfluss auf die Generierung von iPS-Zellen hat. Die Reprogrammierung der Hepatozyten führte zwar nur zu zwei Klonen, aber aus diesen Klonen wurde keine „Nebenprodukte“, d.h. amorph geformte Kolonien gebildet, die normalerweise immer mit auftreten und die sowohl vollständig reprogrammierte iPS-Zellen, als auch partiell reprogrammierte Zellen enthalten. Wie bereits gezeigt wurde, markiert die Co-Expression von E-Cadherin und SSEA-1 die Population der vollständig reprogrammierten und daher pluripotenten iPS Zellen. Eine Analyse der Co-Expressionen von E-Cadherin und SSEA-1 in OSKM-Kolonien konnte mittels Immunfluoreszenz zeigen, dass neben doppelt positiven Zellen als solche vorlagen, die entweder nur E-Cadherin bzw. nur SSEA-1 exprimierten (**Abb. 15A**). Durchflusszytometrisch konnten über die Markierung mit Antikörpern gegen E-Cadherin und SSEA-1 dieses Ergebnis bestätigt werden. Dabei wurde offensichtlich, dass die Menge an E-Cadherin positiven Zellen nicht mit der Menge an SSEA-1 positiven Zellen in einem Gemisch von OSKM-induzierten Fibroblasten korreliert war.

## Diskussion

---

Zwar war die Menge beider Populationen beinahe identisch, die Anzahl der doppelt markierten Zellen war aber gering (**Abb. 15B**). Allerdings unterliegen diese prozentualen Anteile zum Teil relativ großen Schwankungen, in Abhängigkeit des jeweiligen Experiments. Eine gute Korrelation beider Marker konnte hingegen in 129/Sv3 Zellen gefunden werden, die fast alle doppelt positiv waren für E-Cadherin und SSEA-1. Die Identifikation vollständig reprogrammierter Zellen durch die Co-Expression dieser beiden Marker scheint daher geeignet zu sein. Allerdings ist nicht nur die Co-Expression, sondern auch die Intensität bzw. die Anzahl der Markermoleküle auf der Zelloberfläche entscheidend. In den ES-Zellen sind beide Marker mit annähernd gleicher Intensität exprimiert, berücksichtigt man diese Tatsache, so wird deutlich, dass die Menge der vollständig reprogrammierten Zellen in der analysierten Population viel geringer ist. Der überwiegende Anteil der Zellen, der während der Reprogrammierung gebildet wird, beinhaltet daher Zellen, die entweder nicht oder partiell reprogrammiert sind. So ist zu erklären, dass in der SSEA-1pos Population dennoch Zellen beobachtet werden konnte, die nicht die typische Morphologie von ES-Zellen aufwiesen.

Der pluripotente Status von ES- und ES-ähnlichen Zellen kann über, die Bestimmung des Differenzierungspotentials ermittelt werden. In aufsteigender Priorität sind dies erstens die spontane Differenzierung der Zellen unter differenzierenden Bedingungen. Hierbei werden verschiedene Zelltypen gebildet, aber nicht alle Vertreter der drei Keimblätter. Zweitens die Differenzierung über die Bildung von Embryoid Bodies, dreidimensionale Sphären, in denen Derivate aller drei Keimblätter gebildet werden können. Werden diese Sphären erneut plattiert, können neuronale, endodermale und mesodermale Strukturen, über die Expression der entsprechenden Marker identifiziert werden. Drittens die in vivo Differenzierung von pluripotenten Zellen erfolgt über die Teratomformation. Die Fähigkeit Teratome zu bilden gibt einen starken Hinweis, ob es sich bei den analysierten Zellen um pluripotente Zellen handelt. Die in vivo Differenzierung bildet Derivate aller drei Keimblätter, die auch histologisch den unter nativen Bedingungen entstandenen Geweben entsprechen. Die beiden letzten und entscheidenden Kriterien zur Beurteilung des pluripotenten Status von Zellen sind die Bildung von Chimären (F1-Tiere) sowie die Entwicklung von Zellen der Keimbahn und die damit verbundene Entwicklung der F2-Generation.

## Diskussion

---

Tatsächlich sind viele iPS-Linien, obwohl sie in der Lage waren Teratome zu bilden, nicht fähig in die Blastozyste zu integrieren (Smith et al., 2009).

Zur Beurteilung der in dieser Arbeit generierten iPS-Linien wurden verschiedene Differenzierungsexperimente durchgeführt. In der spontanen und der Embryoid Body vermittelten Differenzierung wurde deutlich, dass die Ecad<sup>high</sup> Zellen ein zu mES Zellen vergleichbares Potential zeigten, im Gegensatz zu Ecad<sup>low</sup> Zellen (**Abb. 16A**). Die Analyse der Proteinlevel von E-Cadherin, N-Cadherin, phospho-(Ser33/37/Thr41) $\beta$ -Catenin,  $\beta$ -Catenin, SSEA-1 und Oct4 in Ecad<sup>high</sup>, Ecad<sup>low</sup> und 129/Sv3 Zellen in An- und Abwesenheit von LIF ergab folgendes. Zunächst wurde deutlich, dass Ecad<sup>high</sup> und 129/Sv3 Zellen gleiche Level dieser Proteine exprimierten und eine gleiche Regulation dieser Marker zeigten. Ecad<sup>low</sup> Zellen hingegen zeigten neben einer marginalen Expression von E-Cadherin und SSEA-1 auch einen sehr geringen Level an  $\beta$ -Catenin. Außerdem war der Level an phospho- $\beta$ -Catenin in den Ecad<sup>high</sup> und mES-Zellen niedrig, entsprach aber in Ecad<sup>low</sup> Zellen dem Level an  $\beta$ -Catenin, was darauf hin deutet, dass der  $\beta$ -Catenin Level in diesen Zellen auf Proteinebene stark herunter reguliert ist (**Abb. 16B**). Die Korrelation zwischen der niedrigen E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin Expression in diesen Zellen spiegelt die unter Abb. 11 und 12 beobachtete Reduktion des  $\beta$ -Catenin Levels in shEcad behandelten mES-Zellen wider. Eine unterschiedliche Regulation der Differenzierungsmarker N-Cadherin und Msx2 konnte auf mRNA Ebene beobachtet werden. Die spontane Differenzierung der stark E-Cadherin exprimierenden Zellen (Ecad<sup>high</sup> und 129/Sv3) zeigte nach 4d eine deutliche Expression der Differenzierungsmarker, während sich der hohe N-Cadherin Level der Ecad<sup>low</sup> Zellen nicht änderte und keine Expression von Msx2 bei LIF Abwesenheit detektierbar war (**Abb. 16C – D**).

Des Weiteren konnte durch in vivo Differenzierung gezeigt werden, dass Ecad<sup>high</sup> und 129/Sv3 Zellen 21d nach der subkutanen Injektion in NOD/SCID Mäuse, gut differenzierte Teratome bildeten. Die Tumore der Ecad<sup>low</sup> Zellen waren, obwohl in diese Zellen noch hohe Level an viralen Transkripten der Onkogene c-Myc und Klf4 exprimiert wurden, deutlich kleiner und wiesen kein eindeutiges Differenzierungsmuster auf (**Abb. 17A-C**). Möglicherweise werden die viralen Transkripte während der Tumorbildung deaktiviert und nicht wieder reaktiviert, wie es häufig bei chimären Embryonen beobachtet wurde. Auf mRNA Ebene konnte in Biopsie-Proben von Tumoren der Ecad<sup>high</sup> und 129/Sv3 Zellen ein typisches Muster

## Diskussion

---

von Markern für Derivate von Endoderm, Ektoderm und Mesoderm nachgewiesen werden. Außerdem konnte der histologisch undifferenzierte Phänotyp der Ecad<sup>low</sup> Tumore auf der mRNA Ebene bestätigt werden, in den Tumoren konnte keine Regulation der analysierten Marker beobachtet werden (**Abb. 17D-E**). Interessanterweise führte die Tumorbildung zu einer Reduktion des viralen Oct4 Levels in den Ecad<sup>low</sup> Tumoren, so dass ein gewisser Grad an Differenzierung erfolgt sein muss (**Abb. 17D**). Die erzeugten Tumore sind zusammengefasst dargestellt im Anhang.

Die deutlich reduzierte Größe der durch Ecad<sup>low</sup> Zellen induzierten Tumore kann sowohl auf das geringe Differenzierungspotential als auch auf eine geringere Proliferation und/ oder erhöhte Apoptoserate zurück geführt werden. Die Proliferation von Ecad<sup>high</sup> und Ecad<sup>low</sup> Zellen wurde über phospho(Ser10)-Histon H3 (pHH3) ermittelt, ein Phosphorylierungsmotiv, das kondensiertes Chromatin in prä-mitotischen Zellen markiert. Apoptotische Zellen wurden über die gespaltene, aktive Form von Caspase-3 bestimmt (**Abb. 17F-G**). Caspase-3 ist eine Effektor-Caspase und wird durch die Initiator-Caspasen 8 und 10 während der Apoptose-Kaskade aktiviert.

