

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ)

Direktor Dr. med. Johannes Fischer

**Analyse der OCT4-Expression in unrestringierten
somatischen Stammzellen (USSC) aus humanem
Nabelschnurblut**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Judith S. Springer

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan Univ.-Prof. Dr. N. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. M. Uhrberg

Zweitgutachter: Prof. Dr. T. Niehues

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Santourlidis S, Wernet P, Ghanjati F, Graffmann N, Springer J, Kriegs C, Zhao X, Brands J, Araúzo-Bravo MJ, Neves R, Koegler G, Uhrberg M (2011) Unrestricted somatic stem cells (USSC) from human umbilical cord blood display uncommitted epigenetic signatures of the major stem cell pluripotency genes. *Stem Cell Research* **6**, 60-69

Zachres H, Kögler G, Arauzo-Bravo MJ, Bleidissel M, Santourlidis S, Weinhold S, Greber B, Kim JB, Buchheiser A, Liedtke S, Eilken HM, Graffmann N, Zhao X, Meyer J, Reinhardt P, Burr B, Waclawczyk S, Ortmeier C, Uhrberg M, Schöler HR, Cantz T, Wernet P (2010) Induction of pluripotency in human cord blood unrestricted stem cells. *Experimental Hematology* **38**: 809-818

Erklärung

in der vorliegenden Dissertation werden Befunde vorgestellt, die bereits in publizierter Form vorliegen.

Zaehres H, Kögler G, Arauzo-Bravo MJ, Bleidissel M, Santourlidis S, Weinhold S, Greber B, Kim JB, Buchheiser A, Liedtke S, Eilken HM, Graffmann N, Zhao X, Meyer J, Reinhardt P, Burr B, Waclawczyk S, Ortmeier C, Uhrberg M, Schöler HR, Cantz T, Wernet P (2010) Induction of pluripotency in human cord blood unrestricted stem cells. *Experimental Hematology* 38: 809-818

Im Namen aller Autoren bedauern Prof. Dr. Uhrberg und PD Dr. Santourlidis ausdrücklich, dass Frau Judith Springer nicht in die Autorenliste aufgenommen worden ist und ihre Beiträge zur Publikation daher erst in der vorliegenden Dissertation gewürdigt werden können.

Zusammenfassung

Spezifische epigenetische Signaturen, wie z.B. die DNA-Methylierung von Pluripotenzgenen wie *OCT4*, haben einen Einfluss auf die Genexpression und resultieren in einem zelltyp-spezifischem Transkriptionsprogramm. Somit können Zelltypen anhand ihres epigenetischen Musters und ihrer Genexpression charakterisiert werden.

Der Transkriptionsfaktor OCT4 wird nahezu ausschließlich in embryonalen Stammzellen (ESC) exprimiert und ist essentiell für den Erhalt der Pluripotenz. Mit zunehmender Differenzierung nimmt die OCT4-Expression ab, parallel dazu nimmt die DNA-Methylierung der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens zu.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der DNA-Methylierungsstatus eines ausgewählten Bereichs innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens in unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) aus humanem Nabelschnurblut erhoben. Der DNA-Methylierungsstatus wurde mittels genomischer DNA-Sequenzierung nach Bisulfitkonvertierung aus fünf USSC-Linien (SA4/101, SA4/146, SA5/60, SA5/73 und SA8/25) ermittelt und mit differenzierten Zellen (primäre NK-Zellen) sowie ES-Zellen (ES I3) verglichen. Die untersuchte Region innerhalb des regulatorischen Bereichs des *OCT4*-Gens ist in den fünf untersuchten USSC-Linien signifikant weniger methyliert als in der differenzierten primären NK-Zelle. Im Vergleich zu der Zelllinie ES I3 ist der Bereich in USSC signifikant stärker methyliert.

Um herauszufinden, ob der gefundene DNA-Methylierungsstatus in USSC mit der Expression von OCT4 einhergeht, wurde die OCT4-Expression auf mRNA- und Proteinebene mittels quantitativer RT-PCR und Westernblot untersucht. Es konnte keine OCT4-Expression in USSC nachgewiesen werden, weder auf Transkript- noch auf Proteinebene.

Auf epigenetischer Ebene ähnelt die USSC hinsichtlich der DNA-Methylierung der untersuchten Region innerhalb des regulatorischen Bereichs des Pluripotenzgens *OCT4* einer embryonalen Stammzelle. Die fehlende OCT4-Expression entspricht dagegen vielmehr dem Genexpressionsmuster differenzierter Zellen.

Im Rahmen der genomischen DNA-Sequenzierung nach Bisulfitkonvertierung wurde in der USSC-Linie SA8/25 eine Punktmutation innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens entdeckt, die zu einer Elimination eines CG-Dinukleotids führt. Infolgedessen kann hier keine Methylierung stattfinden. Mittels Promotorreporter-Assay wurde untersucht, ob dadurch die OCT4-Promotoraktivität gesteigert wird. Es zeigte sich, dass die Punktmutation nicht zu einer signifikanten Steigerung der OCT4-Promotoraktivität führt. Offensichtlich scheint eine einzelne fehlende Methylierungsmöglichkeit im regulatorischen Bereich des *OCT4*-Gens keinen nennenswerten Einfluss auf die OCT4-Promotoraktivität zu nehmen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen erstmals eine interessante Diskrepanz zwischen dem stammzellspezifischen epigenetischen Muster des *OCT4*-Gens in USSC und der nichtvorhandenen Transkription des Gens. Allerdings wurde in dieser Arbeit nur ein kleiner Teil der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens untersucht, der den *OCT4*-Minimalpromotor und einen Teil des Exons 1 umfasst. In zukünftigen Arbeiten sollte die Analyse der DNA-Methylierung daher auf die gesamte regulatorische Region des *OCT4*-Gens ausgeweitet werden, um ein genaueres Bild der epigenetischen Signatur in Zusammenhang mit der fehlenden OCT4-Expression von USSC zu erhalten. Ebenso könnte die gesamte regulatorische *OCT4*-Region inklusive der Punktmutation in einem Promotorreporter-Assay untersucht werden, um zu klären, ob nicht durch Fehlen der übrigen regulatorischen Elemente (Distaler und Proximaler Verstärker) keine ausreichende Promotoraktivität gemessen wurde.

Abkürzungsverzeichnis

Ab	Antikörper (<i>antibody</i>)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
CD	Cluster of differentiation
CR	Konservierte Region (<i>conserved region</i>)
DE	Distaler Verstärker (<i>distal enhancer</i>)
ESC	Embryonale Stammzelle (<i>embryonic stem cell</i>)
EtOH	Ethanol
EtOH abs.	absoluter (=100 %iger) Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
HCl	Chlorwasserstoff
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney</i>)
hESC	Humane embryonale Stammzelle (<i>human embryonic stem cell</i>)
iPS	induzierte pluripotente Stammzelle (<i>induced pluripotent stem cell</i>)
iPS Fib	induzierte pluripotente Stammzellen aus Fibroblasten
kb	Kilobase
MNC	Mononukleäre Zellen (<i>mononuclear cell</i>)
MP	Minimalpromotor
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MSP	Methylspezifische PCR
n/a	nicht anwendbar
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Proximaler Verstärker (<i>proximal enhancer</i>)
PIC	protease inhibitor cocktail
RLU	Relative light unit
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumddodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumddodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)

T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
TEMED	Tetramethyldiamin
U	Unit
USSC	Unrestringierte somatische Stammzelle (<i>unrestricted somatic stem cell</i>)
v/v	Volumen pro Volumen, Volumenprozent
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Epigenetik.....	1
1.1.1. DNA-Methylierung.....	2
1.1.2. Weitere epigenetische Mechanismen.....	4
1.1.3. Epigenetik und Entwicklung.....	4
1.1.4. Epigenetik und klinische Relevanz.....	5
1.2. Stammzellen.....	6
1.2.1. Humane Embryonale Stammzelle (hESC).....	6
1.2.2. Adulte Stammzellen.....	7
1.2.3. Unrestringierte somatische Stammzelle (USSC).....	7
1.3. OCT4.....	10
1.3.1. Regulation der OCT4-Expression.....	11
1.3.2. OCT4 und DNA-Methylierung.....	12
1.3.3. Funktion von OCT4.....	12
1.4. Reprogrammierung und induzierte Pluripotenz.....	14
2. Zielsetzung der Arbeit	17
3. Material und Methoden	18
3.1. Material.....	18
3.1.1. Chemikalien.....	18
3.1.2. Geräte.....	19
3.1.3. Materialien.....	20
3.1.4. Kommerzielle Kits.....	20
3.1.5. Zelllinien.....	21
3.1.6. Bakterienstamm.....	22
3.2. Methoden.....	23
3.2.1. Zellkultur und Isolierung von Zellen.....	23
3.2.2. Isolierung von NK-Zellen.....	23
3.3. Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	25
3.3.1. DNA-Aufreinigung aus Zellen.....	25
3.3.2. RNA-Aufreinigung aus Zellen.....	25
3.3.3. Weitere Aufreinigungsmethoden von Nukleinsäuren.....	26
3.4. Analyse des DNA-Methylierungsstatus.....	27
3.4.1. Bisulfitkonvertierung.....	27
3.4.2. DNA-Methylierungsanalyse mittels genomischer Sequenzierung.....	29
3.5. RNA-Nachweis.....	34
3.5.1. Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR).....	34
3.5.2. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).....	35
3.6. Proteinnachweis mittels Westernblot.....	36
3.6.1. Proteinisolierung.....	36
3.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	37
3.6.3. Westernblot.....	37
3.7. Promotoranalyse.....	41
3.7.1. Klonierung des <i>OCT4</i> -Minimalpromotors.....	41
3.7.2. Messung der Luciferaseaktivität.....	50
3.8. Bioinformatik.....	51
4. Ergebnisse	52
4.1. DNA-Methylierungsanalyse der 22 CpGs innerhalb der regulatorischen Region des <i>OCT4</i> -Gens.....	52

	VI
4.1.1. Ergebnis der DNA-Methylierungsanalyse in USSC.....	54
4.1.2. Vergleich des DNA-Methylierungsstatus in nativen USSC mit dem DNA-Methylierungsstatus in USSC nach 14-tägiger Osteo-differenzierung.....	60
4.1.3. Ergebnisse der DNA-Methylierung in putativen iPS-Zellen.....	63
4.2. Nachweis von OCT4 Expression auf mRNA-Ebene	66
4.3. Nachweis von OCT4-Expression auf Proteinebene.....	67
4.4. Vergleichende OCT4-Promotoraktivitätsmessung mittels Luciferase-Assay.....	69
5. Diskussion	74
5.1. DNA-Methylierungsanalyse der 22 CpGs innerhalb der regulatorischen Region des <i>OCT4</i> -Gens in USSC	74
5.1.1. DNA-Methylierungsstatus in nativen USSC nach 14-tägiger Osteodifferenzierung	77
5.1.2. DNA-Methylierungsanalyse in putativen iPS-Zellen.....	78
5.1.3. DNA-Methylierungsdaten im Zusammenhang mit weiteren Mechanismen der Genregulation in USSC	80
5.2. Vergleichende <i>OCT4</i> -Promotor-Aktivitätsmessung	82
6. Schlussfolgerung.....	84
7. Literaturliste.....	85
8. Danksagung	97

1. Einleitung

1.1. Epigenetik

Die Epigenetik beschreibt Mechanismen, die zu vererbaren Veränderungen in der Funktion von Genen führen, welche nicht durch Modifikationen der zugrunde liegenden DNA-Sequenz erklärt werden können (Russo et al., 1996). Es handelt sich dabei um chemische Veränderungen an bestimmten DNA-Basen (Methylierung von Cytosin) oder den Histon-Proteinen, welche die DNA verpacken, und dadurch Einfluss auf die Genexpression nehmen. Unter dem Terminus Epigenetik (*epi* griechisch für *zusätzlich*) werden somit Prozesse zusammengefasst, die zusätzlich zur „klassischen Genetik“ zu vererbaren Modifikationen der Genexpression führen.

Erstmals angewendet wurde der Begriff Epigenetik in den 1950ern von dem Entwicklungsbiologen Conrad Waddington. Er verwendete den Begriff Epigenetik für alle Ereignisse, die während der Entwicklung von der befruchteten Eizelle bis zum ausgewachsenen Organismus stattfinden (Waddington, 1957).

In Anbetracht der Erkenntnis, dass alle Zellen von der Stammzelle bis zur differenzierten Zelle die gleiche DNA teilen, jedoch eine unterschiedliche Genexpression aufweisen, wird heutzutage unter Epigenetik die Summe aller molekularbiologischen Veränderungen verstanden, die in ihrer Gesamtheit zur Festlegung und Vererbung unterschiedlicher Genexpressionsmuster auf Grundlage ein und desselben Genoms führen (Allis et al., 2006). Zu diesen Veränderungen oder vielmehr epigenetischen Mechanismen zählen hauptsächlich die DNA-Methylierung und die Histon-Modifikationen wie z.B. Histon-Methylierung, -Acetylierung oder -Phosphorylierung. Durch Veränderung der Chromatinstruktur und Veränderung des Zugangs zum DNA-Strang für z.B. Transkriptionsfaktoren regulieren diese chemischen Modifikationen die Genexpression (Bernstein et al., 2007).

Insbesondere bei der Entwicklung von der Stammzelle hin zur differenzierten, organspezifischen Zelle spielen diese epigenetischen Mechanismen eine entscheidene Rolle. So wird die Genexpression bestimmter Gene, die für die Entwicklung und Differenzierung wichtig sind, wie z. B. das Gen für den Transkriptionsfaktor OCT4, durch DNA-Methylierung und Histonmodifikationen reguliert (Reik, 2007).

Der bisher am besten charakterisierte epigenetische Mechanismus ist die DNA-Methylierung. Im Rahmen dieser Arbeit wird im Folgenden auf die DNA-Methylierung näher eingegangen.

1.1.1. DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist ein epigenetischer Mechanismus, der nach der DNA-Replikation stattfindet. Dabei wird eine Methylgruppe (-CH₃) an Position 5 der Base Cytosin innerhalb einer 5'-CpG-3'-Dinukleotidsequenz angehängt (Allis et al., 2006). Diese Reaktion wird katalysiert durch die DNA-Methyltransferasen (DNMTs) mit S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) als Methylgruppenspender (Miranda and Jones, 2007). Die Methylierung von Cytosin ist schematisch in der Abb. 1 dargestellt.

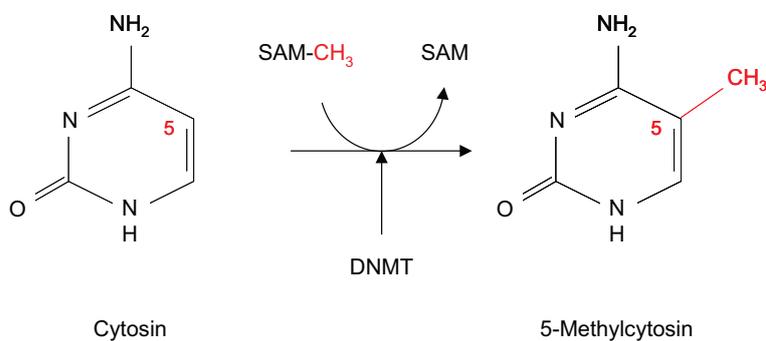


Abb. 1 *Methylierung von Cytosin.*

SAM steht für den Methylgruppenspender *S*-Adenosyl-*L*-Methionin, *DNMT* steht für das Enzym *DNA*-Methyltransferase, welches die Reaktion katalysiert.

Es existieren drei verschiedene Methyltransferasen: die *maintenance* DNA-Methyltransferase DNMT 1, die für den Erhalt der Methylierung während der Zellteilungen verantwortlich ist, sowie die *de novo* Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b, die für die Methylierung von einzelnen Genabschnitten während der Entwicklung verantwortlich sind (Bestor, 2000).

Die DNA-Methylierung findet überwiegend an CpG-Dinukleotiden statt. Im menschlichen Genom existieren CpG-arme und CpG-reiche Regionen. Die CpG-reichen Regionen werden CpG-Inseln genannt und sind definiert als ein Genabschnitt mit einer Länge von mindestens 200 bp, einem Cytosin und Guanosen-Gehalt von mehr als 50 %, sowie einem Verhältnis von beobachtetem zu erwartetem CpG-Gehalt (Obs/Exp-ratio CpG) größer als 0,6 (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). Das *human genome project* detektierte 26.876 CpG-Inseln (CG ratio >0,8) im menschlichen Genom mit einer durchschnittlichen Länge von 497 bp (Venter et al., 2001). In der Regel sind die CpG-Inseln am 5'-Ende eines Gens lokalisiert und mit Promotorregionen assoziiert (Jones and

Baylin, 2002). In 22 % der Fälle überschneiden sich die Sequenz des ersten Exons und die CpG-Sequenz (Venter et al., 2001).

In gesunden Zellen sind die CpG-Inseln in der Regel unmethyliert. Es gibt jedoch auch CpG-Inseln, die während der Entwicklung methyliert werden, wodurch der entsprechende Promotor in seiner Funktion stillgelegt wird, wie z.B. bei Pluripotenzgenen, u.a. dem *OCT4*-Gen (Deaton and Bird, 2011; Mohn et al., 2008).

Die DNA-Methylierung beeinflusst und reguliert die Transkription. Erklären lässt sich das über zwei Mechanismen: die Methylgruppe behindert direkt die Bindung von Transkriptionsfaktoren an der DNA-Sequenz. Viele Transkriptionsfaktoren binden an Sequenzen, die CpGs enthalten. Sind die CpGs methyliert, ist die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die DNA gestört. Ein weiterer Mechanismus, der über die DNA-Methylierung zur Unterdrückung der Transkription führt, erfolgt über Methyl-CpG-Bindeproteine. Diese Proteine binden an methylierten CpGs und hemmen die Transkription (Bird, 2002).

Häufig ist die DNA-Methylierung ein zusätzlicher Mechanismus um Gene, die durch Histonmodifikationen und Chromatinstruktur stillgelegt wurden, irreversibel in ihrer Transkription zu hemmen. Da es sich bei der DNA-Methylierung um eine stabile Veränderung an der DNA handelt, sorgt die DNA-Methylierung für eine Hemmung der Transkription über viele Zellteilungen hinweg. Eine Reaktivierung stillgelegter Gene wird somit überer mehrere Zellteilungen hinweg verhindert, wird also vererbt (Miranda and Jones, 2007).

Die DNA-Methylierung ist der entscheidende Mechanismus der Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms beim weiblichen Genotyp sowie der genomischen Prägung (Imprinting). Genomische Prägung beschreibt einen nicht-mendelschen Erbvorgang, bei der die DNA-Methylierung zur Inaktivierung des mütterlichen oder väterlichen Allels führt. Somit entscheidet die genomische Prägung darüber, welches elterliche Allel exprimiert wird. (Miranda and Jones, 2007).

Die DNA-Methylierung ist ein dynamischer Prozess, Veränderungen des DNA-Methylierungsstatus des gesamten Gens, einzelner Chromosomen und spezifischer Gene sind die Voraussetzung für eine normale Entwicklung (Wolffe et al., 1999). So existieren neben der DNA-Methylierung auch Mechanismen der DNA-Demethylierung. Die DNA-Demethylierung ist essentiell zur Induktion der Genexpression zuvor stillgelegter Gene. So ist z.B. die DNA-Demethylierung des *OCT4*-Promotors ein wesentlicher Vorgang in der Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (Wu and Zhang, 2010).

Die DNA-Demethylierung kann auf zwei Wegen erfolgen: aktiv durch enzymatische Entfernung der Methylgruppe an Position 5 der Base Cytosin durch Spalten einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-

Bindung oder passiv durch Verlust der Methylgruppe während der DNA-Replikation infolge einer Hemmung der *maintenance* DNA-Methyltransferase DNMT 1 (Wu and Zhang, 2010). Die genauen Mechanismen der aktiven DNA-Methylierung sind noch nicht vollständig geklärt. Ein beschriebener Mechanismus der aktiven DNA-Demethylierung ist die mehrfache Oxydierung von 5-Methylcytosin durch die *ten-eleven-translocation (TET)*-Enzymfamilie. Zunächst entsteht 5-Hydroxymethylcytosin, dann 5-Formylcytosin und schließlich 5-Carboxycytosin, welches gezielt durch den TDG/BER (*Thymin-DNA Glycosylase/base excision repair*) -Signalweg ausgeschnitten und durch unmethyliertes Cytosin ersetzt wird (Wu and Zhang, 2014).

1.1.2. Weitere epigenetische Mechanismen

Neben der DNA-Methylierung gibt es noch weitere epigenetische Mechanismen, die hier nur kurz umrissen werden sollen, da sie nicht Gegenstand dieser Arbeit sind. Zusammen mit der DNA-Methylierung zählen die Histonmodifikationen zu den wichtigsten epigenetischen Mechanismen. Hierunter fasst man posttranslationale Veränderungen an den Histonen zusammen. Unter den acht bekannten Modifikationen zählen die Acetylierung, die Methylierung und die Phosphorylierung zu den drei wichtigsten Modifikationen. Allen diesen Modifikationen ist gemeinsam, dass sie über Modifikationen der Chromatinstruktur oder über Rekrutieren von Histon-assoziierten Proteinen den Zugang zur DNA-Sequenz verändern. Somit wird die Transkription und letztendlich die Expression von Genen beeinflusst. Je nachdem welche Modifikationen vorherrschen, werden transkriptionell aktive oder inaktive Chromatinzustände unterschieden (Jenuwein and Allis, 2001; Kouzarides, 2007).

1.1.3. Epigenetik und Entwicklung

Während des Differenzierungsvorgangs von humanen embryonalen Stammzellen zeigen sich Veränderungen der DNA-Methylierung. Es kommt sowohl zu einer globalen Zunahme der Methylierung, als auch zu einer zunehmenden Methylierung von stammzell-spezifischen Genen, wie z. B. dem *OCT4*-Gen. In der Regel werden während der Entwicklung und Zelldifferenzierung die Promotoren von stammzell-spezifischen Genen zunehmend methyliert, was die Unterdrückung der Genexpression zur Folge hat (Collas et al., 2007). So wird der *OCT4*-Promotor während der Differenzierung methyliert, einhergehend mit einer sinkenden Expression von OCT4 (Yeo et al., 2007).

Die DNA-Methylierung initiiert nicht die Unterdrückung der stammzell-spezifischen Gene, ist jedoch wichtig für die irreversible Inaktivierung dieser Gene (Feldmann et al., 2006), da eine unbeabsichtigte Expression von OCT4 in adulten, differenzierten Zellen zu Zelldysplasien führt (Hochedlinger et al., 2005).

Wie wichtig die Methylierung für die normale Entwicklung ist, zeigen Versuche mit *Dnmt-knock-out*-Mausembryonen. So führt das Fehlen von DNMT1 in embryonalen Stammzellen zu einem genomweiten Verlust der Methylierung, was zu einer fehlerhaften Entwicklung und letztendlich zu embryonaler Sterblichkeit führt (Li et al., 1992).

Ebenfalls mündet das Fehlen der DNMT3a und DNMT3b in frühe embryonale Sterblichkeit. Das Fehlen eines der beiden Enzyme DNMT3a oder DNMT3b verursacht Defekte, die zu embryonaler oder unmittelbar postnataler Sterblichkeit führen (Okano et al., 1999).

1.1.4. Epigenetik und klinische Relevanz

Klinisch relevant ist die DNA-Methylierung bei der Entstehung von Tumoren. Bei vielen Tumoren sind die Promotorregionen von Tumorsuppressorgen hypermethyliert, was den Funktionsverlust von Tumor-unterdrückenden Genen zur Folge hat. Die abnorme Methylierung spielt eine Rolle in vielen sporadischen Tumorformen, z. B. beim Von-Hippel-Lindau-Syndrom, einem autosomal-dominant vererbaren Neoplasiesyndrom mit Tumoren des ZNS, der Nieren, Nebennieren und anderer Organe sowie bei Brust- und Dickdarmkrebs. (Jones and Baylin, 2002).

Auch vererbare Krankheiten als Folge einer fehlerhaften genetischen Prägung (siehe Kapitel 1.1.1) sind bekannt. Beispiele hierfür sind sporadische Formen des Angelman-Syndroms oder des Prader-Willi-Syndroms, beides Syndrome, die mit mentaler Retardierung einhergehen (Egger et al., 2004). Ein weiteres Beispiel ist die sporadische Form des Beckwith-Wiedemann-Syndroms, ein Syndrom, das durch Großwuchs, Makroglossie und einer Prädisposition zu embryonalen Tumoren gekennzeichnet ist. Hierbei führt der Verlust der DNA-Methylierung in der Chromosomen-Region 11p15.5 zu einer Dysregulation oder einem Verlust der genetischen Prägung (Weksberg et al., 2003).

1.2. Stammzellen

Stammzellen sind Zellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Generierung differenzierter Zellen besitzen. Stammzellen können sich unendlich-fach teilen ohne ihren undifferenzierten Status zu verlieren, behalten aber ihre Fähigkeit, differenzierte Zellen zu bilden (Hall and Watt, 1989). Je nach Möglichkeit der Stammzelle sich in jede Zelle des Körpers oder lediglich in Zellen bestimmter Gewebearten zu differenzieren, lassen sich embryonale von adulten Stammzellen unterscheiden.

1.2.1. Humane Embryonale Stammzelle (hESC)

Embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen, d.h. sie können in jede Zelle des Organismus differenzieren (Pera et al., 2000). Humane embryonale Stammzellen wurden erstmals 1998 von Thomson et al. aus der inneren Zellmasse (ICM) von fünf bis acht Tage alten Blastozysten gewonnen (Thomson et al., 1998).

Embryonale Stammzellen sind gekennzeichnet durch die Expression bestimmter Marker, so genannter „Stammzell-Marker“, wie z. B. der *phasenspezifischen embryonalen Antigene* SSEA-3 und SSEA-4, dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP), der *tumour-rejection-Antigene* TRA-1-60 und TRA-1-81 und dem Antigen GCTM-2 (*Podocalyxin-like proteine*), sowie der Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2 und NANOG (Boiani and Schöler, 2005). OCT4 ist ein besonders wichtiger Stammzell-Marker, dessen Expression unabdingbar ist für den Erhalt der Pluripotenz (Nichols et al., 1998; siehe Kapitel 1.3).

Des Weiteren sind humane embryonale Stammzellen durch ein einzigartiges DNA-Methylierungsmuster, das sich wesentlich von dem differenzierter Zellen unterscheidet, gekennzeichnet (Bibikova et al., 2006; Erklärung Methylierung siehe Kapitel 1.1.1). Es wurde gezeigt, dass in murinen embryonalen Stammzellen die Promotorregionen von Genen, die mit der Differenzierung assoziiert sind, in der Regel methyliert sind, während im Gegensatz dazu die Promotoren von Genen, die mit Pluripotenz assoziiert sind, wie z. B. *OCT4* und *NANOG*, überwiegend frei von Methylierung sind (Fouse et al., 2008).