Tatsächlich war die Proliferation der Ecad<sup>low</sup> Zellen um 44% geringer, als die der Ecad<sup>high</sup> Zellen. Zudem konnten auf den Kolonien der Ecad<sup>low</sup> Zellen apoptotische Zellen detektiert werden, die allerdings nur bei hoher Konfluenz auftraten (**Abb.17G**). Ein Vergleich der pHH3 positiven Zellen in den von Ecad<sup>high</sup> und Ecad<sup>low</sup> Zellen erzeugten Tumoren, ergab allerdings eine größere Anzahl proliferierender Zellen in Ecad<sup>low</sup>-Tumoren, als in Ecad<sup>high</sup>-Tumoren, allerdings waren in den Ecad<sup>low</sup>-Tumoren auch deutlich mehr Areale mit apoptotischen Zellen zu detektieren, als in den durch Ecad<sup>high</sup>-Tumoren (**Abb. 17H**). Die Zellen in Ecad<sup>high</sup> Tumoren zeigen vermutlich aufgrund ihres Differenzierungsgrads eine reduzierte Proliferation. Ecad<sup>low</sup>-Tumore enthielten vor allem undifferenzierte Zellen, die wahrscheinlich durch die noch vorhandene virale Expression von c-Myc stärker proliferierten. Die erhöhte Apoptoserate spiegelt vermutlich einerseits die bereits unter Zellkulturbedingungen beobachtete erhöhte Zelldichte wieder und zum anderen, die erhöhte Proliferationsrate der Zellen in den Tumoren. Bereiche apoptotischer Zellen sind in Teratomen bzw. Tumoren allerdings häufig detektierbar aufgrund von Hypoxie.

## Diskussion

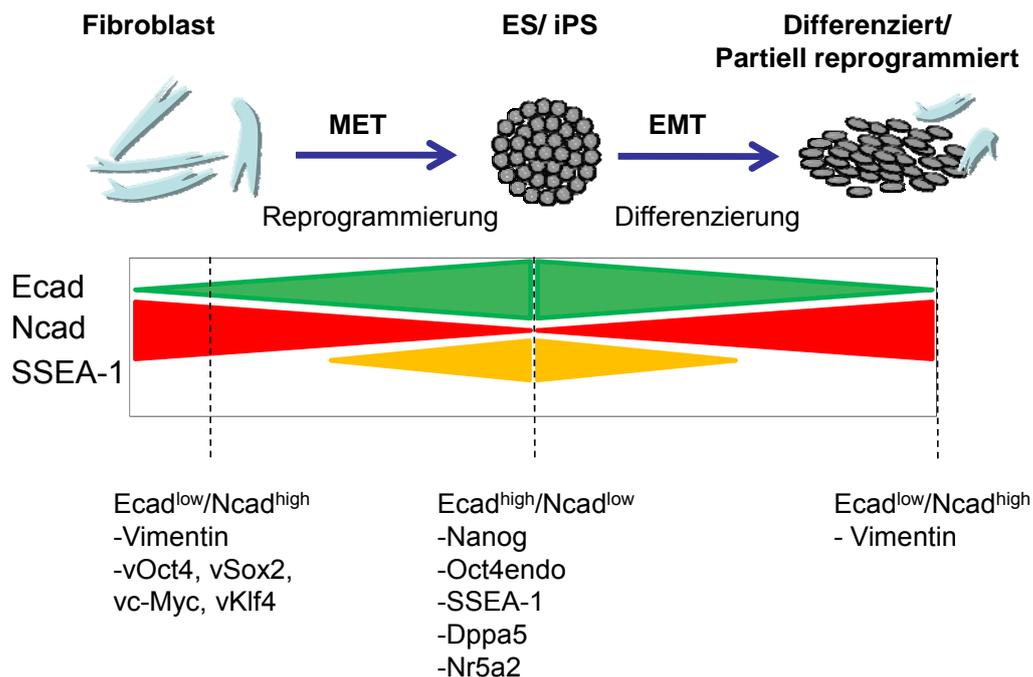
---

Das Entwicklungspotential von Ecad<sup>high</sup> und Ecad<sup>low</sup> Zellen wurde durch die Injektion in Blastozysten analysiert. Die zuvor stabil mit einem GFP-exprimierenden Virus transduzierten Zellen, wurden zu unterschiedlichen Zellzahlen zwischen 10 – 12 Zellen injiziert. Da bereits durch die Teratombildung gezeigt werden konnte, dass Ecad<sup>high</sup> und Ecad<sup>low</sup> Zellen sich stark in ihrem Potential zu differenzieren unterscheiden, war es sehr wahrscheinlich, dass sich dieses Ergebnis auch in der Bildung von Chimären nach der Injektion in Blastozysten widerspiegelt. Und tatsächlich konnte ein gewisser Grad an Chimärismus nur in Jungtieren nachgewiesen werden, die sich aus den Ecad<sup>high-GFP</sup> Zellen ableiteten (**Abb. 18**). Worin die dennoch geringe Bildung von chimären Tieren bzw. die geringe Anzahl GFP positiver Areale begründet ist, ist nicht bekannt. Die injizierten Ecad<sup>high-GFP</sup> Zellen zeigten eine hohe Vitalität und einen undifferenzierten Phänotyp, wie durch die Expression von SSEA-1 und E-Cadherin gezeigt werden konnte (**Abb. 18A und 18C**). Möglicherweise wurde die GFP-Expression in den injizierten Zellen im Verlauf der Entwicklung deaktiviert, ein Chimärismus wäre aber auch durch eine veränderte Fellfarbe ersichtlich gewesen.

Zusammenfassend zeigen diese Daten zunächst, dass die Expression von E-Cadherin nicht nur für die Erhaltung der Integrität und des pluripotenten Phänotyps von ES-Zellen essentiell ist, sondern auch während der Reprogrammierung notwendig und entscheidend ist für die Bildung stabiler iPS-Zellen. Die Expression von E-Cadherin erfolgt früh während der Initiationsphase der Reprogrammierung und verläuft über den Mechanismus des MET (Li et al., 2010). Während dieses Prozesses treten stabile Zwischenstufen auf, wie durch die unabhängige Isolierung und Etablierung von drei SSEA-1<sup>neg</sup> Linien beobachtet werden konnte. Eine dieser Linien wurde in der vorliegenden Arbeit intensiver charakterisiert und konnte als partiell reprogrammierte iPS Zellen durch das Expressionsmuster Ecad<sup>low</sup>/SSEA-1<sup>neg</sup>/Ncad<sup>pos</sup> beschrieben werden. Der zugrunde liegende Mechanismus, der diese partiellen iPS-Zellen in vollständig konvertierte iPS Zellen überführt, ist noch nicht bekannt. Entscheidend scheint die Initiation des MET und der damit verbundenen Expression von E-Cadherin sowie der Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin zu sein. Obwohl diese partiellen iPS Zellen alle vier Faktoren exprimieren, sind die nicht in der Lage, im Reprogrammierungsprozess fortzufahren. Das in (**Abb. 25**) dargestellte Schema skizziert die Regulationen der Cadherine, die während der Reprogrammierung

## Diskussion

erfolgen. Während die Expression von E-Cadherin im Verlauf dieses Prozesses steigt und vermutlich maximal in der stabilen iPS Zelle bzw. ES-Zelle exprimiert wird, fällt der Expressionslevel mit beginnender Differenzierung wieder ab. Die Expression von N-Cadherin verläuft genau gegensätzlich. Fibroblasten besitzen einen hohen Level an N-Cadherin, der im Verlauf der Konvertierung fällt und minimal in den stabilen iPS- bzw. ES-Zellen ist, aber während der Differenzierung wieder steigt. Unterschieden werden können in diesem Schema die partiell reprogrammierten SSEA-1<sup>neg</sup> iPS-Zellen, charakterisiert durch die Expression Ecad<sup>low</sup>/Ncad<sup>high</sup> von den vollständig reprogrammierten Ecad<sup>high</sup>/Ncad<sup>low</sup> iPS-Zellen, die alle Eigenschaften von ES-Zellen besitzen. Die Differenzierung der Ecad<sup>high</sup>/Ncad<sup>low</sup> iPS-Zellen bzw. der ES-Zellen führt dann wiederum zum Expressionsmuster Ecad<sup>low</sup>/Ncad<sup>high</sup>. Der  $\beta$ -Catenin Level ist in diesem Modell nicht berücksichtigt, es wurde aber deutlich, dass der Proteinlevel von  $\beta$ -Catenin in iPS- und ES-Zellen höher ist, als in Fibroblasten (Li et al., 2010).



**Abbildung 25: Modell zur Cadherin Expression während der iPS-Induktion und der Differenzierung.**

Dargestellt sind im oberen Verlauf die Fibroblasten als Ausgangsstadium der iPS-Induktion, die über einen MET-abhängigen Reprogrammierungsprozess zu iPS-Zellen konvertieren. Die E-Cadherin (Ecad, grün) Expression wird in den Fibroblasten während des MET induziert und erreicht in den ES- bzw. iPS-Zellen ein Maximum. Die Expression von N-Cadherin (Ncad, rot) hingegen nimmt im Verlauf der Reprogrammierung ab und erreicht in den ES- und iPS-Zellen ein Minimum. SSEA-1 wird erst später exprimiert und ist maximal in den pluripotenten Zellen. Differenzierte und partiell reprogrammierte Zellen weisen, ähnliche Marker auf.