Dies deutet darauf hin, dass ein spezielles, für embryonale Stammzellen charakteristisches DNA-Methylierungsmuster mit verantwortlich ist für die Pluripotenz.

Zurzeit stehen 307 hESC-Linien für die Forschung zur Verfügung (Stand April 2015, <http://escr.nih.gov/>). Diese Vielzahl an humanen embryonalen Stammzellen bietet ein großes Potential für den Einsatz in der regenerativen Medizin. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass sich durch gezielte Differenzierung embryonaler Stammzellen zerstörtes Gewebe ersetzen lässt und sich somit humane embryonale Stammzellen theoretisch für die Behandlung von

Herzinfarkt, Schlaganfall, Diabetes und neurodegenerativer Erkrankungen einsetzen lassen (Wobus and Boheler, 2005).

Allerdings birgt die Stammzelltherapie potentielle Risiken. Humane embryonale Stammzellen haben das Potential, bedingt u.a. durch die hohe Proliferationsrate und die genetische Instabilität, Teratome und Teratokarzinome zu bilden (Ben David and Benvenisty, 2011). Ein weiteres, bisher noch wenig untersuchtes Risiko ist die immunotoxische Wirkung von transplantierten hESC (Goldring et al, 2011). Zudem bringt der Einsatz von hESC ethische Probleme mit sich. Die Gewinnung von Stammzellen aus wenige Tage alten Embryonen führt zur Zerstörung des Embryos und wirft die Frage auf, ab wann menschliches Leben beginnt und schützenswert ist. Somit entsteht ein ethisches Dilemma, bei dem auf der einen Seite der Anspruch steht, Krankheiten zu heilen und Leiden zu lindern, auf der anderen Seite menschliches Leben oder werdendes menschliche Leben zu schützen.

1.2.2. Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen ein eingeschränktes Differenzierungspotenzial haben. Adulte Stammzellen befinden sich in ausgereiftem, adultem Gewebe wie z. B. dem Knochenmark. Sie dienen als Reservezellen und sind an dem Erhalt und der Reparatur des Gewebes beteiligt (Young and Black, 2004). Adulte Stammzellen sind multipotent, d. h. sie können sich meist in alle Zelltypen eines bestimmten Gewebetypes differenzieren (Hochedlinger and Plath, 2009). Ein Beispiel hierfür ist die hämatopoetische Stammzelle (HSC) aus Knochenmark: sie kann sich in alle Zelltypen des Blutes differenzieren (Ogawa et al., 1983). Weitere adulte Stammzellen befinden sich im Darm (Intestinale Stammzellen), im Mesenchym (Mesenchymale Stammzellen), im Endothel (Endotheliale Stammzellen) oder im Nervengewebe (Neuronale Stammzellen).

Adulte Stammzellen eignen sich aus mehreren Gründen für Therapien im Rahmen autologer Transplantation: sie können im Prinzip aus jedem Individuum isoliert werden und ihre Gewinnung ist einfacher und ethisch unproblematischer als die Gewinnung embryonaler Stammzellen. Das beste Beispiel für den medizinischen Einsatz adulter Stammzellen ist die Stammzelltransplantation zur Therapie bestimmter Leukämieformen (Kernan et al., 1993).

1.2.3. Unrestringierte somatische Stammzelle (USSC)

Die unrestringierte somatische Stammzelle (USSC, *unrestricted somatic stem cell*) ist eine kleine Zellpopulation, die in humanem Nabelschnurblut entdeckt wurde (Kögler et al., 2004). Es handelt sich um eine Zelle mit normalem Karyotyp (46XX oder 46XY), die u. a. negativ ist für die hämatopoetischen Oberflächenmarker CD45 und CD34, sowie für das Histokompatibilitätsantigen

HLA II. Sie wächst adhärent und lässt sich in hohem Maße expandieren ohne dabei ihre Pluripotenz zu verlieren.

Die USSC ist eine pluripotente Zelle, die sich in alle drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und Mesoderm) differenzieren kann. Es wurde gezeigt, dass sich die USSC *in vitro* und *in vivo* in Leberzellen (entodermaler Herkunft), in Osteoblasten, Chondroblasten und in hämatopoetische Zellen (mesodermaler Herkunft), sowie in neuronale Zellen (ektodermaler Herkunft) differenzieren kann. (Kögler et al., 2004).

Von mesenchymalen Stammzellen (MSC), die sich ebenfalls in humanem Nabelschnurblut finden lassen, unterscheiden sich die USSC in ihrem Expressionsprofil. So exprimieren USSC, im Gegensatz zu MSC DLK-1 (Delta like 1), ein Protein, das die Differenzierung in Adipozyten hemmt. Dementsprechend korreliert die hohe Expression von DLK-1 in USSC mit einer fehlenden adipogenen Differenzierung, wohingegen MSC, die nur schwach DLK-1 exprimieren, eine starke adipogene Differenzierung aufweisen (Kluth et al., 2010). Zudem ist DLK-1 mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung des proliferativen Zustands undifferenzierter Zellen (Yevtodiyyenko and Schmidt, 2006) und scheint somit eine wichtige Rolle für den Erhalt des undifferenzierten Status der USSC zu spielen.

Als weiteres Unterscheidungskriterium dient das HOX-Expressionsmuster. Die HOX-Gene sind verantwortlich für die Entwicklung und Gliederung des Embryos entlang der anterioren-posterioren Körperachse (Krumlauf, 1994). Während USSC keine HOX-Expression aufweisen und somit ebenso wie z.B. die ES-Zellen H9 HOX-negativ sind, zeigen MSC aus humanem Nabelschnurblut eine hohe Expression diverser HOX-Gene, insbesondere HOXA9, HOXA10, HOXB2, HOXB7, HOXC6, HOXC10 und HOXD8 (Liedtke et al., 2010).

Die Telomerlänge ist ebenfalls ein Merkmal zur Unterscheidung von USSC und MSC. Mit einer Länge von durchschnittlich 10,7 kb sind die Telomere in USSC signifikant länger als in MSC, die eine durchschnittliche Länge von 9,5 kb aufweisen. Dies impliziert, dass die USSC biologisch jünger sind als die MSC (Kluth et al., 2010).

Die Eigenschaften der USSC, insbesondere ihre Fähigkeit in alle drei Keimblätter zu differenzieren, macht die USSC zu einem Kandidaten für Zelltherapien. Möglichen therapeutischen Einsatz könnte diese Zellpopulation in der regenerativen Medizin finden, wie z. B. zur Transplantation in infarziertes Herzgewebe. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass nach Transplantation von USSC in infarziertes Myokard die Ventrikelfunktion signifikant verbessert, sowie die Narbenbildung und die Dilatation des Ventrikels vermieden werden konnte (Ghodsiad et al., 2009).

Auch für allogene Spenden kommen die USSC in Betracht. Nabelschnurblut wird bereits seit Jahren therapeutisch eingesetzt, allogene Stammzelltransplantationen aus Nabelschnurtransplantaten werden z. B. bei Patienten mit akuter Leukämie angewendet. Um USSC therapeutisch einsetzen zu können, müssen sie zunächst, um eine ausreichend hohe Zellzahl zu erhalten, in Zellkultur unter GMP-Bedingungen vermehrt werden (Reimann et al., 2009). Eine autologe, also für den Eigenbedarf gedachte Anwendung von USSC sowie von komplettem Nabelschnurblut ist medizinisch gesehen bisher nicht indiziert, zum einen aufgrund des fehlenden erwünschten *Graft versus Leukemia (GvL)*-Effekts und der Gefahr der Rückübertragung genetisch bedingter Erkrankungen (insbesondere bei akuten Leukämien im Kindesalter), zum anderen aufgrund der teuren und aufwendigen Lagerung (Reimann et al., 2009).

1.3. OCT4

Das *OCT4*-Gen codiert für einen Transkriptionsfaktor, der für den Erhalt der Pluripotenz einer Zelle erforderlich ist. Er wird ausschließlich von embryonalen Stammzellen, der Blastomere sowie von den Zellen der Keimbahn exprimiert (Nichols et al., 1998; Niwa, 2001).

OCT4 (auch OCT3 oder POU5F1) steht für Octamer-binding transcription factor 4 und gehört zu der POU (Pit-Oct-Unc)-Familie, einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren mit einer hochkonservierten Region (Schöler et al., 1990; Herr and Cleary, 1995). Lokalisiert ist das *OCT4*-Gen auf dem Chromosom 6 (6p21.31), in enger Nachbarschaft zu den HLA Klasse I-Genen. (Takeda et al., 1992; Krishnan et al., 1995). Das *OCT4*-Gen ist über 7 kb lang und besteht aus fünf Exons (Takeda et al., 1992).

Das *OCT4*-Gen besitzt keine CpG-Insel, jedoch einen CG-reichen Promotor (Shiota, 2004). Die Expression von OCT4 wird durch einen TATA-losen Minimalpromoter und zwei vorgeschalteten Verstärkerelementen reguliert, dem distal gelegenen Verstärker (*DE*) und dem proximal gelegenen Verstärker (*PE*) (Okazawa et al., 1991; Yeom et al., 1996).

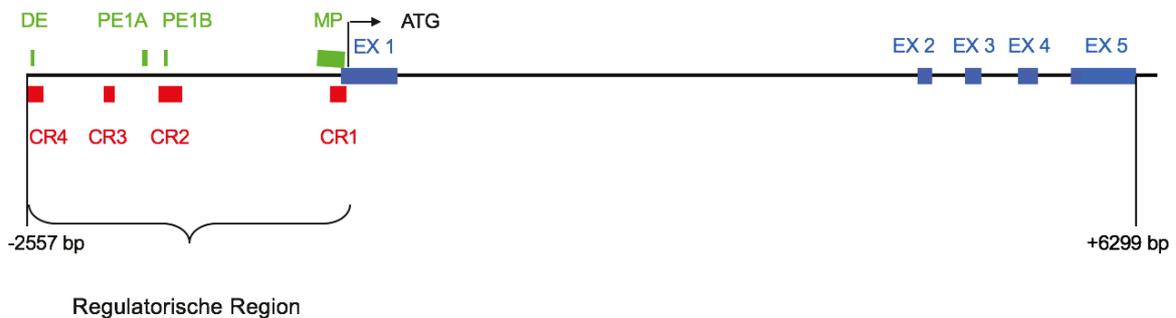
Die Sequenz der gesamten Promotorregion, d. h. der Minimalpromotor mit den zwei Verstärkerelementen, weist unter verschiedenen Säugetierarten starke Ähnlichkeiten auf, ist also während der Evolution erhalten geblieben. So lassen sich vier hoch erhaltene Regionen, *conserved regions (CR)*, in der *OCT4*-Promotorregion verschiedener Säugetierarten finden (Nordhoff et al., 2001). Zwei dieser hoch konservierten Regionen, *CR1* und *CR4*, erstrecken sich über den Minimalpromotor und das distale Verstärkerelement (siehe Abb. 2) und sind an der Regulation der *OCT4*-Expression beteiligt (Nordhoff et al., 2001).

Der *OCT4*-Minimalpromotor befindet sich 250 bp stromaufwärts des Translationsstarts (ATG) und ist innerhalb der hoch konservierten Region CR1 gelegen. Hier sind Bindestellen für diverse Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren vorhanden. Das proximal gelegene Verstärkerelement (*PE*) liegt 1,2 kb stromaufwärts des Translationsstarts, das distal gelegene Verstärkerelement findet sich ca. 2 kb stromaufwärts des Translationsstarts (Ovitt and Schöler, 1998).

Das *OCT4*-Gen kodiert für eine ca. 1,5 kb lange mRNA. Durch alternatives Splicing können zwei Proteinvarianten translatiert werden, die sich in ihrem N-Terminus unterscheiden: ein langes Protein, bestehend aus 360 Aminosäuren (Isoform A) und ein kurzes Protein, bestehend aus 265 Aminosäuren (Isoform B) (Takeda et al., 1992). Die Isoform A ist kernständig, die Isoform B befindet sich im Zytoplasma. Als Transkriptionsfaktor fungiert lediglich die kernständige Isoform A (Lee et al., 2006). Um als Transkriptionsfaktor in den Kern transportiert werden zu können, besitzt die Isoform A eine Kernlokalisierungssequenz (*NLS: nuclear localization signal*), die aus der Aminosäuresequenz ¹⁹⁵RKRKR (R: Arginin, K: Lysin) besteht (Pan et al, 2004).

OCT4 Gen und regulatorische Region

Chromosom 6p21.31



Legende:

- EX: Exon
- Regulatorische Elemente (DE/PE: Distaler/Proximaler Verstärker, MP: Minimalpromotor)
- CR: Konservierte Regionen
- ATG Translationsstart
- bp Basenpaar, gemessen vom ATG

Abb. 2 Schematische Darstellung des OCT4-Gens und seiner regulatorischen Region.

Dargestellt ist ein 8856 bp langes Fragment (-2557bp bis +6299 bp, gemessen vom Translationsstart) mit der Lage der Exons (EX), der regulatorischen Elemente (DE/PE, MP) und der konservierten Regionen (CR).

1.3.1. Regulation der OCT4-Expression

Für die Funktion als Transkriptionsfaktor, der für den Erhalt der Pluripotenz embryonaler Stammzellen mit verantwortlich ist, ist eine exakte Regulation der OCT4-Expression wichtig. Hieran sind die drei stromaufwärts vom Translationsstart gelegenen regulatorischen Elemente Minimalpromotor, sowie das distale und proximale Verstärkerelement beteiligt. Je nach Entwicklungsstadium sind die einzelnen regulatorischen Elemente aktiv. So ist der distale Verstärker in den Zellen der inneren Zellmasse (ICM) in der Blastozyste aktiv, der proximale Verstärker hingegen im primitiven Ektoderm (Yeom et al., 1996).

Durch Bindung des *germ cell nuclear factors* (GCNF), einem intrazellulärem Transkriptionsfaktor, an der Sequenz des proximalen Verstärkerelements wird die OCT4- Genaktivität unterdrückt (Pan et al, 2002). Während der Differenzierung wird GCNF hochreguliert einhergehend mit einer abnehmenden OCT4-Funktion (Kellner and Kikyo, 2010).

Während der Differenzierung von embryonalen Stammzellen wird die OCT4-Expression herunter reguliert. Findet die Ausschaltung der OCT4-Expression nicht zum richtigen Zeitpunkt statt, zieht das eine fehlerhafte Differenzierung nach sich (Boiani et al., 2002). Das komplette Fehlen von OCT4 führt, wie in Versuchen mit OCT4-defizienten Mausembryonen gezeigt werden konnte, zu früher embryonaler Letalität aufgrund der ausbleibenden Reaktivierung OCT4-assoziiierter Gene, die ebenfalls für die Pluripotenz verantwortlich sind (Bortvin et al., 2003).

An der Herunterregulation der OCT4-Expression während der Differenzierung spielen epigenetische Mechanismen, insbesondere die DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle.

1.3.2. OCT4 und DNA-Methylierung

Die Abnahme der OCT4-Expression verläuft parallel zur Zunahme der Methylierung der *OCT4*-Promotorregion. So ist die Promotorregion im undifferenzierten Stadium, wenn das *OCT4*-Gen noch aktiv ist, weitgehend unmethyliert, während mit fortschreitender Entwicklung die Methylierung der *OCT4*-Promotorregion zu- und die Genfunktion abnimmt (Deb-Rinker et al., 2005). Bei der Methylierung der 5'-Region des *OCT4*-Gens handelt es sich um eine *de novo* Methylierung. Durch die angehängten Methylgruppen in der regulatorischen *OCT4*-Region wird die Bindung von Transkriptionsfaktoren behindert (Ben-Shushan et al., 1993; Deb-Rinker et al., 2005).

Verantwortlich für die DNA-Methylierung des *OCT4*-Promotors während der Differenzierung von humanen ESC sind die *de novo* Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b (Feldman et al., 2006). Die Depletion der beiden Enzyme führt zu einer inadäquaten Methylierung des *OCT4*-Promotors einhergehend mit einer fehlerhaften, aberranten OCT4-Expression (Li et al., 2007).

Die OCT4-Expression und die regelrecht ablaufende Regulierung der OCT4-Expression durch die DNA-Methylierung sind somit entscheidend für einen fehlerfreien Ablauf der Differenzierung.

1.3.3. Funktion von OCT4

OCT4 ist ein Transkriptionsfaktor, der für den Erhalt der Pluripotenz embryonaler Stammzellen benötigt wird. OCT4 wird so gut wie ausschließlich von embryonalen Stammzellen exprimiert. Zunächst wird OCT4 von allen Blastomeren gebildet, im weiteren Verlauf der Entwicklung ist die Bildung von OCT4 auf die Zellen der inneren Zellmasse (ICM) der Blastozyste beschränkt (Palmieri et al. 1994; Nichols et al., 1998).

Je nach Menge an exprimiertem OCT4 entscheidet sich die weitere Entwicklung der embryonalen Stammzellen: eine definierte Menge an exprimiertem OCT4 sorgt für den Erhalt der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen. Wird diese definierte Menge an exprimierten OCT4 um 50 % überschritten, differenziert sich die ES-Zelle in primitives Endoderm und Mesoderm, wird die

definierte Menge um 50 % unterschritten, dedifferenziert die ES-Zelle in Trophektoderm (Niwa et al., 2000). Die Pluripotenz der ES-Zelle, wie auch die im Laufe der Entwicklung notwendige Differenzierung, ist somit von einer jeweils genau regulierten Menge an exprimiertem OCT4 abhängig.

Das Fehlen von OCT4, wie in Versuchen mit OCT4-negativen Mausembryos gezeigt werden konnte, führt zum Ausbleiben der fetalen Entwicklung, da die oben aufgeführte, von der OCT4-Menge abhängige Differenzierung in die unterschiedlichen Zelllinien sowie der Erhalt der Pluripotenz der Zellen der inneren Zellmasse ausbleibt (Nichols et al., 1998).

OCT4 ist ein Schlüsselfaktor für die Pluripotenz, Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen. Zusammen mit weiteren so genannten Stammzellfaktoren wie z. B. NANOG oder SOX2, bildet OCT4 ein kompliziertes Netzwerk aus gegenseitiger Bindung, positiver und negativer Rückkopplung und Bindung weiterer Ko-Faktoren, die zusammen die Fähigkeit zur Pluripotenz der Stammzellen regulieren (de Jong and Looijenga, 2006; Pan et al., 2006). Um einen Überblick über dieses komplizierte Netzwerk zu bekommen, können die einzelnen Komponenten nach ihrer Wechselwirkung mit OCT4 in drei Gruppen unterteilt werden (de Jong and Looijenga, 2006): die erste Gruppe sind Faktoren, die an den regulatorischen Elementen des *OCT4*-Gens, vorzugsweise an den vier hoch konservierten Regionen binden und die Transkription von OCT4 verstärken oder hemmen, wie z. B. der Transkriptionsfaktor SP1 (Nordhoff et al., 2001). Proteine, die direkt mit dem OCT4-Protein in Wechselwirkung treten, bilden die zweite Gruppe. So interagiert OCT4 u.a. direkt mit den Transkriptionsfaktoren NANOG, SP1 oder REX1 (Wang et al., 2006). Die dritte Gruppe setzt sich aus *downstream target genes*, also nachgeschalteten Zielgenen, zusammen. Diese Zielgene enthalten eine Octamer-DNA-Sequenz, an die OCT4 direkt binden kann. Über die Bindung von OCT4 an die *downstream target genes* kann die Expression der entsprechenden Gene gesteigert oder verringert werden. Diese Zielgene von OCT4 kodieren in der Regel wiederum für Transkriptionsfaktoren, die für die Entwicklung von Bedeutung sind, wie z. B. der Transkriptionsfaktor STAT3, der für die Selbsterneuerung von Stammzellen wichtig ist (Boyer et al., 2005).

1.4. Reprogrammierung und induzierte Pluripotenz

Der Begriff Reprogrammierung oder induzierte Pluripotenz beschreibt einen artifiziellen Vorgang, bei dem eine differenzierte Zelle in eine pluripotente Zelle konvertiert wird, die in ihrer Morphologie, in ihrer Funktion und auf molekularer Ebene den embryonalen Stammzellen sehr ähnlich ist. Diese künstlich hergestellten Stammzellen werden als induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) bezeichnet.

Erstmals hergestellt wurden die induzierten pluripotenten Stammzellen 2006 von den japanischen Forschern Kazutoshi Takahashi und Shinya Yamanaka durch retrovirale Transfektion der vier Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, cMYC und KLF4 in Fibroblasten von Mäusen (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ein Jahr später gelang die Generierung von induzierten pluripotenten Zellen aus menschlichen Zellen nach demselben Prinzip (Takahashi et al., 2007; Park et al., 2007; Wernig et al., 2007). 2012 erhielt Shinya Yamanaka hierfür den Nobelpreis für Medizin.

Auf molekularer Ebene betrachtet beschreibt Reprogrammierung die mit ihr einhergehenden molekulargenetischen Veränderungen wie z.B. die Demethylierung der Promotorregionen von Pluripotenzgenen (Hochedlinger and Path, 2009).

Induzierte pluripotente Stammzellen können auf verschiedene Art und Weise generiert werden. Die gängigste Methode zur Herstellung induzierter pluripotenter Stammzellen ist der Gentransfer mittels viraler Vektoren. In der Regel werden die vier Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und cMYC (auch OSKM-Faktoren genannt) durch Transfektion mittels retroviraler, lentiviraler oder adenoviraler Vektoren in adulte somatische Zellen eingebracht (Bayart and Cohen-Haguenauer, 2013). Die Transkriptionsfaktoren KLF4 und cMYC können durch NANOG und LIN28 ersetzt werden. OCT4 scheint jedoch der einzige Transkriptionsfaktor zu sein, der nicht ersetzt werden kann, so dass ihm die Rolle als Haupt-Transkriptionsfaktor, bzw. als sogenannter *master switch* zukommt (Wu and Schöler, 2014). Die zentrale Rolle von OCT4 in der Reprogrammierung wird dadurch deutlich, dass es gelungen ist, murine adulte neuronale Stammzellen allein durch Transfektion mit OCT4 zu pluripotenten Zellen umzuwandeln (Kim et al., 2009).

Alternativ zu viralen Vektorsystemen, kann die Transfektion auch mithilfe von Plasmiden durchgeführt werden, jedoch ist die Transfektionseffizienz verglichen zu viralen Vektorsystem deutlich geringer. Eine weitere Methode ist der Zellkerntransfer (*somatic cell nuclear transfer*, SCNT), bei dem der Zellkern einer somatischen Zelle in eine entkernte Oozyte eingebracht wird (Bayart and Cohen-Haguenauer, 2013).

Neuere Methoden versuchen ohne vektorbasierten Gentransfer auszukommen, z.B. mittels direkter Transfektion spezifischer microRNAs (miRNAs), die an der Regulation von pluripotenz-

assoziierten Genen beteiligt sind (z.B. miRNA-302) (Miyoshi et al., 2011). Versuche, induzierte pluripotente Stammzellen mittels Transfer von Proteinen, die aus humanen embryonalen Stammzellen gewonnen wurden, zu generieren, waren bislang wenig erfolgreich (Bayart and Cohen-Haguenaer, 2013). Zuletzt gelang es jedoch aus murinen embryonalen Fibroblasten mittels rekombinanter Proteine (Klf4, Oct4, Sox2, und c-Myc), welche die Zellmembran penetrieren können, induzierte pluripotente Stammzellen zu generieren (Nemes et al., 2014).

Inzwischen gibt es Ansätze, induzierte pluripotente Stammzellen lediglich mit Hilfe von *small molecules*, also niedermolekularen Verbindungen, die in Zellen eindringen können, herzustellen. Zu den *small molecules* zählen z.B. Valproinsäure, Forskolin und 2-Methyl-5-hydroxytryptamine. Hou et al. konnten zeigen, dass eine Kombination aus sieben *small molecules* in der Lage ist, induzierte pluripotente Stammzellen aus murinen somatischen Zellen zu generieren, ohne die klassischen Transkriptionsfaktoren zu verwenden (Hou et al., 2013). Mit humanen Zellen ist es bisher nicht gelungen induzierte pluripotente Stammzellen ausschließlich unter Verwendung von *small molecules* zu erschaffen; die Verwendung von mindestens zwei der klassischen Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und cMYC ist nötig (Federation et al., 2014; Huangfu et al., 2008, Higuchi et al., 2015). *Small molecules* scheinen eine Rolle als Modulator im Rahmen der Reprogrammierung zu spielen: Park et al. konnten an murinen iPS zeigen, dass *small molecules* die genomische Stabilität der iPS-Zellen erhalten und Doppelstrangbrüche vermindern (Park et al., 2015).

Der Prozess der Reprogrammierung unterliegt einer festgelegten Reihenfolge molekularer Veränderungen: zunächst wird das Enzym alkalische Phosphatase (AP) herunter reguliert, gefolgt von der Reaktivierung des phasenspezifischen embryonalen Antigens SSEA-1, sowie zuletzt der Reaktivierung stammzellspezifischer Gene wie *OCT4*, *SOX2* und *NANOG*. Zeitgleich mit der Reaktivierung der stammzellspezifischen Gene wird die reprogrammierte Zelle autark, d.h. sie exprimiert unabhängig von den retroviralen Transgenen pluripotenz-erhaltende Gene, womit die Zelle einen vollständig reprogrammierten Status erlangt (Brambrink et al., 2008).

Damit die Reprogrammierung erfolgen kann, muss das somatische Programm der Zellen inaktiviert und das ES-Zell-spezifische Programm aktiviert werden. Diese Vorgänge gehen einher mit epigenetischen Veränderungen. So werden die Promotorregionen von endogenen Pluripotenzgenen wie z. B. dem *OCT4*-Gen demethyliert. Eine erfolgreiche Reprogrammierung und die Aktivierung von Pluripotenzgenen kann u.a. anhand der Demethylierung dieser Pluripotenzgene gemessen werden (Mikkelsen et al., 2008; Hanna et al., 2010).

Die humanen induzierten pluripotenten Stammzellen sind den humanen embryonalen Stammzellen sehr ähnlich, jedoch nicht identisch. Die Pluripotenz der iPS-Zellen wurde durch die Fähigkeit

bewiesen, dass sie nach subkutaner Injektion Teratome mit Gewebeanteilen aller drei Keimblätter bilden.

Ebenso wie ES-Zellen bilden die iPS-Zellen stammzellspezifische Marker, u.a. OCT4 und NANOG, sowohl auf Transkriptions-, als auch auf Proteinebene. Untersuchungen der Promotorregionen von stammzellspezifischen Genen zeigen ein weitgehend demethyliertes Muster, vergleichbar mit den Befunden in hES-Zellen als Hinweis darauf, dass diese Promotoren in iPS-Zellen aktiv sind. Eine hohe Promotoraktivität in Luciferasemessungen bestätigt die Aktivität dieser Promotoren. Unterschiede zu hES-Zellen zeigen sich in der globalen Genexpression: die Gen-Expressionsmuster von humanen iPS-Zellen ähneln denen der hES-Zellen, stimmen aber nicht vollständig überein (Takahashi et al., 2007). So unterscheiden sich z.B. die Expression bestimmter miRNAs signifikant zwischen iPS- und ES-Zellen (Razak et al, 2009).