## Diskussion

---

Die Etablierung des Komplexes aus E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin scheint den Reprogrammierungsprozess entscheidend zu regulieren. Sowohl die Reduktion des  $\beta$ -Catenin Proteinlevels, als auch die verhinderte E-Cadherin Expression führten zu einer Reduktion der Anzahl AP-positiver Kolonien bzw. zur Bildung von amorph geformten, lose aggregierten Zellklumpen (**Abb. 19D**). Die Expressionslevel von Pluripotenzgenen wie Nanog und Nr5a2 waren in diesen amorphen Kolonien deutlich niedriger, als in den Wildtyp MEFs. Auch hier konnte eine Korrelation zwischen der E-Cadherin und der  $\beta$ -Catenin Expression beobachtet werden. Eine Reduktion des  $\beta$ -Catenin Levels resultierte in einer verminderten Expression von E-Cadherin und Zellen, in denen die Expression von E-Cadherin gestört war, wiesen einen niedrigen Level an  $\beta$ -Catenin auf (**Abb. 19F**). Die Korrelation beider Proteine war bereits in 129/Sv3 Zellen zu beobachten, wenn der E-Cadherin Level durch ein shRNA Konstrukt reduziert wurde und lässt sich damit erklären, dass E-Cadherin das an der Membran lokalisiert ist,  $\beta$ -Catenin rekrutiert und damit vor dem proteasomalen Abbau schützen kann. Wird E-Cadherin in ES-Zellen herunter reguliert, so transloziert  $\beta$ -Catenin nicht in den Kern, sondern wird über den Degradationskomplex für den Abbau markiert. In gleicher Weise stabilisiert  $\beta$ -Catenin die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin und begünstigt eine bestimmte Konformation und damit die Stabilität des Proteins an der Membran. Interessanterweise konnte die Überexpression von E-Cadherin alleine nicht zu einer Erhöhung der Reprogrammierungseffizienz führen. In einem Substitutions-experiment, in dem die Faktoren OSKM unterschiedlich kombiniert und jeder Faktor einmal gegen E-Cadherin ausgetauscht wurde, konnte deutlich gezeigt werden, dass E-Cadherin als zusätzlicher Faktor oder Substituent die Menge an SSEA-1- bzw. AP-positiven Zellen nicht deutlich erhöhen konnte (**Abb. 20A und 20B**). Dieses Ergebnis steht damit in einem Widerspruch zu einer bereits publizierten Studie. Diese zeigte eine deutliche Erhöhung Oct4-positiver Zellen, wenn E-Cadherin während der Reprogrammierung von Oct4-GFP Reporter-Fibroblasten überexprimiert wurde (Chen et al., 2010). Diese Diskrepanz konnte zum einen durch die Verwendung anderer Fibroblasten hervorgerufen worden sein, aber auch durch experimentelle Varianzen. So erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Quantifizierung nicht über Oct4-GFP, sondern über die Auszählung der Kolonien. Die Überexpression von E-Cadherin auf transkriptioneller Ebene muss nicht bedeuten, dass dieses Protein auch

## Diskussion

---

in gleichem Maße auf der Oberfläche der Fibroblasten stabil exprimiert wird. Vor allem die Aktivität von Proteasen wie die MMPs oder zur ADAM Familie gehörenden führen zu einer Spaltung der extrazellulären Domäne von E-Cadherin. Tatsächlich konnte auf Proteinebene eine effiziente Expression von E-Cadherin in transduzierten Fibroblasten nachgewiesen werden, diese wurde aber nicht zeitabhängig verfolgt, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass E-Cadherin entweder auf der Protein- oder der transkriptionellen Ebene wieder herunter reguliert wurde.

Da Fibroblasten über einen hohen N-Cadherin Level verfügen und eine damit zusammenhängende Aktivierung unterschiedlicher Signalwege, wie z.B. des FGF-Rezeptor1/FGF2 Signalwegs (Suyama et al., 2002), reicht die Überexpression von E-Cadherin alleine vermutlich nicht aus, um eine starke Erhöhung der Reprogrammierungseffizienz zu erzielen. Die Bindung von FGF2 an den FGF-Rezeptor aktiviert neben dem PI3-Kinase Signalweg auch die Ras-MEK-ERK Kaskade, die auch wiederum zu einer Aktivierung des E-Cadherin Repressors Snail2 führen kann. Ein weiterer entscheidender Signalweg, für den sowohl in Tumorzellen (Vogelmann et al., 2005), als auch kürzlich während der iPS-Induktion (Li et al., 2010) eine inhibitorische Funktion gezeigt werden konnte, ist der TGF $\beta$ -Signalweg. Vor allem seneszente Fibroblasten, die während der Reprogrammierung auftreten bzw. in der Population der Ausgangsfibroblasten residieren, sezernieren TGF $\beta$  (Kortlever and Bernards, 2006). Der durch die Sezernierung der Liganden aktivierte Signalweg führt dann ebenfalls zu einer Inhibition der E-Cadherin Expression in einem Smad-unabhängigen Signalweg über die Aktivierung von ERK1/2 und wiederum zur Expression von Snail2. Der Gegenspieler des TGF $\beta$ -Signalweges ist der BMP-Signalweg, beide konkurrieren um die Bindung des Co-Smads (Smad4), so dass die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges auch zu einer Inhibition des BMP-Signalweges führt, der für die Etablierung von iPS-Zellen (Woltjen and Stanford, 2009) und für die Erhaltung des undifferenzierten Phänotyps muriner ES-Zellen notwendig ist.

Neben der Inhibition der E-Cadherin Expression durch in den Fibroblasten vorliegende Signalwege, kann die Überexpression von E-Cadherin selber dazu führen, dass die Reprogrammierung blockiert wird. Die Überexpression von E-Cadherin in Fibroblasten führt zu einer Rekrutierung von  $\beta$ -Catenin aus dem zytoplasmatischen Pool, so dass der Level des im Zytoplasma residierenden

## Diskussion

---

$\beta$ -Catenins reduziert und so möglicherweise der Wnt-Signalweg inhibiert wird. Ein solcher Mechanismus ist für die Kolonkarzinomzelllinie SW480 gezeigt worden. Die Überexpression von E-Cadherin in diesen Zellen resultierte in einem reduzierten Wachstum der Zellen die korreliert war mit einer Inhibition der  $\beta$ -Catenin/TCF Aktivierung (Gottardi et al., 2001) Eine zusätzliche Aktivierung des Wnt-Signalweges bzw. die Inhibition der GSK3 durch einen spezifischen Inhibitor, wie z.B. CHIR98014, könnte daher zu einer Erhöhung der Konvertierungseffizienz führen.

Obwohl nun die Überexpression von E-Cadherin während der OSKM induzierten Reprogrammierung nur einen marginalen Effekt hatte, konnten erstaunlicherweise in Abwesenheit von exogenem Oct4, stabile iPS Klone erhalten werden. Dies ist deswegen überraschend, weil Oct4 bisher nur durch einen anderen Transkriptionsfaktor (Nr5a2) substituiert werden konnte und der Ersatz eines Transkriptionsfaktors durch ein Zelladhäsionsmolekül nicht erwartungsgemäß erscheint.

Diese als ESKM Klone bezeichneten iPS-Kolonien wurden nach 14d – 21d Inkubation der induzierten Zellen bei Anwesenheit von LIF auf Matrigel als extrazelluläre Matrix reproduzierbar generiert. Die Primärklone bzw. die daraus erhaltenen Subklone besaßen offensichtlich bereits vollständig reprogrammierte iPS-Zellen, da eine weitere Subklonierung bzw. eine Anreicherung durch FACS der erhaltenen Klone nicht notwendig war. Die erhaltenen Subklone zeigten eine hohe Aktivität von alkalischer Phosphatase und waren morphologisch nicht unterscheidbar zu ES-Zellen (**Abb. 21A und 21 B**). Die Etablierung von ESKM-Klonen aus drei unabhängigen Experimenten zeigte, dass die ESKM-induzierte Konvertierung in einem sehr langsamen Prozess verläuft, der im Mitteln nur wenige ESKM-Kolonien hervorbringt im Gegensatz zur Reprogrammierung bei Anwesenheit von ektopisch exprimiertem Oct4. Die ESKM Klone konnten stabil propagiert werden und zeigten die Expression von endogenem E-Cadherin, Oct4, Nanog, Dppa5 und Nr5a2 sowie Fbx15 (nicht gezeigt) auf mRNA Expressionslevel (**Abb. 21D**) und Proteinlevel (E-Cadherin, Oct4, Nanog, SSEA-1, **Abb. 21E**). Zellen der ESKM Klone zeigten eine zu ES-Zellen vergleichbare Co-Expression von SSEA-1 und E-Cadherin (**Abb. 22A**), sowie eine zu Zellen eines konventionellen OSKM-Klons vergleichbare Expression von Sox2, Klf4 und c-Myc (**Abb. 22B-D**). Des Weiteren zeigten die ESKM Klone eine effiziente Deaktivierung der Transgene (**Abb. 22E**). Wurden MEFs nur mit den drei Faktoren SKM induziert, konnten zwar Kolonie-ähnliche Zellansammlungen

## Diskussion

---

identifiziert werden, diese konnten aber nicht zu stabilen iPS-Klonen expandiert werden. Im Vergleich zu ESKM- und ES-Zellen waren diese Zellen vergleichbar mit Ecad<sup>low</sup> Zellen, so waren noch virale Transkripte von Sox2, Klf4 und c-Myc auf hohem Level exprimiert. Außerdem hatten diese Zellen den MET-Prozess nicht durchlaufen, so dass sie noch eine hohe Expression von N-Cadherin zeigten (**Abb. 22**). Da SKM Zellen negativ für E-Cadherin waren, konnten zwei wichtige Schlüsse gezogen werden: Erstens, E-Cadherin ist notwendig für die Etablierung von iPS-Kolonien in Abwesenheit von Oct4 und zweitens, Oct4 ist in der OSKM Kombination essentiell für den MET-Prozess und der damit verbundenen Expression von E-Cadherin.