Die induzierten pluripotenten Stammzellen sind für die Medizin von besonders großem Interesse, da sie therapeutische Möglichkeiten durch autologe, patienten-spezifische Stammzellen in Aussicht stellen. In Mausmodellen konnten bereits Symptome der Sichelzellanämie (Hanna et al., 2007) und der Parkinsonkrankheit (Wernig et al., 2008) durch autologe, reprogrammierte Zellen vermindert werden.

Desweiteren stellen die iPS-Zellen ein Modell zur Untersuchung der Pathophysiologie von Krankheiten, Medikamentenüberwachung und toxikologischer Untersuchungen dar (Takahashi et al., 2007). Allerdings gilt ebenso wie für die hESC, dass iPS-Zellen ein erhöhtes Risiko aufweisen, Teratome und Teratokarzinome zu bilden, bedingt durch ihre hohe Proliferationsrate. iPS-Zellen scheinen sogar ein höheres Potential zur Entwicklung von Tumoren aufzuweisen, da herstellungsbedingt mehr chromosomale Abberationen und epigenetische Veränderungen entstehen können (Ben David and Benvenisty, 2011).

2. Zielsetzung der Arbeit

Der Transkriptionsfaktor OCT4 ist maßgeblich für den Erhalt der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen verantwortlich. Mit Beginn der Differenzierung wird die OCT4-Expression herunterreguliert. Dieser Vorgang geht einher mit der Methylierung der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens. Es ist bekannt, dass in pluripotenten embryonalen Stammzellen die regulatorische Region des *OCT4*-Gens unmethyliert ist, in differenzierten Zellen hingegen weitgehend methyliert. In unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC), einer pluripotenten Zellpopulation aus humanem Nabelschnurblut, war der epigenetische Status des *OCT4*-Gens bisher unbekannt.

Mit diesem Hintergrund soll in der vorliegenden Arbeit das DNA-Methylierungsmuster der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens in fünf USSC-Linien untersucht werden hinsichtlich der Frage, ob die pluripotente USSC ein vergleichbares DNA-Methylierungsmuster wie die pluripotente embryonale Stammzelle (ESC) aufweist. Desweiteren soll die OCT4-Expression ausgewählter USSC-Linien auf Transkriptebene (mRNA) und Proteinebene ermittelt und mit der OCT4-Expression in ESC und differenzierten Zellen verglichen werden. Der Methylierungsstatus soll mittels genomischer DNA-Sequenzierung nach Bisulfitkonvertierung erhoben werden. Die Frage nach der OCT4-Expression in USSC soll mit der Durchführung von quantitativer Real-time PCR und Westernblot geklärt werden.

Zusätzlich soll untersucht werden, ob eine in dem regulatorischen Bereich des *OCT4*-Gens entdeckte Punktmutation, die zur Elimination eines CG-Dinukleotids führt, Auswirkungen auf die *OCT4*-Promotoraktivität hat. Dieser Frage soll mittels Promotorreporter-Assay nachgegangen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Produkt	Vertreiber
30% Acrylamide/Bis Solution	Bio-Rad, USA
Agar	Invitrogen™, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich®, Germany
Antikörper α -OCT4 (N-19) Ab: sc-8628, 200 μ l/0,1 ml	Sant Cruz Biotechnology, USA
Antikörper für CD3 und CD56	Beckman Coulter, USA
Antikörper: donkey antigoat IgGHRP: sc2033, 200 μ g/0,1 ml	Cruz Marker™, USA
10 % APS	Bio-Rad, USA
DMEM high Glucose (4,5 g/L Glucose)	Invitrogen™, USA
dNTPs	PeqLab, Germany
EDTA 0,5 M, pH 8,0	Merck Millipore, Germany
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich®, Germany
FCS (Fetal calf serum)	Biochrom©, Germany
Ficoll	Biochrom©, Germany
HotStar Taq® Polymerase	Qiagen®, Germany
IL-2 (Interleukin-2)	Novartis©, Switzerland
IPTG	PeqLab, Germany
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	Gibco®, USA
LB-Medium	Invitrogen™, USA
M-MLV reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	Promega, USA
Oligo dT Primer (0,5 μ g/ μ l)	Promega, USA
PBS	Serag Wiessner, Germany
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen™, USA
Primer	Thermo Scientific, Germany
Protease-Inhibitor-cocktail (PIC)	Complete Roche, Germany
Roti® Load 1,4-fach konzentriert	Carl Roth GmbH, Germany
RT M-MLV-5x Reaktions-Puffer	Promega, USA
10 % SDS	Bio-Rad, USA

Spectra Multicolor Broad Range Protein	Fermentas [®] , Germany
SYBR Green [®] PCR Master Mix	Qiagen [®] , Germany
Taq [®] Polymerase (5 U/μl)	Qiagen [®] , Germany
TEMED	Bio-Rad, USA
Tween 20	Bio-Rad, USA
Tris HCl (Trizma [®] hydrochloride)	Sigma-Aldrich [®] , Germany
1 % Triton X100	Thermo Scientific, Germany
Trypsin/EDTA 1x Lösung	Gibco [®] , USA
X-Gal	Roth, Germany

3.1.2. Geräte

Gerät	Hersteller
ABI PRISM [®] 7700 Sequence Detector	PE Applied Biosystems, USA
Autoklav 3870 EL	Systec GmbH, Germany
Brutschrank IG 150	Jouan, Germany
Elektroporator, Capacitance Extender plus	Bio-Rad, USA
Elektroporator, Gene Pulser II	Bio-Rad, USA
Elektroporator, Pulse Controller plus	Bio-Rad, USA
FACS Technologie	Becton Dickinson, USA
Geldokumentationssystem, Kamera und UVT-28 M	Herolab GmbH, Germany
Gelelektrophoresekammer, GNA 200	Pharmacia Biotech, jetzt GE Healthcare, USA
Heizblock, ThermoStat plus	Eppendorf, Germany
Luminescent Image Analyzer LAS-3000	Fujifilm, Japan
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments, Germany
Mikropipetten	Gilson Inc., USA
Multiplex Bio-Imaging System, FLA-700	Fujifilm, Japan
NanoDrop 1000 Spektralphotometer	Thermo Scientific, Germany
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH + CO KG, Germany
Schüttelinkubator, Schüttelapparate 3005-3020 Modell G25	GFL, Germany
SDS PAGE-Kammer	Spezialanfertigung
Sequenzierer 3730 DNA Analyser	PE Applied Biosystems, USA
Spektrophotometer DU [®] 640	Beckman Coulter, USA
Taumelschüttler, Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH, Germany

Thermocycler für real-time PCR, ABI PRISM®	PE Applied Biosystems, USA
Thermocycler GeneAmpPCR System 9700	Applied Biosystems, USA
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Germany
Zentrifuge Centrifuge Mikro 20	Hettich, Germany
Zentrifuge Galaxy Mini	VWR, Germany
Zentrifuge RL 5B plus, Rotoren SLA-1500 und HB-6	Sorvall™, USA

3.1.3. Materialien

Material	Hersteller
Eppendorf-Reaktionsgefäß	Eppendorf, Germany
Falcontube 50 ml	Becton Dickinson Labware, USA
Hybond-P PVDF Membran	Amersham, GE Healthcare, USA
Kulturflasche 175 m ²	Greiner Bio-One, Germany

3.1.4. Kommerzielle Kits

Kit	Vertreiber
DC Protein Assay	Bio-Rad, USA
ECL Western blotting detection reagent and analysis system	Amerham, GE Healthcare, USA
EpiTect® Bisulfit Kit	Qiagen®, Germany
MACS® FcR blocking reagent	Miltenyi, Germany
MACS® MicroBeads	Miltenyi, Germany
MACS®-Puffer	Miltenyi, Germany
MiniMACS™ Separator	Miltenyi, Germany
NucleoBond® Xtra Maxi Kit	MN, Germany
NucleoSpin® Plasmid Kit	MN, Germany
QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Kit	Qiagen®, Germany
QIAprep® Miniprep Kit	Qiagen®, Germany
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen®, Germany
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen®, Germany
RNase-Free DNase Set	Qiagen®, Germany
RNeasy® Mini Kit	Qiagen®, Germany
TA Cloning® Kit	Invitrogen™, USA

3.1.5. Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde mit folgenden Zelllinien gearbeitet:

USSC

Die USSC wurden von Frau Prof. Kögler (ITZ, Düsseldorf) bereitgestellt. Die Zellen wurden aus humanem Nabelschnurblut nach Einverständniserklärung der Mütter gewonnen. Für die Verwendung von humanem Nabelschnurblut für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lag eine Zustimmung der Ethikkommission vor (Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Studiennummer 2975).

Die Kultivierung erfolgte durch Frau Aurélie Lefort nach dem Protokoll wie in der Veröffentlichung von Kögler et al., 2004, beschrieben. Die weitere Aufarbeitung der Zellen ist in dem Kapitel 3.2.1 beschrieben. Verwendet wurden die fünf USSC-Linien SA4/101, SA4/146, SA5/60, SA5/73 und SA8/25.

Neben nativen USSC-Linien kamen zwei osteodifferenzierte USSC-Linien (USSC SA4/146 osteo und USSC SA5/73 osteo) zum Einsatz. Die Osteodifferenzierung wurde im Labor von Frau Prof. Kögler (ITZ, Düsseldorf) durchgeführt. Der Vorgang der Osteodifferenzierung ist dem Protokoll aus der Veröffentlichung von Kögler et al., 2004, zu entnehmen. Die Osteo-differenzierung wurde durch den Nachweis von knochenspezifischer AP, Osteocalcin, Osteopontin, Knochen-Sialoprotein und Kollagen Typ 1 mittels Real-time PCR bestätigt. Die DNA der osteodifferenzierten USSC wurde mir von Frau Prof. Kögler zur weiteren Verwendung für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

iPS-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendete DNA von iPS-Zellen, bzw. putativen iPS-Zellen wurden in dem Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin in Münster unter der Leitung von Herrn Prof. Schöler hergestellt. Die Generierung der iPS-Zellen aus USSC ist in der Veröffentlichung von Zaehres et al., 2010, beschrieben.

NK-Zellen

In dieser Arbeit wurden sowohl primäre NK-Zellen, isoliert aus frischem, humanem Nabelschnurblut verwendet, als auch die polyklonale Zelllinie NK-92, zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Tonn aus dem DRK-Blutspendedienst Hessen. Die NK-92 wurden in dem Medium IMDM, ergänzt mit 10 % FCS, 2 % humanem Serum und 200 U/ml IL-2 kultiviert.

Die Gewinnung der primären NK-Zellen aus Nabelschnurblut wird in dem Kapitel 3.2.2 beschrieben.

HEK 293 T

Die Kultivierung der HEK 293 T Zellen (human embryonic kidney Zellen) wird in dem nachfolgendem Kapitel 3.2.1 beschrieben. Die HEK 293 T Zellen wurden ursprünglich von ATTC® (American Type Culture Collection, USA) bezogen.

ES I3

Die ES-Zelllinie I3 wurde entsprechend dem Stammzellgesetz (StZG) zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen in dem Labor von Herrn Prof. Brüstle (Institut für rekonstruktive Neurobiologie Bonn) aufbereitet und lediglich die DNA der ES-Zelllinie I3 für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.1.6. Bakterienstamm

Für die Elektroporation wurde der Bakterienstamm E.coli One Shot® TOP10F⁺-Genotyp (Invitrogen™, USA) verwendet:

F'[*lacI*^q Tn10 (Tet^R)] *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur und Isolierung von Zellen

HEK 293T-Zellkultur

Die adhärenent wachsenden HEK 293 T Zellen (human embryonic kidney Zellen) wurden in 175 cm²-Kulturflaschen kultiviert. Es wurden 3-4 Mio Zellen pro Kulturflasche in 20-25 ml Kulturmedium bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Kulturmedium HEK 293T-Zellen:

DMEM high Glucose (4,5 g/L Glucose) 500 ml

2mM L-Glutamin

10 % (v/v) FCS

100 U/ml Penicillin

100 µg Streptomycin

Isolierung von USSC

Die adhärenenten USSC wurden bis zu einer Zellzahl von ca. zwei Millionen kultiviert. Dazu waren sechs bis maximal sieben Passagen nötig. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Zum Lösen der adhärenenten Zellen wurden sie mit Trypsin behandelt und für 7 min bei 37°C inkubiert. Die gelösten Zellen wurden in Kulturmedium für USSC aufgenommen und die Suspension bei 1900 rpm für 7 min RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und bei 1900 rpm für 7 min RT zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in 200 µl PBS aufgenommen. Die Zellen wurden direkt zur DNA- oder RNA-Isolierung weiterverwendet oder bei -80°C eingefroren.

Kulturmedium für USSC:

500 ml DMEM

30 % (v/v) FBS, hitzeinaktiviert

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 µg Streptomycin

3.2.2. Isolierung von NK-Zellen

Die NK-Zellen (CD56⁺-Zellen) wurden aus frischem, humanem Nabelschnurblut isoliert. Um die gewünschte Zellpopulation zu erhalten, wurden zunächst alle mononukleären Zellen (MNC) von

den restlichen Bestandteilen des Blutes mittels Dichtegradientenzentrifugation unter Einsatz der Trennlösung Ficoll voneinander getrennt.

Isolierung von mononukleären Zellen (MNC)

Zunächst wurde das Nabelschnurblut mit auf Zimmertemperatur angewärmten PBS/EDTA (PBS mit 2 mM EDTA) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Je 30 ml der Suspension wurde in einem 50 ml Falcontube auf 15 ml Ficoll geschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 2000 rpm für 35 min bei RT. Nach der Zentrifugation wurde der Interphasering zwischen Plasma und Trennlösung, der die MNC enthielt, abpipettiert, in ein Falcontube überführt und mit 4°C kaltem PBS aufgefüllt.

Isolierung von CD56⁺-Zellen aus MNC

Aus den geernteten MNC wurden anschließend die NK-Zellen mit Hilfe paramagnetischer Microbeads unter Verwendung der MACS™ -Technologie (Miltenyi) separiert. Das Prinzip beruht auf der Markierung der zu isolierenden Zellen mit paramagnetischen Microbeads, die mit Antikörpern gegen zellspezifische Rezeptoren gekoppelt sind, und anschließender Separierung mit Hilfe eines starken magnetischen Felds. Dazu wurde die Zellsuspension zunächst für 7 min bei 1900 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml PBS/EDTA resuspendiert. Um die im MNC verbliebenen Erythrozyten zu lysieren wurde die Suspension mit 20 ml Ammoniumchlorid bei 4°C gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde die Lösung bei 1900 rpm und bei 4°C für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml PBS/EDTA resuspendiert und unter den zuvor genannten Bedingungen erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml PBS/EDTA + 5 % FCS aufgenommen. 300 µl der Zellsuspension wurden zur Bestimmung der Zellzahl entnommen. Die Zellsuspension wurde erneut unter den zuletzt genannten Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde mit je 150 µl MACS®-Puffer pro 10⁸ Zellen resuspendiert. Im Anschluss wurde 50 µl MACS® *FcR blocking reagent* pro 10⁸ Zellen hinzugefügt. Zu dieser Zellsuspension wurden 50 µl CD56 MACS® MicroBeads zur Isolierung der NK-Zellen (CD56⁺-Zellen) gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurde die Suspension mit dem 10 fachen Volumen PBS/EDTA gewaschen und für 7 min bei 1900 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in MACS® Puffer resuspendiert und auf eine zuvor mit MACS Puffer äquilibrierte LS-Säule gegeben und einem magnetischen Feld ausgesetzt. Dadurch bleiben die paramagnetisch markierten Zellen in der Matrix der Säule hängen und werden somit von den übrigen Zellen separiert. Nach Entfernen des magnetischen Feldes wurden die CD56⁺-Zellen mit 5 ml MACS® Puffer eluiert.

CD3-Depletion

Die CD3-Depletion dient zur Befreiung der CD56⁺-Zielzellpopulation von CD56⁺CD3⁺-doppelpositiven Zellen, sogenannten NKT-Zellen, vor der CD56⁺-Anreicherung. Dazu wurden 20 µl CD3 MACS[®] MicroBeads pro 10⁷ Zellen hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde auf eine MACS[®] Säule gegeben, einem magnetischen Feld ausgesetzt und mit 1 ml PBS/EDTA gewaschen. Die durchgeflossenen reinen CD56⁺-Zellen ohne die CD56⁺CD3⁺-doppelpositiven Zellen wurden aufgefangen und gewaschen.

Im Anschluss wurden die isolierten CD56⁺-Zellen mittels Durchflusszytometrie auf ihre Reinheit analysiert. Es wurden spezifische Antikörper für CD3 und CD56 verwendet.

3.3. Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.3.1. DNA-Aufreinigung aus Zellen

Zur Isolierung von DNA aus Blutzellen wurde das QIAamp[®] DNA Mini and Blood Mini Kit verwendet. Es wurde nach Angaben des Herstellers Qiagen[®] verfahren. Um RNA-freie DNA zu gewinnen, wurden 200 µg RNase A *stock solution* zu Beginn der Aufreinigung verwendet. Die DNA wurde zum Schluss in 100 µl Pufferlösung (AE buffer) aufgenommen. Die DNA-Konzentration (ng/µl) wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm am NanoDrop 1000 Spektralphotometer gemessen. Eine weitere Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde angeschlossen, um die Verunreinigung der DNA-Probe mit Proteinen zu bestimmen. Aus dem Quotienten 260/280 nm wurde der Reinheitsgrad der Probe ermittelt. Die Werte sollten zwischen 1,8 bis 2,0 (absolute Reinheit 2,0) liegen. Nicht unmittelbar weiterverwendete DNA wurde bei -70°C aufbewahrt.

3.3.2. RNA-Aufreinigung aus Zellen

Die RNA-Isolierung aus den Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy[®] Mini Kits (Qiagen[®]) durchgeführt. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Der optionale DNase-Verdau wurde zum Vermeiden von Verunreinigung durch DNA durchgeführt. Dazu wurde das RNase-Free DNase Set (Qiagen[®]) verwendet. Der DNase-Verdau erfolgte vor der Aufreinigung. Die Menge der RNA (ng/µl) wurde photometrisch mit dem NanoDrop 1000 Spektralphotometer bei 260 nm gemessen (siehe Kapitel 3.3.1). Die RNA wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -70°C eingefroren.

3.3.3. Weitere Aufreinigungsmethoden von Nukleinsäuren

Die Plasmid-DNA wurde mittels Minipräparation unter Benutzung des QIAprep® Miniprep Kits (Qiagen®, Germany) oder des NucleoSpin® Plasmid Kits (MN, Germany) isoliert. Es wurde nach Angaben der Hersteller verfahren.

Wenn große Mengen, d.h. mehr als 500 µg Plasmid-DNA isoliert werden sollte, wurde das NucleoBond® Xtra Maxi Kit (MN, Germany) verwendet. Die Maxipräparation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Um DNA aus einem Agarosegel zu isolieren, wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen®, Germany) benutzt und gemäß Herstellerangaben vorgegangen.

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen®, Germany) benutzt und nach Angaben des Herstellers verfahren.

Phenol/Chloroformfällung

Alternativ wurden PCR-Produkte mittels Phenol/Chloroformfällung aufgereinigt. Dazu wurde zum Probenvolumen 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und gemischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei Raumtemperatur und 13.000 min^{-1} zur Phasentrennung. Die Oberphase, d. h. die wässrige Phase mit der DNA wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. 1/20 Volumen NaCl und drei Volumen kaltem EtOH abs. wurden hinzugefügt und gemischt. Es folgte eine ca. 10-minütige Inkubation bei -20°C , bis die ausgefällte DNA in Form von Flocken sichtbar wurde. Anschließend wurde eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und RT durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet das die DNA enthält wurde mit drei Volumen kaltem EtOH 70 % gewaschen und für 5 min 13.000 rpm RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit der DNA bei 68°C für 1-2 min bei offenem Deckel getrocknet. Zum Schluss wurde die DNA in 20 µl 1x TE-Puffer und bei 68°C für 5 min gelöst.

Nach der Aufreinigung wurde die Menge der DNA (ng/µl) wurde mittels photometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (siehe Kapitel 3.3.1). Die gewonnene DNA wurde direkt weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

1xTE-Puffer:

10 mM Tris HCl (pH 7,5)

1 mM EDTA (pH 8,0)

3.4. Analyse des DNA-Methylierungsstatus

Zur Ermittlung des DNA-Methylierungsstatus des ausgewählten Bereichs innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens muss zwischen methyliertem und unmethyliertem Cytosin unterschieden werden können. Dazu wurde mit Sodiumbisulfit konvertierte DNA eingesetzt (Bisulfitkonvertierung) und anschließend der Methylierungsstatus mittels genomischer DNA-Sequenzierung erhoben.

3.4.1. Bisulfitkonvertierung

Die Bisulfitkonvertierung ist eine von Frommer et al. (1992) erstmals beschriebene Methode zur Analyse des Methylierungsstatus der DNA. Es handelt sich bei der Bisulfitkonvertierung um eine chemische Behandlung der DNA mit Natrium-Bisulfit. Natrium-Bisulfit konvertiert unmethyliertes Cytosin durch Desaminierung in Uracil, wohingegen methyliertes Cytosin nur schwach mit Bisulfit reagiert und unverändert bleibt (Abb. 3).

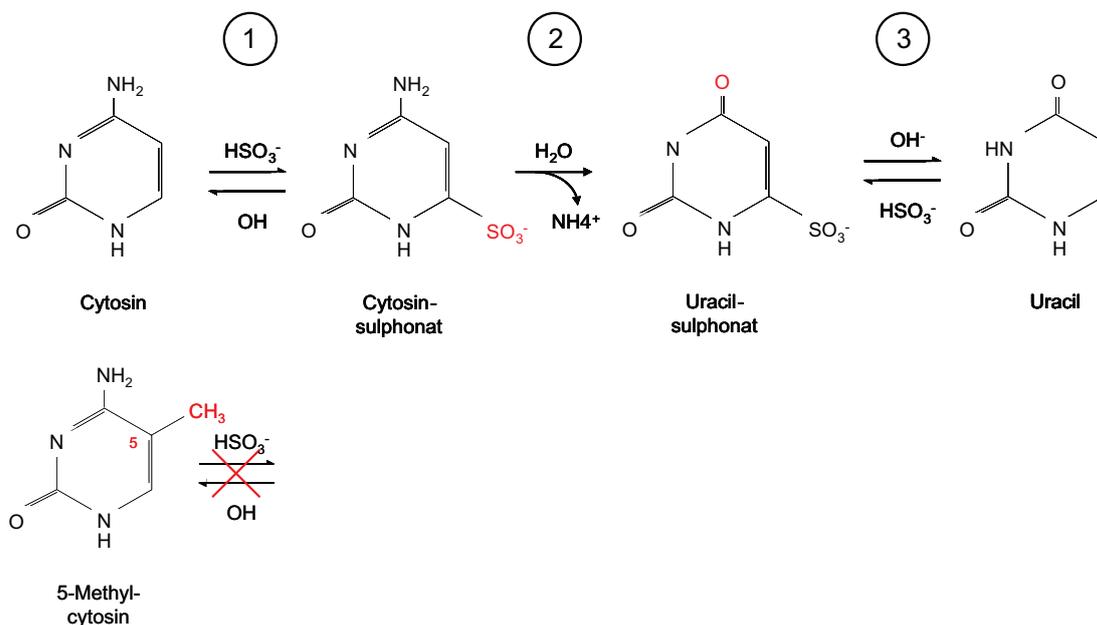


Abb. 3 Schrittweise Darstellung der Bisulfitkonvertierung.

Schritt 1: Sulfonierung (HSO_3^- : Hydrogenbisulfit), Schritt 2: Hydrolytische Desaminierung, Schritt 3: Alkali-Desulfonierung. 5-Methylcytosin wird durch die Behandlung mit Hydrogenbisulfit nicht verändert.

Nach Amplifizierung der konvertierten DNA mittels PCR und anschließender Sequenzierung kann im Vergleich von konvertierter und unkonvertierter Originalsequenz der Methylierungsstatus erhoben werden, indem sich unmethylierte Cytosine detektieren lassen: unmethyliertes Cytosin in der unkonvertierten Sequenz entspricht dann Thymin in der konvertierten Sequenz, wohingegen methyliertes Cytosin in der unkonvertierten Sequenz unverändert Cytosin in der konvertierten Sequenz entspricht (Abb. 4).

	Originalsequenz	Nach Bisulfitkonvertierung
Unmethylierte DNA	5'-N-C-G-N-C-G-N-C-G-N-3'	5'-N-U-G-N-U-G-N-U-G-N-3'
Methylierte DNA	5'-N-C-G-N-C-G-N-C-G-N-3'	5'-N-C-G-N-C-G-N-C-G-N-3'

Abb. 4 Prinzip der Erhebung des DNA-Methylierungsstatus.

Der DNA-Methylierungsstatus wird anhand des Vergleichs der Originalsequenz mit der DNA-Sequenz nach Bisulfitkonvertierung erhoben. **C** steht für 5-Methylcytosin, **N** steht für jede beliebige Base. Die Inkubation der DNA mit Bisulfit führt zur Umwandlung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil. Methyliertes Cytosin hingegen bleibt unverändert. Nach Amplifizierung der mit Bisulfit behandelten DNA entspricht unmethyliertes Cytosin in der unkonvertierten Sequenz Thymin in der konvertierten Sequenz. Methyliertes Cytosin in der unkonvertierten Sequenz entspricht unverändert Cytosin in der konvertierten Sequenz.

Zur Durchführung der Bisulfitkonvertierung wurde das EpiTect® Bisulfit Kit von Qiagen® verwendet. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Eingesetzt wurden 500 ng bis 1 µg DNA, 85 µl Bisulfit Mix, 15 µl DNA Protect Buffer und RNase-freies Wasser ad 140 µl Gesamtvolumen. Die DNA-Konvertierung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Temp [°C]	Zeit[min]
Denaturierung	95	5
Inkubation	60	25
Denaturierung	95	5
Inkubation	60	85
Denaturierung	95	5
Inkubation	60	175
Hold	20	∞

3.4.2. DNA-Methylierungsanalyse mittels genomischer Sequenzierung

Zur Untersuchung des DNA-Methylierungsstatus des ausgewählten Bereichs innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens wurde bisulfitkonvertierte DNA mittels PCR amplifiziert. Entsprechende Primer, die an bisulfitkonvertierte DNA binden, wurden konzipiert. Der Primer *s1Oct4konvPr* bindet innerhalb des *OCT4*-Minimalpromotors, der Primer *as1Oct4konvPr* bindet innerhalb des Exon 1 des *OCT4*-Gens (siehe auch Abb. 12 B und C).