Die weitere Charakterisierung der ESKM-Klone auf Proliferation sowie das in vivo und in vitro Differenzierungspotential zeigte, dass die ESKM Klone vergleichbar waren mit OSKM Klonen und mES-Zellen. ESKM Zellen zeigten untereinander und im Vergleich zu Ecad<sup>high</sup> Zellen eine vergleichbare Menge an pHH3 positiven Zellen, im Gegensatz zu SKM Zellen (**Abb. 23A**). In vitro Differenzierungen über Embryoid-Body Formation sowie die damit verbundene Charakterisierung der daraus resultierenden Zelltypen zeigte deutlich das hohe Differenzierungspotential der ESKM-Zellen im Gegensatz zu SKM-Zellen (**Abb. 23A und 23B**). Das in vivo Differenzierungspotential wurde über die Bildung von Teratomen ermittelt. Die Injektion von  $1 \times 10^6$  Zellen der ESKM-Klone #2 und #3, sowie SKM-Zellen ergab nach 25 Tagen Wachstum und anschließender Charakterisierung der Tumore einen deutlichen Unterschied zwischen ESKM- und SKM-Zellen. Während ESKM-Zellen große, gut differenzierte Tumore bildeten, konnte durch SKM-Zellen nur die Bildung sehr kleiner Gewebeknoten beobachtet werden, die vermutlich aus Binde- und Fettgewebe bestanden (**Abb. 23C und 23D**). Die Analyse der Markerexpression der ESKM-Tumore bestätigte auf mRNA Ebene noch einmal das Auftreten von Geweben, die Derivaten aller drei Keimblätter entsprachen (**Abb. 23E**). Die SKM-Gewebeknoten waren zu klein um sowohl Biopsie-Proben für eine histologische Charakterisierung, als auch für eine Expressionsanalyse zu entnehmen, daher erfolgte nur eine histologische Charakterisierung. Diese war aber ausreichend um den Differenzierungsgrad der Gewebeknoten zu bestimmen.

In einer vergleichenden Analyse der ESKM- und OSKM-abgeleiteten iPS-Zellen mit mES-Zellen auf die Anwesenheit von Motiven, die entweder aktives (H3K4me3) oder

## Diskussion

---

inaktives (H3K27me3) Chromatin markieren ergab, dass alle vollständig reprogrammierten iPS Zellen ebenso wie mES-Zellen die Anwesenheit von beiden Methylierungsmotiven zeigten. Ecad<sup>low</sup> Zellen hingegen wiesen zwar das H3K27me3 Motiv auf, waren aber negativ für das Motiv H3K4me3 (**Abb. 24A-B**). Ob die Abwesenheit dieses Motivs zusammenhängt mit der Aktivierung des E-Cadherin und Nanog Promotors, ist nicht bekannt.

Der für die Generierung von ESKM-iPS zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht geklärt und mögliche Mechanismen, die im Folgenden dargestellt werden sind rein spekulativ. Plausibel wäre einfach die Tatsache, dass die Überexpression von E-Cadherin zur Ausbildung von dichten Zellaggregaten führt, bzw. in einem Prozess der Zellsortierung die Zellen adhären, die E-Cadherin auf der Oberfläche exprimieren. Die E-Cadherin vermittelte Adhäsion ist drei bis vierfach stärker, als die N-Cadherin vermittelte, so dass sich E-Cadherin exprimierende Zellen bevorzugt in einem Zellverband zusammen finden (Stemmler, 2008). So konnte gezeigt werden, dass L-Fibroblasten, die nur eine sehr geringe Cadherin Expression zeigen, durch die Überexpression von E-Cadherin mit Lungenepithelzellen aggregieren konnten (Nose et al., 1988). Der Zusammenhang zwischen E-Cadherin und Oct4 Expression bleibt damit weiterhin unklar. Es ist möglicherweise das Zusammenspiel zwischen E-Cadherin vermittelter Zelladhäsion und einer Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges, der letztendlich die Expression von Oct4 mit entscheidet. Für die Erhaltung des undifferenzierten Status von ES-Zellen ist  $\beta$ -Catenin nicht essentiell, aber für die Differenzierung. Ein Zusammenhang zwischen  $\beta$ -Catenin und Oct4 konnte erst kürzlich gezeigt werden über den Kernrezeptor Nr5a2 (Lrh-1) (Wagner et al., 2010), für den schon gezeigt werden konnte, dass er die Expression von Oct4 direkt regulieren kann (Heng et al., 2010) Die Aktivierung des Wnt-Signalweges während der ersten Phase und evtl. auch während späterer Phasen der iPS-Generierung scheint entscheidend zu sein, wie in zahlreichen Veröffentlichungen gezeigt werden konnte. So konnte gezeigt werden, dass Wnt3a die Reprogrammierung von OSK induzierten Fibroblasten (Marson et al., 2008). Weiterhin konnte die Kombination des GSK-3 Inhibitors CHIR99021 mit dem MEK Inhibitor PD0325901 die Konvertierung neuronaler Stammzellen (NSC), die nur mit OK transduziert wurden, forcieren (Silva et al., 2008). Die Aktivierung des Wnt-Signalweges kann aber auch antagonistisch auf den pluripotenten Zustand wirken.

## Diskussion

---

TCF-3, ein Transkriptionsfaktor, der unterhalb des Wnt-Signalweges ist, und der als Repressor an den Oct4 Promotor binden kann (Tam et al., 2008). TCF-3 scheint eine außerdem eine Komponente des TF-Komplexes zu sein und zusammen mit Oct4 und Nanog verschiedene Promotoren zu binden (Cole et al., 2008).

Grundsätzlich ist die Aktivierung von Signalwegen, die von einer E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion ausgehen, vielfältig und die hauptsächlichen Funktionen von E-Cadherin sind die Bildung von stabilen Zellaggregaten sowie der Verbindung der extrazellulären Domäne mit dem Aktinzytoskelett. Zelluläre Prozesse wie die Migration und Motilität sowie Morphogenese von Zellen werden so reguliert.

Diese Prozesse sind aber nicht alleine abhängig von der Konnektivität der zytoplasmatischen Domäne des E-Cadherin Moleküls zum Aktinskelett, sondern die Ausbildung von E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakten führt auch zur Aktivierung von monomeren-GTPasen wie Cdc42, Rac1 und zur gleichzeitigen Inhibition von Rho, einer weiteren GTPase (Wheelock and Johnson, 2003). GTPasen wechseln zwischen der Lokalisierung im Zytoplasma und an der Membran, sie liegen in zwei Zuständen vor, dem aktiven GTP gebundenen Zustand und dem inaktiven Zustand, der GDP bindet. Der Austausch von GTP und GDP wird vor allem durch Guanin-nukleotid-austauschfaktoren (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) katalysiert. Obwohl der genaue Zusammenhang zwischen E-Cadherin vermittelter Zelladhäsion und der Aktivierung von GTPasen und die daraus resultierenden Konsequenzen noch nicht im Einzelnen verstanden sind, konnten übergeordnete Signalwege identifiziert werden. Die Rekrutierung von E-Cadherin an die Membran und die Etablierung von Adhäsionskontakten, führt zur Rekrutierung von Rac1-GDP an diese Kontaktstellen. Vermittelt scheint dieser Vorgang durch die Aktivierung der PI3-Kinase und der folgenden Überführung von Rac1-GDP in die aktive Form, Rac1-GTP (Watanabe et al., 2009). In einem weiteren Mechanismus erfolgt die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 über p120 Catenin, dass juxtamembran-ständig an E-Cadherin bindet und außerdem an der Regulierung der Oberflächenexpression von E-Cadherin durch die Okkupierung eines Src-kinase Phosphorylierungsmotivs (Fujita et al., 2002).

Die Funktion von E-Cadherin im Prozess der Reprogrammierung und der damit verbundenen Etablierung eines Transkriptionsfaktorkomplexes, der notwendig ist um

## Diskussion

---

einen pluripotenten Zustand zu erreichen ist noch völlig unklar. E-Cadherin begünstigt das Erreichen dieses Zustands und seine Erhaltung, sowohl in iPS-Zellen, als auch in ES-Zellen. In mehreren, aktuellen Veröffentlichungen konnte bereits gezeigt werden, dass E-Cadherin z.B. entscheidend ist für den Übergang von Epiblast-Stammzellen in ES-Zellen und der damit zusammen hängenden Eigenschaft Chimäre zu entwickeln (Bao et al., 2009). E-Cadherin ist an vielen verschiedenen Prozessen wie z.B. der Reprogrammierung und Differenzierung von Zellen sowie der Gewährleistung von mechanischer Stabilität und Morphogenese von Geweben und Organen aber auch der Metastasierung von Tumoren beteiligt. Die Signalwege, die mit diesen Prozessen einhergehen sind aber noch nicht vollständig verstanden. Für die Aufklärung des Mechanismus, der im Rahmen dieser Arbeit die E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion, in ESKM-iPS Zellen, zusammengebracht hat mit der Regulation der Oct4 Expression, sind weitere experimentelle Schritte notwendig.

### 8. Literaturverzeichnis

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M. J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G. et al.** (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* **26**, 1276-84.
- Abe, K. and Takeichi, M.** (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13-9.
- Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T. and Yamanaka, S.** (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* **321**, 699-702.
- Atkin, N. B., Baker, M. C., Robinson, R. and Gaze, S. E.** (1974). Chromosome studies on 14 near-diploid carcinomas of the ovary. *Eur J Cancer* **10**, 144-6.
- Babinet, C., Kemler, R., Dubois, P. and Jacob, F.** (1977). [Monovalent fragments of rabbit anti-F9 immunoglobulins prevent mouse blastocyst formation]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **284**, 1919-22.
- Bao, S., Tang, F., Li, X., Hayashi, K., Gillich, A., Lao, K. and Surani, M. A.** (2009). Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* **461**, 1292-5.
- Barasch, J., Yang, J., Ware, C. B., Taga, T., Yoshida, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Parravicini, E., Malach, S., Aranoff, T. et al.** (1999). Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF. *Cell* **99**, 377-86.
- Batsche, E., Muchardt, C., Behrens, J., Hurst, H. C. and Cremisi, C.** (1998). RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2. *Mol Cell Biol* **18**, 3647-58.
- Behrens, J., Birchmeier, W., Goodman, S. L. and Imhof, B. A.** (1985). Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to uvomorulin. *J Cell Biol* **101**, 1307-15.
- Boussadia, O., Kutsch, S., Hierholzer, A., Delmas, V. and Kemler, R.** (2002). E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland. *Mech Dev* **115**, 53-62.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G. et al.** (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**, 947-56.
- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G. G., Lengner, C. J., Wernig, M., Suh, H. and Jaenisch, R.** (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* **2**, 151-9.
- Brault, V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch, D. H., McMahon, A. P., Sommer, L., Boussadia, O. and Kemler, R.** (2001). Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development* **128**, 1253-64.
- Brons, I. G., Smithers, L. E., Trotter, M. W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Howlett, S. K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. A. et al.** (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**, 191-5.

## Literaturverzeichnis

---

- Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F. and Nieto, M. A.** (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* **2**, 76-83.
- Carey, B. W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M. and Jaenisch, R.** (2009). Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 157-62.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. and Smith, A.** (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643-55.
- Chen, T., Yuan, D., Wei, B., Jiang, J., Kang, J., Ling, K., Gu, Y., Li, J., Xiao, L. and Pei, G.** (2010). E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells* **28**, 1315-25.
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S. J., Johnson, J., Meisner, L. and Lanza, R.** (2006). Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* **439**, 216-9.
- Clark, H. F., Brentrup, D., Schneitz, K., Bieber, A., Goodman, C. and Noll, M.** (1995). Dachous encodes a member of the cadherin superfamily that controls imaginal disc morphogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev* **9**, 1530-42.
- Cole, M. F., Johnstone, S. E., Newman, J. J., Kagey, M. H. and Young, R. A.** (2008). Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev* **22**, 746-55.
- Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D. and van Roy, F.** (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* **7**, 1267-78.
- Damsky, C. H., Richa, J., Solter, D., Knudsen, K. and Buck, C. A.** (1983). Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* **34**, 455-66.
- De Vries, W. N., Evsikov, A. V., Haac, B. E., Fancher, K. S., Holbrook, A. E., Kemler, R., Solter, D. and Knowles, B. B.** (2004). Maternal beta-catenin and E-cadherin in mouse development. *Development* **131**, 4435-45.
- Delva, E., Tucker, D. K. and Kowalczyk, A. P.** (2009). The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a002543.
- Detrick, R. J., Dickey, D. and Kintner, C. R.** (1990). The effects of N-cadherin misexpression on morphogenesis in *Xenopus* embryos. *Neuron* **4**, 493-506.
- Diecke, S., Quiroga-Negreira, A., Redmer, T. and Besser, D.** (2008). FGF2 signaling in mouse embryonic fibroblasts is crucial for self-renewal of embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* **188**, 52-61.
- Eastham, A. M., Spencer, H., Soncin, F., Ritson, S., Merry, C. L., Stern, P. L. and Ward, C. M.** (2007). Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Res* **67**, 11254-62.

## Literaturverzeichnis

---

- Endoh, M., Endo, T. A., Endoh, T., Fujimura, Y., Ohara, O., Toyoda, T., Otte, A. P., Okano, M., Brockdorff, N., Vidal, M. et al.** (2008). Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. *Development* **135**, 1513-24.
- Evans, M. J. and Kaufman, M. H.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-6.
- Feng, B., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J. H., Heng, J. C., Chan, Y. S., Yaw, L. P., Zhang, W., Loh, Y. H., Han, J. et al.** (2009). Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol* **11**, 197-203.
- Ferber, E. C., Kajita, M., Wadlow, A., Tobiansky, L., Niessen, C., Ariga, H., Daniel, J. and Fujita, Y.** (2008). A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus. *J Biol Chem* **283**, 12691-700.
- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E., Behrens, J., Sommer, T. and Birchmeier, W.** (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* **4**, 222-31.
- Furuse, M.** (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a002907.
- Gallin, W. J., Edelman, G. M. and Cunningham, B. A.** (1983). Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1038-42.
- Garrett-Sinha, L. A., Eberspaecher, H., Seldin, M. F. and de Crombrugge, B.** (1996). A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. *J Biol Chem* **271**, 31384-90.
- Gershengorn, M. C., Hardikar, A. A., Wei, C., Geras-Raaka, E., Marcus-Samuels, B. and Raaka, B. M.** (2004). Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science* **306**, 2261-4.
- Gottardi, C. J., Wong, E. and Gumbiner, B. M.** (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* **153**, 1049-60.
- Gumbiner, B. M.** (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-57.
- Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K. and Kemler, R.** (1995). Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* **121**, 3529-37.
- Halbleib, J. M. and Nelson, W. J.** (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* **20**, 3199-214.
- Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L., Morfopoulou, S., Humphreys, P., Mansfield, W., Walker, R. et al.** (2009). Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* **5**, 597-609.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B. W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M. P., Steine, E. J., Cassady, J. P., Foreman, R. et al.** (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* **133**, 250-64.

## Literaturverzeichnis

---

- Hatta, K., Okada, T. S. and Takeichi, M.** (1985). A monoclonal antibody disrupting calcium-dependent cell-cell adhesion of brain tissues: possible role of its target antigen in animal pattern formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 2789-93.
- Haussinger, D., Ahrens, T., Aberle, T., Engel, J., Stetefeld, J. and Grzesiek, S.** (2004). Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography. *Embo J* **23**, 1699-708.
- Hemberger, M., Dean, W. and Reik, W.** (2009). Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 526-37.
- Heng, J. C., Feng, B., Han, J., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J. H., Orlov, Y. L., Huss, M., Yang, L., Lufkin, T. et al.** (2010). The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell* **6**, 167-74.
- Heuberger, J. and Birchmeier, W.** (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a002915.
- Hinck, L., Nathke, I. S., Papkoff, J. and Nelson, W. J.** (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* **125**, 1327-40.
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K. and Yamanaka, S.** (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* **460**, 1132-5.
- Hotta, A. and Ellis, J.** (2008). Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *J Cell Biochem* **105**, 940-8.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W. and Melton, D. A.** (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* **26**, 1269-75.
- Huber, A. H., Stewart, D. B., Laurents, D. V., Nelson, W. J. and Weis, W. I.** (2001). The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem* **276**, 12301-9.
- Huelsken, J., Vogel, R., Erdmann, B., Cotsarelis, G. and Birchmeier, W.** (2001). beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* **105**, 533-45.
- Hyafil, F., Babinet, C. and Jacob, F.** (1981). Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* **26**, 447-54.
- Hyafil, F., Morello, D., Babinet, C. and Jacob, F.** (1980). A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell* **21**, 927-34.
- Imhof, B. A., Vollmers, H. P., Goodman, S. L. and Birchmeier, W.** (1983). Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell* **35**, 667-75.
- Inuzuka, H., Miyatani, S. and Takeichi, M.** (1991). R-cadherin: a novel Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina. *Neuron* **7**, 69-79.
- Ireton, R. C., Davis, M. A., van Hengel, J., Mariner, D. J., Barnes, K., Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Matrisian, L., Bundy, L. M., Sealy, L. et al.** (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* **159**, 465-76.
- Kahan, B. W. and Ephrussi, B.** (1970). Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *J Natl Cancer Inst* **44**, 1015-36.