Primer:

Primername	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Genlage	Länge PCR-Produkt [bp]
s1Oct4konvPr	gag gga gag agg ggt tga gta	57,6	<i>OCT4</i> Minimalpromotor	469
as1Oct4konvPr	act cca act tct cct tct cca act tc	56,6	<i>OCT4</i> Exon 1	

PCR-Ansatz:

2,0 µl bisulfitkonvertierte DNA (≈100 -200 ng DNA)

1,0 µl sense Primer (10 pmol/µl)

1,0 µl antisense Primer (10 pmol/µl)

0,5 µl dNTPs (10 mM)

2,5 µl 10x Puffer

0,2 µl HotStar Taq[®] Polymerase (5 U/µl)

H₂O ad 25 µl

Die PCR wurde unter den nachstehenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Temp [°C]	Zeit [min:sec]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	12:00	1
Denaturierung	95	0:30	35
Annealing	58	0:30	
Elongation	72	0:35	
Endelongation	72	7:00	1
Hold	4	∞	n/a

Die amplifizierte DNA wurde auf einem 1 %-igem Agarosegel (100 ml TBE, 1 g Agarose, 3 µl Ethidiumbromid) aufgetragen und nach Gelelektrophorese mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen[®], Germany) aufgereinigt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente in den pCR[®]2.1

Vektor (Invitrogen™, USA) unter Verwendung des TA Cloning® Kits (Invitrogen™, USA) kloniert.

TA-Klonierung:

Bei der TA-Klonierung handelt es sich um eine Klonierungsmethode, bei der keine Restriktionsenzyme eingesetzt werden. Der linearisierte pCR®2.1 (Abb. 5) Vektor besitzt 3'-Thymin-Überhänge, während die Taq-Polymerase vorzugsweise 3'-Adenin-Überhänge produziert. Somit können Vektor und Insert (PCR-Produkt) über die komplementären Basen Thymin und Adenin hybridisieren und mit Hilfe der Ligase ligiert werden (Abb. 6).

Die TA-Klonierung wurde wie folgt durchgeführt:

2,0 µl pCR®2.1 Vektor (25 ng/µl)

6,0 µl frisches PCR-Produkt

1,0 µl 10x Ligationspuffer

1,0 µl T4 DNA-Ligase (4 U/µl)

Der Reaktionsansatz wurde bei 14°C über Nacht inkubiert.

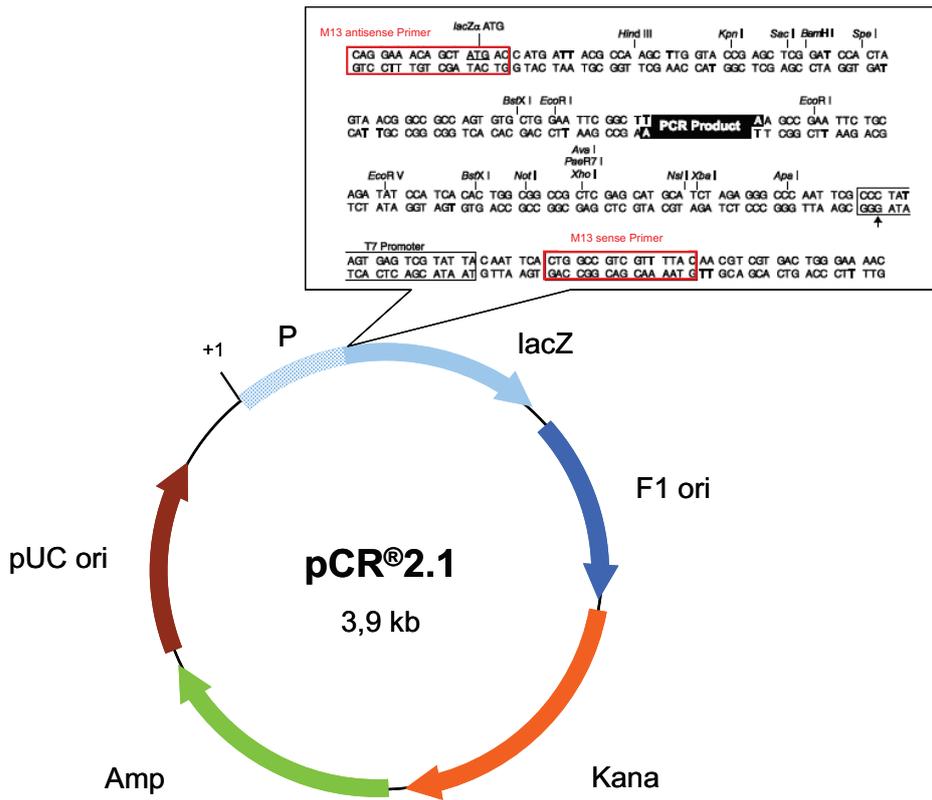


Abb. 5 Übersichtskarte des Vektors pCR™2.1

P und *lacZ*: *lac*-Promotor und *lacZ*-Gen, das für die β -Galactosidase kodiert; *F1 ori*: Phage *f1* origin of replication; *Amp*: Ampicillin-Resistenzgen, *Kana*: Kanamycin-Resistenzgen, *pUC ori*: origin of replication des high-copy-number plasmid *pUC* (modifiziert nach Invitrogen™).

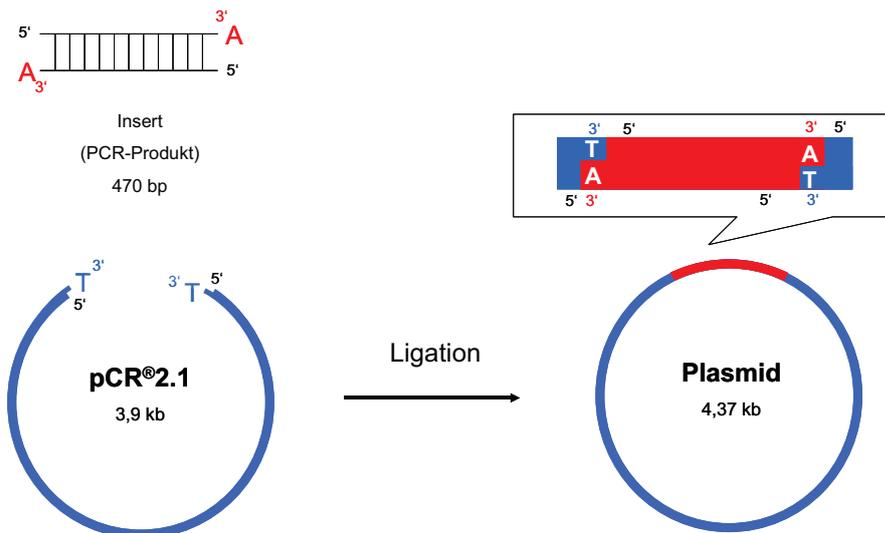


Abb. 6 Schematische Darstellung der TA-Klonierung.

Das PCR-Produkt besitzt 3'-Deoxyadenosin (A)-Überhänge, der linearisierte Vektor hingegen 3'-Deoxythymidin (T)-Überhänge, so dass das PCR-Produkt (in diesem Fall ein Produkt von 470 bp Länge) in den Vektor ligieren kann.

2 µl des Ligationsansatzes wurden für die Transformation in chemisch kompetente E.coli Bakterien verwendet. Die Transformation wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. 150 µl der transformierten Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten (20 g/l LB-Medium, 12 g/l Agar) mit Ampicillin (100 mg/ml), die zuvor mit 40 µl X-Gal (20 mg/ml) und 40 µl IPTG (100 mM) behandelt wurde, ausgestrichen. Die mit der Bakteriensuspension ausgestrichenen Agar-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Der pCR™2.1 Vektor enthält in der multiplen Klonierstelle ein LacZ-Gen, das lediglich für den aminoterminalen Teil des Enzyms β-Galaktosidase, welches Laktose in Glucose und Galactose spalten kann, kodiert. Der verwendete Bakterienstamm besitzt ein LacZ-Gen, das nur für den carboxyterminalen Teil der β-Galaktosidase kodiert. Wird der rezirkularisierte Vektor (d.h. der Vektor enthält kein Insert) in die Bakterien transformiert, kann eine funktionstüchtige β-Galaktosidase gebildet werden (α-Komplementation). X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid) dient als Substrat der β-Galaktosidase, dessen Spaltung eine blaue Färbung der Kolonien hervorruft. IPTG (Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranosid) wirkt als Induktor der β-Galaktosidase.

Wird nun ein Insert in die multiple Klonierseite des LacZ-Gens des Vektors eingefügt, wird das Leseraster des Gens gestört und die Synthese einer funktionstüchtigen β-Galaktosidase unterbunden. Es entstehen farblose Kolonien als Zeichen dafür, dass das Insert in den Vektor ligiert hat (Schrödel, 2010). Die Blau-Weiß-Selektion ist somit ein Nachweisverfahren zur Unterscheidung von Klonen, die einen Vektor mit Insert enthalten von solchen, die lediglich den Vektor ohne Insert enthalten.

Mittels Colony-PCR wurde verifiziert, dass das richtige Insert in den Vektor ligiert wurde. Dazu wurde je eine farblose Bakterienkolonie gepickt, in ein mit 10 µl Aqua dest gefülltes 96-PCR-well und anschließend in eine 96-well-Kulturplatte überführt. Jedes well war gefüllt mit 300 µl LB-Medium (20 g/l) und Ampicillin (100 mg/l). Zu dem Bakterienlysat in der PCR-well-Platte wurden die restlichen Komponenten der Colony-PCR gegeben. Die 96-well-Kulturplatte mit dem Bakterienlysat wurde im Schüttelinkubator bei 125 rpm für 12 h inkubiert.

Colony-PCR:

10,0 µl Bakterien-Lysat

1,0 µl M13 Forward Primer (10 mM)

1,0 µl M13 Reverse Primer (10 mM)

1,0 µl dNTPs (10 mM)

2,5 µl 10x Puffer

0,3 µl Taq® Polymerase (5 U/µl)

H₂O ad 25 µl

PCR-Programm:

Schritt	Temp [°C]	Zeit [min:sec]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5:00	1
Denaturierung	95	0:30	30
Annealing	60	0:30	
Elongation	72	0:35	
Endelongation	72	7:00	1
Hold	4	∞	n/a

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt. Die M13 Forward- und M13 Reverse-Primer sind spezifische Primer, die innerhalb des Vektors pCR™ 2.1 binden. Sie flankieren die Stelle, an der das PCR-Produkt in den Vektor ligiert wird (siehe Abb. 5). Anhand der Größe des PCR-Produkts auf dem Agarosegel lässt sich feststellen, ob das gewünschte PCR-Produkt in den Vektor ligiert wurde: ein PCR-Produkt mit der Größe von 190 bp bedeutet, dass in dem entsprechenden Vektor kein Insert ligiert ist. Dagegen weist ein PCR-Produkt der Größe 660 bp darauf hin, dass in dem entsprechenden Vektor das gewünschte Insert ligiert ist.

Nach Erhalt des Ergebnisses der Colony-PCR wurden jeweils die Bakterienlysate aus der 96-well-Kulturplatte mit den entsprechend positiven Klonen ausgewählt um die Plasmid DNA aufzureinigen. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits aufgereinigt. Anschließend wurden die aufgereinigten Proben für die DNA-Sequenzierung vorbereitet:

1,0 µl Plasmid-DNA

1,0 µl Big Dye Puffer

1,0 µl M13 antisense Primer (10 mM)

5,0 µl Aqua dest.

Programm:

Schritt	Temp [°C]	Zeit [min:sec]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	1:00	1
Denaturierung	95	0:10	25
Annealing	T _m	3:00	
Hold	10	∞	

Die genomische Sequenzierung wurde von dem HLA-Labor übernommen. Verfahren wurde nach der Didesoxymethode nach Sanger.

Die Sequenzen wurden mit dem Programm Chromas (Version 2.23, Technelysium Pty Ltd) ausgewertet.

Durch Vergleich mit der unkonvertierten Originalsequenz *POU5F1, transcript variant 1, mRNA* (Accession Nummer NM_002701) wurden methylierte von unmethylierten Cytosinen unterschieden.

Die Sequenz, die der Analyse zugrunde lag, anhand derer die Lage der CpGs ermittelt und die Primer entworfen wurden, ist unter der Accesssion Nummer NT_113891.2 zu finden.

3.5. RNA-Nachweis

3.5.1. Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Zum Nachweis des *OCT4*-Transkripts auf RNA-Ebene, wurde zunächst isolierte RNA mit der viralen Transkriptase aus *Molony Murine Leukemia Virus (M-MLV)* in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Zugrunde lag nachstehendes Protokoll:

0,5 µg-1 µg RNA

1 µl Oligo dT Primer (0,5 µg/µl)

RNase freies Wasser ad 15µl

Alle Reagenzien wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und bei 70°C für 5 min inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzuschmelzen. Nach der Inkubation wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

5,0 µl RT M-MLV-5x Reaktions-Puffer

1,25 µl dNTPs (10 mM)

0,63 µl RNasin (40 U/µl)

1,0 µl M-MLV reverse Transkriptase (200 U/µl)

Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 42°C für 1 h inkubiert. Die gewonne cDNA wurde direkt weiterverwendet oder bei -80°C eingefroren.

3.5.2. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative RT-PCR ist eine Methode, die zur Amplifizierung von DNA dient. Im Gegensatz zur PCR erlaubt sie zusätzlich eine Aussage über die Quantität der vervielfältigten DNA. Dies ist möglich durch den Einsatz interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe, hier SYBR Green®. Mit zunehmender DNA-Menge steigt auch die Fluoreszenz an, die im Thermocycler für real-time PCR gemessen wird.