## Literaturverzeichnis

---

- Kan, N. G., Stemmler, M. P., Junghans, D., Kanzler, B., de Vries, W. N., Dominis, M. and Kemler, R.** (2007). Gene replacement reveals a specific role for E-cadherin in the formation of a functional trophoctoderm. *Development* **134**, 31-41.
- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomeli, H., Nagy, A., McLaughlin, K. J., Scholer, H. R. et al.** (2004). Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep* **5**, 1078-83.
- Kii, I., Amizuka, N., Shimomura, J., Saga, Y. and Kudo, A.** (2004). Cell-cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of the osteo-lineage and the chondro-lineage. *J Bone Miner Res* **19**, 1840-9.
- Klaus, A. and Birchmeier, W.** (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 387-98.
- Kortlever, R. M. and Bernards, R.** (2006). Senescence, wound healing and cancer: the PAI-1 connection. *Cell Cycle* **5**, 2697-703.
- Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J. and Kemler, R.** (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophoctoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8263-7.
- Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q. et al.** (2010). A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* **7**, 51-63.
- Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H. J., Yoder, M. C. and Chan, R. J.** (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* **105**, 635-7.
- Lickert, H., Bauer, A., Kemler, R. and Stappert, J.** (2000). Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion. *J Biol Chem* **275**, 5090-5.
- Ling, V. and Neben, S.** (1997). In vitro differentiation of embryonic stem cells: immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies. *J Cell Physiol* **171**, 104-15.
- Lowry, W. E. and Plath, K.** (2008). The many ways to make an iPS cell. *Nat Biotechnol* **26**, 1246-8.
- Lyssiotis, C. A., Foreman, R. K., Staerk, J., Garcia, M., Mathur, D., Markoulaki, S., Hanna, J., Lairson, L. L., Charette, B. D., Bouchez, L. C. et al.** (2009). Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8912-7.
- Mah, S. P., Saueressig, H., Goulding, M., Kintner, C. and Dressler, G. R.** (2000). Kidney development in cadherin-6 mutants: delayed mesenchyme-to-epithelial conversion and loss of nephrons. *Dev Biol* **223**, 38-53.
- Maherali, N. and Hochedlinger, K.** (2009). Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* **19**, 1718-23.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R. et al.** (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* **1**, 55-70.

## Literaturverzeichnis

---

- Mahoney, P. A., Weber, U., Onofrechuk, P., Biessmann, H., Bryant, P. J. and Goodman, C. S.** (1991). The fat tumor suppressor gene in *Drosophila* encodes a novel member of the cadherin gene superfamily. *Cell* **67**, 853-68.
- Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z. et al.** (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *Embo J* **21**, 1948-56.
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D. and Saftig, P.** (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9182-7.
- Marson, A., Foreman, R., Chevalier, B., Bilodeau, S., Kahn, M., Young, R. A. and Jaenisch, R.** (2008). Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* **3**, 132-5.
- Martin, G. R. and Evans, M. J.** (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 1441-5.
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T. and Yokota, T.** (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J* **18**, 4261-9.
- Matsui, Y., Zsebo, K. and Hogan, B. L.** (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* **70**, 841-7.
- Matter, K. and Balda, M. S.** (2003). Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 225-36.
- Meng, W. and Takeichi, M.** (2009). Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a002899.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. and Yamanaka, S.** (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631-42.
- Nachtigal, P., Gojova, A. and Semecky, V.** (2001). The role of epithelial and vascular-endothelial cadherin in the differentiation and maintenance of tissue integrity. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **44**, 83-7.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N. and Yamanaka, S.** (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* **26**, 101-6.
- Nichols, J., Chambers, I., Taga, T. and Smith, A.** (2001). Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development* **128**, 2333-9.
- Niwa, H., Miyazaki, J. and Smith, A. G.** (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**, 372-6.
- Nose, A., Nagafuchi, A. and Takeichi, M.** (1988). Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* **54**, 993-1001.
- Nose, A. and Takeichi, M.** (1986). A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol* **103**, 2649-58.

## Literaturverzeichnis

---

- Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y. and Takeichi, M.** (1994). A Drosophila homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev Biol* **165**, 716-26.
- Ogou, S. I., Yoshida-Noro, C. and Takeichi, M.** (1983). Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules common to hepatocytes and teratocarcinoma stem cells. *J Cell Biol* **97**, 944-8.
- Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S.** (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-7.
- Ozawa, M., Engel, J. and Kemler, R.** (1990). Single amino acid substitutions in one Ca<sup>2+</sup> binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. *Cell* **63**, 1033-8.
- Pan, C., Lu, B., Chen, H. and Bishop, C. E.** (2010). Reprogramming human fibroblasts using HIV-1 TAT recombinant proteins OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC. *Mol Biol Rep* **37**, 2117-24.
- Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W. and Daley, G. Q.** (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* **451**, 141-6.
- Pece, S. and Gutkind, J. S.** (2002). E-cadherin and Hakai: signalling, remodeling or destruction? *Nat Cell Biol* **4**, E72-4.
- Peinado, H., Quintanilla, M. and Cano, A.** (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* **278**, 21113-23.
- Pruszk, J., Ludwig, W., Blak, A., Alavian, K. and Isacson, O.** (2009). CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells. *Stem Cells* **27**, 2928-40.
- Quinn, J., Kunath, T. and Rossant, J.** (2006). Mouse trophoblast stem cells. *Methods Mol Med* **121**, 125-48.
- Radice, G. L., Rayburn, H., Matsunami, H., Knudsen, K. A., Takeichi, M. and Hynes, R. O.** (1997). Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* **181**, 64-78.
- Ranscht, B. and Dours-Zimmermann, M. T.** (1991). T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron* **7**, 391-402.
- Resnick, J. L., Bixler, L. S., Cheng, L. and Donovan, P. J.** (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* **359**, 550-1.
- Reynolds, A. B.** (2010). Exposing p120 catenin's most intimate affair. *Cell* **141**, 20-2.
- Riethmacher, D., Brinkmann, V. and Birchmeier, C.** (1995). A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 855-9.
- Roczniak-Ferguson, A. and Reynolds, A. B.** (2003). Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity. *J Cell Sci* **116**, 4201-12.
- Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H. K., Beyer, T. A., Datti, A., Woltjen, K., Nagy, A. and Wrana, J. L.** (2010). Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* **7**, 64-77.
- Sano, K., Tanihara, H., Heimark, R. L., Obata, S., Davidson, M., St John, T., Taketani, S. and Suzuki, S.** (1993). Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *Embo J* **12**, 2249-56.

## Literaturverzeichnis

---

- Shan, W. S., Tanaka, H., Phillips, G. R., Arndt, K., Yoshida, M., Colman, D. R. and Shapiro, L.** (2000). Functional cis-heterodimers of N- and R-cadherins. *J Cell Biol* **148**, 579-90.
- Shapiro, L. and Weis, W. I.** (2009). Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a003053.
- Shirayoshi, Y., Okada, T. S. and Takeichi, M.** (1983). The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* **35**, 631-8.
- Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T. W. and Smith, A.** (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* **6**, e253.
- Silva, J. and Smith, A.** (2008). Capturing pluripotency. *Cell* **132**, 532-6.
- Sleeman, J. P.** (2000). The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res* **157**, 55-81.
- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M. and Rogers, D.** (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-90.
- Smith, K. P., Luong, M. X. and Stein, G. S.** (2009). Pluripotency: toward a gold standard for human ES and iPS cells. *J Cell Physiol* **220**, 21-9.
- Solter, D. and Knowles, B. B.** (1978). Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 5565-9.
- Solter, D., Skreb, N. and Damjanov, I.** (1970). Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. *Nature* **227**, 503-4.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G. and Hochedlinger, K.** (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**, 945-9.
- Stemmler, M. P.** (2008). Cadherins in development and cancer. *Mol Biosyst* **4**, 835-50.
- Stemmler, M. P., Hecht, A. and Kemler, R.** (2005). E-cadherin intron 2 contains cis-regulatory elements essential for gene expression. *Development* **132**, 965-76.
- Stevens, L. C. and Little, C. C.** (1954). Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **40**, 1080-7.
- Suyama, K., Shapiro, I., Guttman, M. and Hazan, R. B.** (2002). A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell* **2**, 301-14.
- Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M. and Hirano, T.** (1998). Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* **18**, 4109-17.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S.** (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-76.
- Tam, P. P. and Loebel, D. A.** (2007). Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet* **8**, 368-81.
- Tam, W. L., Lim, C. Y., Han, J., Zhang, J., Ang, Y. S., Ng, H. H., Yang, H. and Lim, B.** (2008). T-cell factor 3 regulates embryonic stem cell pluripotency and self-renewal by the transcriptional control of multiple lineage pathways. *Stem Cells* **26**, 2019-31.
- Tanoue, T. and Takeichi, M.** (2005). New insights into Fat cadherins. *J Cell Sci* **118**, 2347-53.

## Literaturverzeichnis

---

- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. and Nieto, M. A.** (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871-90.
- Thiery, J. P. and Sleeman, J. P.** (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 131-42.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M.** (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-7.
- Tian, Z. J. and An, W.** (2004). ERK1/2 contributes negative regulation to STAT3 activity in HSS-transfected HepG2 cells. *Cell Res* **14**, 141-7.
- Usui, T., Shima, Y., Shimada, Y., Hirano, S., Burgess, R. W., Schwarz, T. L., Takeichi, M. and Uemura, T.** (1999). Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell* **98**, 585-95.
- van Hengel, J., Vanhoenacker, P., Staes, K. and van Roy, F.** (1999). Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7980-5.
- van Roy, F. and Berx, G.** (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3756-88.
- Vestweber, D. and Kemler, R.** (1985). Identification of a putative cell adhesion domain of uvomorulin. *Embo J* **4**, 3393-8.
- Vogelmann, R., Nguyen-Tat, M. D., Giehl, K., Adler, G., Wedlich, D. and Menke, A.** (2005). TGFbeta-induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. *J Cell Sci* **118**, 4901-12.
- Wagner, R. T., Xu, X., Yi, F., Merrill, B. J. and Cooney, A. J.** (2010). Canonical Wnt/beta-Catenin Regulation of Liver Receptor Homolog-1 (Lrh-1) Mediates Pluripotency Gene Expression. *Stem Cells*.
- Wang, Y., Janicki, P., Koster, I., Berger, C. D., Wenzl, C., Grosshans, J. and Steinbeisser, H.** (2008). Xenopus Paraxial Protocadherin regulates morphogenesis by antagonizing Sprouty. *Genes Dev* **22**, 878-83.
- Watanabe, T., Sato, K. and Kaibuchi, K.** (2009). Cadherin-mediated intercellular adhesion and signaling cascades involving small GTPases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a003020.
- Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J. P. and Jaenisch, R.** (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* **2**, 10-2.
- Wheelock, M. J. and Johnson, K. R.** (2003). Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 509-14.
- Wilmot, I., Sullivan, G. and Taylor, J.** (2009). A decade of progress since the birth of Dolly. *Reprod Fertil Dev* **21**, 95-100.
- Woltjen, K. and Stanford, W. L.** (2009). Preview. Inhibition of Tgf-beta signaling improves mouse fibroblast reprogramming. *Cell Stem Cell* **5**, 457-8.
- Xiang, Y. Y., Tanaka, M., Suzuki, M., Igarashi, H., Kiyokawa, E., Naito, Y., Ohtawara, Y., Shen, Q., Sugimura, H. and Kino, I.** (1994). Isolation of complementary DNA encoding K-cadherin, a novel rat cadherin preferentially expressed in fetal kidney and kidney carcinoma. *Cancer Res* **54**, 3034-41.

## Literaturverzeichnis

---

**Yamanaka, S. and Blau, H. M.** (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* **465**, 704-12.

**Yang, J. and Weinberg, R. A.** (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* **14**, 818-29.

**Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. and Smith, A.** (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281-92.

**Yoshida, K., Chambers, I., Nichols, J., Smith, A., Saito, M., Yasukawa, K., Shoyab, M., Taga, T. and Kishimoto, T.** (1994). Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. *Mech Dev* **45**, 163-71.

**Yu, J. and Thomson, J. A.** (2008). Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev* **22**, 1987-97.

**Zhou, H., Wu, S., Joo, J. Y., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y. et al.** (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 381-4.

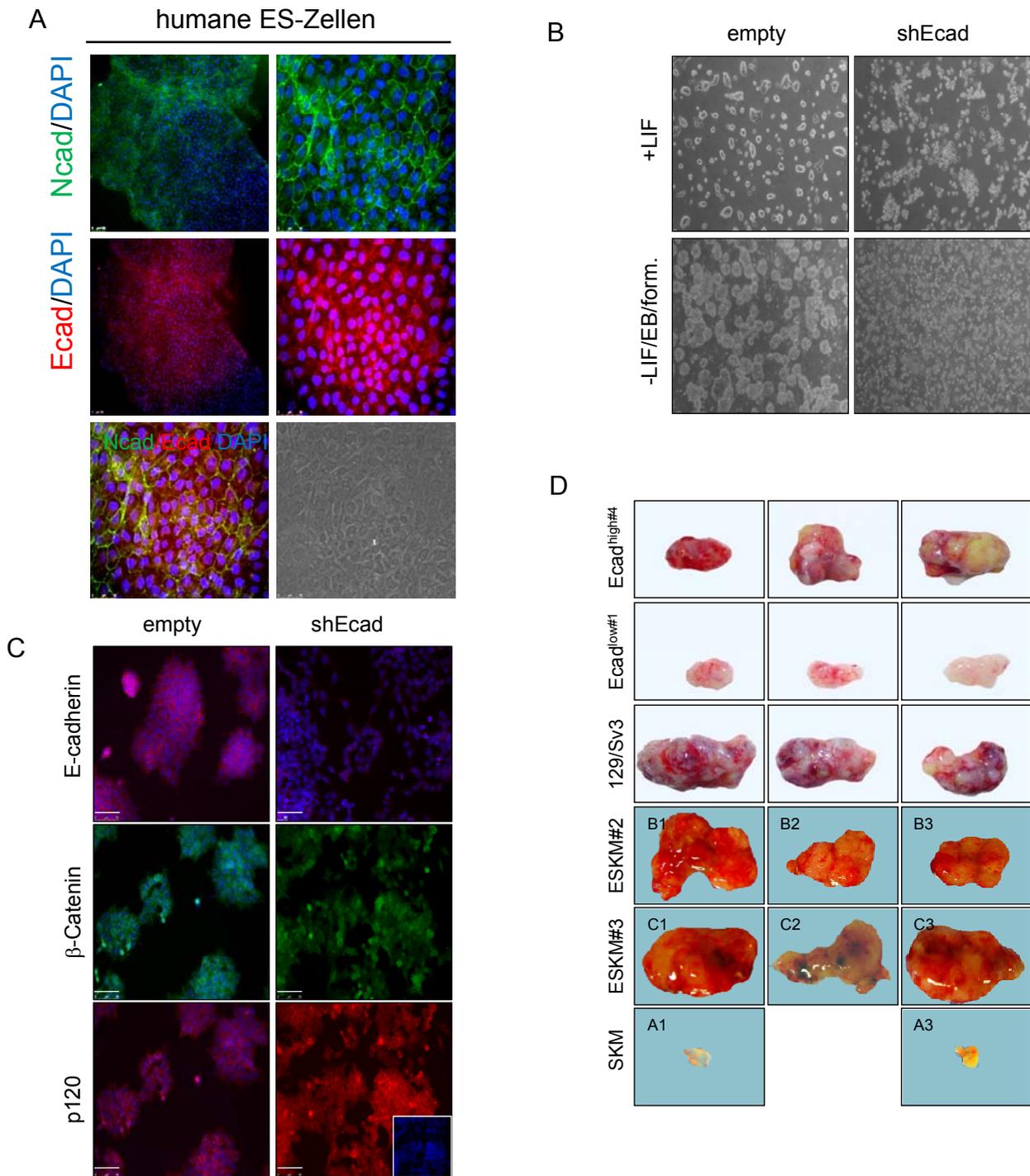
## Abbildungsverzeichnis

---

### 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zell-Zell Verbindungen. ....	10
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Vertreter der Cadherin-Superfamilie. ....	13
Abbildung 3: Schematischer Aufbau der extrazellulären Domänen von humanem E-Cadherin. ....	17
Abbildung 4: Trans-Dimerisierung von E-Cadherin. ....	19
Abbildung 5: Darstellung der Promotorregion des E-Cadherin Gens. ....	22
Abbildung 6: Proteolytische Spaltungsstellen des E-Cadherin Proteins. ....	24
Abbildung 7: Frühe Embryonalentwicklung und Differenzierung der Blastozyste. ....	26
Abbildung 8: LIF-abhängige Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges. ....	31
Abbildung 9: Expression von Pluripotenzmarkern in murinen embryonalen Stammzellen. ....	33
Abbildung 10: Regulation des Polycomb-Repressor Komplexes 2 durch Pluripotenzgene. ....	34
Abbildung 11: Die Integrität von mES-Zellen ist reguliert über Ecad vermittelte Zelladhäsion. ....	52
Abbildung 12: Die Proteinlevel von $\beta$ -Catenin und p120 Catenin sind in Abwesenheit von E-Cadherin reduziert in 129/Sv3 Zellen. ....	54
Abbildung 13: Die Expression von E-Cadherin und N-Cadherin unterscheidet vollständig und partiell reprogrammierte iPS Zellen. ....	58
Abbildung 14: Hepatozyten können in stabile iPS Zellen konvertiert werden. ....	59
Abbildung 15: Reprogrammierung führt nicht primär zur Bildung von Ecad/SSEA-1 <sup>pos</sup> Zellen. ....	60
Abbildung 16: Der E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Komplex ist notwendig für die Differenzierung von mES- und iPS-Zellen. ....	62
Abbildung 17: Die Expression von E-Cadherin bestimmt das Differenzierungspotential von iPS Zellen. ....	64
Abbildung 18: Die Expression von E-Cadherin bestimmt das Entwicklungspotential von iPS Zellen. ...	65
Abbildung 19: Der Reprogrammierungsprozess benötigt den Ecad/ $\beta$ -Catenin Komplex. ....	68
Abbildung 20: Die Überexpression von E-Cadherin als zusätzlicher Faktor kann die Effizienz der Reprogrammierung nicht erhöhen. ....	70
Abbildung 21: ESKM Klone exprimieren Oct4 und zeigen alle Eigenschaften von ES- Zellen. ....	71
Abbildung 22: ESKM Klone exprimieren OSKM auf endogenem Level. ....	73
Abbildung 23: ESKM Zellen zeigen ein hohes in vivo Differenzierungspotential. ....	75
Abbildung 24: Ecad <sup>high</sup> und ESKM Zellen sind positiv für aktive und repressive Methylierungsmotive. ....	77
Abbildung 25: Modell zur Cadherin Expression während der iPS-Induktion und der Differenzierung. .	87
Abbildungen 26: Co-Expression von E-Cadherin und N-Cadherin in humanen embryonalen Stammzellen, Ecad <sup>neg</sup> 129/Sv3 ES-Zellen und Teratome. ....	106
Abbildung 27: Plasmidkarten. ....	107

10. Anhang I



**Abbildungen 26: Co-Expression von E-Cadherin und N-Cadherin in humanen embryonalen Stammzellen, Ecad<sup>neg</sup> 129/Sv3 ES-Zellen und Teratome.**

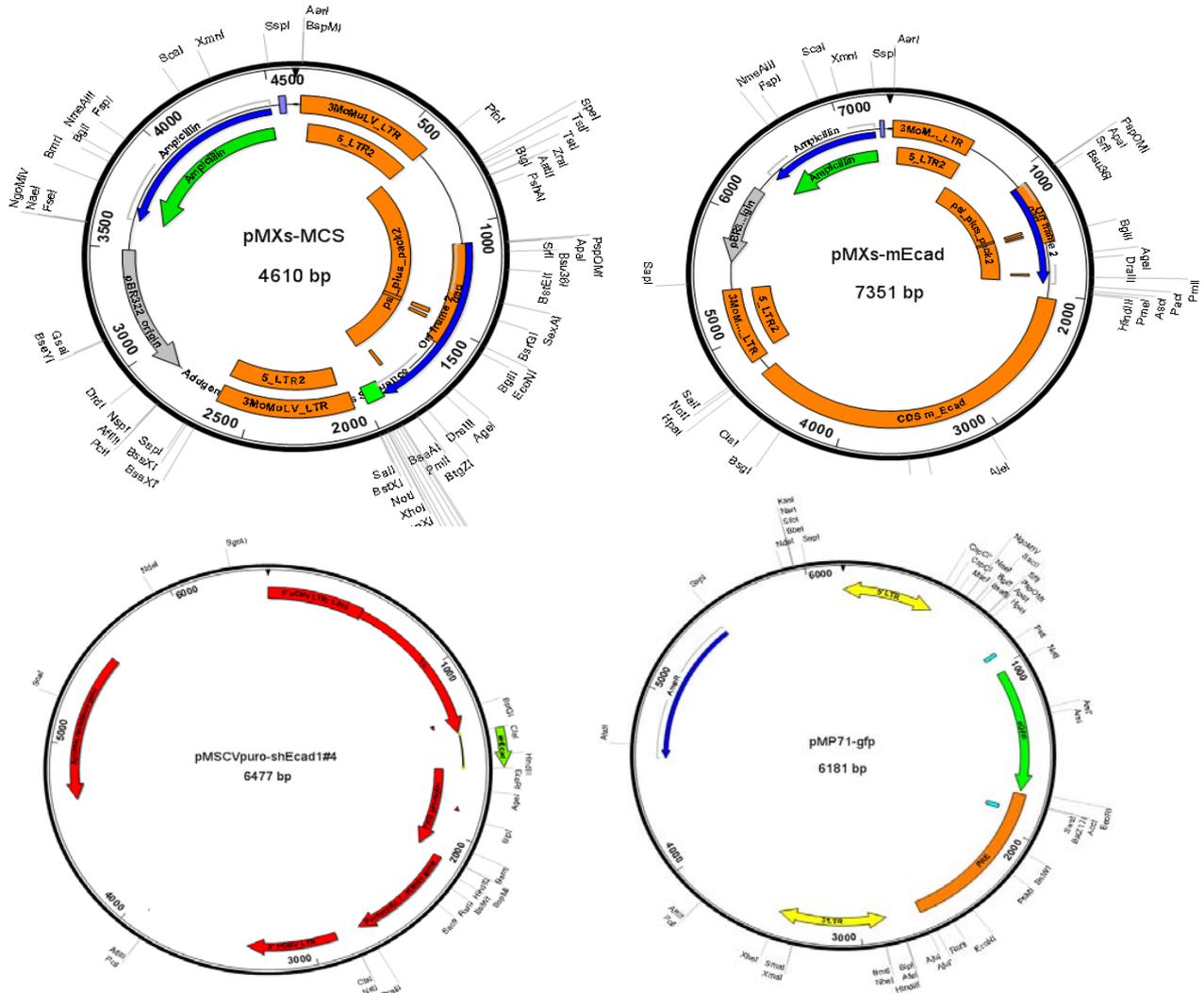
(A) Gezeigt sind die Expression von N-Cadherin (Ncad), E-Cadherin (Ecad) in der Co-Färbung mit DAPI (100x Vergrößerung, 100 µm, linke Seite) sowie in 400x Vergrößerung, 50 µm Marker, rechte Seite. (B) Morphologie und Embryoid Body Differenzierung von 129/Sv3-shEcad und 129/Sv3-empty Zellen. (C) Immunfluoreszenz der Zellen in (B) auf Matrigel für die angegebenen Marker (D) Darstellung der durch subkutane Injektion erzeugten Tumore der jeweiligen iPS-Linien.

11. Anhang II

**Tabelle 3: Zusammenfassung der Eigenschaften etablierter iPS-Zellen.**

Die etablierten iPS-Zelllinien sind in der Tabelle charakterisiert durch die Expression der verschiedenen Marker, sowie durch ihr Entwicklungs- bzw. Differenzierungspotential.

	<i>E-cadherin</i>	<i>N-cadherin</i>	<i>Nanog</i>	<i>SSEA-1</i>	<i>Oct4endo</i>	<i>Oct4viral</i>	<i>Dppa5</i>	<i>H3K4me3</i>	<i>H3K27me3</i>		<i>EB/Teratom</i>	<i>Blast. Injekt.</i>
<b>Ecad<sup>high</sup></b>	√	-	√	√	√	-	√	√	√	<b>Ecad<sup>high</sup></b>	√	√
<b>Ecad<sup>low</sup></b>	-	√	-	-	√	√	-	-	√	<b>Ecad<sup>low</sup></b>	-/-	-
<b>ESKM#1</b>	√	-	√	√	√	-	√	√	√	<b>ESKM#1</b>	√/NA	N/A
<b>ESKM#2</b>	√	-	√	√	√	-	√	√	√	<b>ESKM#2</b>	√/√	N/A
<b>ESKM#3</b>	√	-	√	√	√	-	√	√	√	<b>ESKM#3</b>	√/√	N/A
<b>SKM</b>	-	√	√	√	√	-	√	√	√	<b>SKM</b>	-/-	N/A
<b>129/Sv3</b>	√	-	√	√	√	-	√	√	√	<b>129/Sv3</b>	√	N/A
<b>Hep-iPS</b>	√	-	√	√	√	-	√	√	√	<b>Hep-iPS</b>	√/NA	N/A
<b>MEF</b>	-	√	-	-	-	-	-	N/A	N/A	<b>MEF</b>	N/A	N/A



**Abbildung 27: Plasmidkarten.**

Der pMXs-Vektor, wurde als Backbone Vektor für virale Transduktion von Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc und Ecad verwendet. pMSCV wurde verwendet zur viralen Expression der shRNA gegen E-Cadherin und MP71-GFP als Expressionsvektor zur stabilen Expression von GFP.

### 12. Danksagung

Ich möchte hiermit ganz herzlich einigen Menschen danken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Als erstes danke ich Herrn Dr. Daniel Besser für die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu können sowie meinen beiden Kollegen Sebastian Diecke und Angel Quiroga-Negreira, für ihre helfenden Hände. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Walter Birchmeier für seine Hilfe während des Schreibens der Veröffentlichung. Außerdem möchte ich den Kollegen des W. Birchmeier Labors für anregende Diskussionen und Ratschläge, darunter speziell Frau Dr. Alexandra Klaus und Herrn Dr. Peter Wend danken. Und zuletzt danke ich ganz besonders meiner Freundin Frau Susanne Kreuzer für ihre moralische Unterstützung, die mir für die Fertigstellung dieser sehr viel Kraft gegeben hat.

### 13. Lebenslauf

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