Zum Nachweis von OCT4 auf Transkriptionsebene verschiedener USSC-Linien im Vergleich zu ES- und NK-Zellen, wurde zuvor cDNA aus der jeweiligen RNA wie zuvor beschrieben hergestellt. Als Referenzgen zur Bestimmung der relativen DNA-Menge dient *β-Actin*. Verwendet wurden die nachstehenden Primer, die mit Hilfe des Programms Oligo® konzipiert wurden:

Normierungsprimer:

Primername	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Genlage	Länge PCR-Produkt [bp]
sβAktin cDNA	act ggg acg aca tgg aga aaa t	56	Exon 2 βAktin	189
asβAktin cDNA	ata gca cag cct gga tag caa c	56	Exon 3 βAktin	

OCT4-Transkript-Primer:

Primername	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Genlage	Länge PCR-Produkt [bp]
s1Oct4 63°C	atg ccc ccc gcc gta tga gtt c	64,5	Exon 1 <i>OCT4</i>	188
as1Oct4 63°C	cca gct tca cgg cac cag ggg t	65,8	Exon 1 <i>OCT4</i>	

Folgende Reagenzien wurden in eine 96-well-Platte pipettiert:

2 µl cDNA (40 ng)

0,5 µl sense Primer (10 pMol/µl)

0,5 µl antisense Primer (10 pMol/µl)

7,0 µl SYBR Green® PCR Master Mix

Die qRT-PCR erfolgte nach folgendem Programm im Thermocycler für qRT-PCR:

Schritt	Temp °C	Zeit min	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10:00	1
Denaturierung	95	0:15	40
Annealing	T _m	0:25	
Elongation	72	0:30	

Anschließend wurden mit der Thermocycle-Software die Ct-Werte ermittelt. Der Expressionsunterschied wurde mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode nach Pfaffl berechnet, als Kontrollprobe diente die ES-Zell-Probe. Zur Normalisierung wurde das *Housekeeping Gen β -Aktin* herangezogen.

$$\Delta\text{CT} = \text{CT Zielgen} - \text{CT Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT Behandlung} - \Delta\text{CT Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

CT: *cycle threshold* beschreibt den Punkt, an dem die gemessene Fluoreszenz erstmals exponentiell ist.

Zielgen: *OCT4* (definiert durch die methylspezifischen Primer)

Referenzgen: *Housekeeping Gen β -Aktin* (definiert durch die Kontrollprimer)

Behandlung: zu untersuchende Zelllinie

Kontrolle: ES I3

3.6. Proteinnachweis mittels Westernblot

3.6.1. Proteinisolierung

Um eine OCT4-Expression in USSC auf Proteinebene nachzuweisen, wurde ein Westernblot durchgeführt. Zunächst wurden alle Proteine aus der zu untersuchenden Zelllinie isoliert. Aus den Zelllinien USSC SA4/146, SA5/73, SA4/101, SA5/60 und der Zelllinie NK-92 wurden die Proteine isoliert. Die Zellen befanden sich in Kultur in einer Zellkulturplatte. Das Kulturmedium wurde abpipetiert, die Zellen mit PBS gewaschen und trypsiniert. Nach Abstoppen der Reaktion mit dem Kulturmedium wurde die Zellsuspension abpipettiert, in Röhrchen überführt und bei 1.900 min^{-1} und 4°C für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in $100 \mu\text{l}$ Lysispuffer pro $3\text{-}4 \times 10^6$ Zellen aufgenommen.

Lysispuffer:

50 mM Tris HCl

150 mM NaCl

1 % Triton X100 pH 8,0

Protease-Inhibitor-cocktail (PIC) 1 Tablette in 25 ml

Die gesamte Suspension wurde 2,5 h bei 4°C rotiert. Anschließend wurde die Suspension bei 12.000 min⁻¹ und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand mit den isolierten Proteinen wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß zur weiteren Verwendung überführt.

3.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der isolierten Proteine wurde mit dem DC Protein Assay von Bio-Rad bestimmt. Die Methode beruht auf der Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry, 1951). Es wurde 20 µl der Reagenz S zu je 1 ml Reagenz A hinzugegeben (= Arbeitsreagenz A'). Eine Verdünnungsreihe für das Standardprotein BSA (bovine serum albumine/Rinderserumalbumin) von 2,0 µg/µl bis 0,125 µg/µl wurde angefertigt. Für die aus den Zellen gewonnen Proteine wurden zwei Verdünnungen angesetzt: eine 1:5 und eine 1:10 Verdünnung. Je 5 µl der Verdünnungen wurde mit 25 µl der Arbeitsreagenz A' vermischt. Zum Schluss wurde zu jeder Lösung 200 µl Reagenz B hinzugefügt und 5 sec gemischt. Nach 15 min wurde die Absorption bei 750 nm in einem Spektrophotometer gemessen. Eine Eichkurve für das Standardprotein BSA wurde erstellt.

3.6.3. Westernblot

Der Westernblot wurde eingesetzt, um die Expression von OCT4 auf Proteinebene mit Hilfe von Antikörpern nachzuweisen. Dazu wurden die aus den Zellen extrahierten Proteine aufgetrennt und auf eine spezielle Membran übertragen, um das entsprechende Protein, OCT4, mit Hilfe von Antikörpern sichtbar zu machen.

Um die Proteine mittels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*SDS-PAGE*) aufzutrennen, wurde zunächst ein Trenngel gegossen.

Trenngel (10 %):

4,9 ml H₂O

2,5 ml 40 % Bis/Acrylamid

2,5 ml 1,5 M Tris-HCL pH 8,8

100,0 µl 10 % SDS

50,0 µl 10 % APS

5,0 µl TEMED

Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit ca. 1 ml Isopropanol zum Glätten des Gels beschichtet. Nach Polymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol abgenommen und das Sammelgel vorbereitet.

Sammelgel (4 %):

6,4 ml H₂O

1,0 ml 40 % Bis/Acrylamid

2,5 ml 0,5 M Tris-HCL pH 6,8

100,0 µl 10 % SDS

50,0 µl 10 % APS

10,0 µl TEMED

Das Sammelgel wurde auf das Trenngel geschichtet und mit einem Probenkamm versehen. Während das Gel aushärtete, wurden die Proteine vorbereitet. Pro Probe wurden 10 µg Protein verwendet und 1/3 des Volumens Ladepuffer (Roti® Load 1,4-fach konzentriert) hinzugefügt. Das Proteingemisch wurde 5 min bei 95°C gekocht. Anschließend wurde der Laufpuffer angesetzt.

Laufpuffer (4x):

12,134 g Tris Base

57,6 g Glycin

4,05 g SDS

H₂O ad 1 l

Nach Entfernen des Probenkamms wurde die Laufkammer mit auf 1x verdünntem Laufpuffer gefüllt und das Gel bzw. die Gele bei 20 mA pro Gel einige Minuten vorlaufen gelassen. Anschließend wurden die Proteine und ein Marker (Spectra Multicolor Broad Range Protein) elektrophoretisch bei 20-25 mA pro Gel für ca. 2,5 h aufgetrennt.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die Proteine geblottet, d. h. auf eine spezielle Membran aus Polyvinylidenfluorid übertragen. Dazu wurde zunächst Blottingpuffer hergestellt.

Blottingpuffer (1x):

20 ml Methanol

10 ml 10x Westernblot Lösung (s.u.)

H₂O ad 100 ml

Western Blot Lösung (10x):

30,285 g Tris base

142,5 g Glycin

H₂O ad 1 l

Eine Hybond-P PVDF Membran wurde auf die Größe des Gels zurecht geschnitten, ebenso 6 Blätter Whatmanpapier. Die Membran wurde zunächst für 10 sec in Methanol angefeuchtet und anschließend in den Blottingpuffer überführt. Die Whatmanpapiere wurden ebenfalls in Blottingpuffer angefeuchtet. Die Membran wurde mit destilliertem Wasser gewaschen, anschließend zusammen mit dem Gel zwischen je 3 Blätter Whatmanpapier gelegt und alles zusammen in eine Elektrobloottingkammer überführt. Geblottet wurde bei 2,5 mA pro cm² Membranfläche für 1 h. Nach dem Blot wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Blockingsolution inkubiert zur Blockierung freier Bindungsstellen.

Blockingsolution:

PBS + 0,1 % Tween 20 (PBS-T)

5,0 % Milchpulver (proteasefrei)

Nach dem Waschen der Membran in PBS-T für 5 min erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper. Als primärer Antikörper zum Detektieren des OCT4-Proteins wurde α -Oct-3/4 (N-19) Ab: sc-8628, 200 μ l/0,1 ml (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, USA) benutzt (anti-OCT4-Antikörper). Der anti-OCT4-Antikörper wurde in einer 1:1.000-Verdünnung in PBS-T verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubation mit dem anti-OCT4-Antikörper und zweimaligem Waschen mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Der sekundäre Antikörper bindet an den primären Antikörper und dient als Signalverstärkung. Er ist mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP= horseradish peroxidase) gekoppelt, der Luminol oxidiert, so dass eine

Luminisenz gemessen werden kann. Verwendet wurde folgender sekundärer Antikörper: donkey anti-goat IgGHRP: sc2033, 200 µg/0,1 ml (Cruz Marker™)

Der Antikörper wurde in einer 1:2.000 Verdünnung in PBS-T verwendet. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte ebenfalls für 1 h. Anschließend wurde ein Waschschrift mit dreimaliges Waschen für 10 min mit PBS-T durchgeführt.

Zur Detektion wurde das *ECL Western blotting reagent and analysis system* (Amerham, GE Healthcare, USA) verwendet. Äquivalente Volumina der *detection solution 1* und *detection solution 2* wurden gemischt und die Membran komplett mit der Mischung bedeckt und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran fotografiert.

Westernblot mit Blockingpeptid

Der Einsatz des Blockingpeptids diente dem Nachweis, dass es sich um eine spezifische Bindung des Antikörpers an das nachzuweisende Protein OCT4, handelt. Eine unspezifische Bindung des primären Antikörpers sollte somit ausgeschlossen werden.

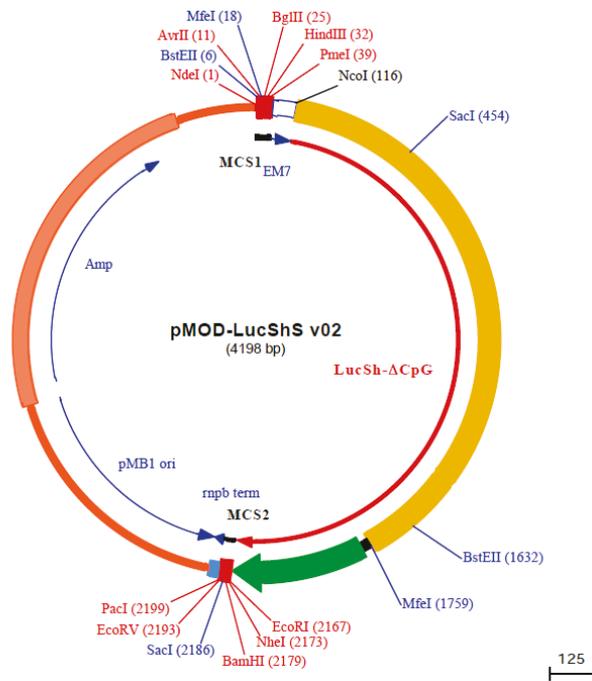
Dazu wurde der anti-OCT4-Antikörper mit einem entsprechenden Blockingpeptid im Überschuss inkubiert, dessen Sequenz deckungsgleich ist mit der, die von dem anti-OCT4-Antikörper erkannt wird. Dadurch wird das Blockingpeptid an den anti-OCT4-Antikörper gebunden, sodass die beiden Bindungsstellen belegt sind. Somit kann der mit dem Blockingpeptid gebundene Antikörper nicht mehr an die Entsprechende Aminosäure Sequenz des OCT4 Proteins auf der Membran binden.

Für die Durchführung des Westernblot mit dem Blockingpeptid wurde der anti-OCT4-Antikörper mit dem Blockingpeptid sc-8628 P (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, USA) im Verhältnis 1:2 (14 µg primärer Antikörper : 30 µg Blockingpeptid) in 10 ml PBS-T vorinkubiert. Die Antikörper-Blockinpeptid-Lösung wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit der Antikörper-Blockinpeptid-Lösung für 1 h inkubiert. Die weitere Durchführung des Westernblots erfolgte wie im vorherigen Absatz beschrieben.

3.7. Promotoranalyse

3.7.1. Klonierung des OCT4-Minimalpromotors

Für die Promotoraktivitätsmessungen wurde als Reporter gen das Luciferase-Gen verwendet. Als Vektor der das Reporter gen Luciferase beinhaltet, wurde der Vektor pMOD-LucShS v02 gewählt. Der Vektor pMOD-LucShS v02 ist 4198 bp groß und enthält ein synthetisches Fusionsgen aus dem Firefly-Luciferasegen und dem Zeocin-Resistenzgen (*sh ble*). Das Gen *sh ble* (*Streptoalloteichus hindustanus bleomycin Gen*) überträgt eine Resistenz gegen die Antibiotika Phleomycin und Zeocin. Beide Gene, das *sh ble* Gen und das Firefly-Luciferasegen, sind so modifiziert, dass alle CpGs entfernt wurden, ohne die Primärstruktur der kodierten Proteine zu verändern. Die Abb. 7 stellt schematisch den Vektor pMOD-LucShS v02 dar.



MCS1

AvrII (11) PmeI (39)
NdeI (1)BstEII (6) MfeI (18) BglIII (25) HindIII (32)
1 CATATGGTGACCTAGGACAATTGTAGATCTTAAGCTTAGTTTAAACAGTAG **51**

Abb. 7 Übersichtskarte des Vektors pMOD-lucShS v02

LucSh-ΔCpG: synthetisches *LucSh* Fusionsgen. Das Fusionsgen besteht aus dem firefly Luciferasegen (gelber Abschnitt) und dem Zeocin-Resistenzgen (grüner Pfeil). *MCS1*: Multiple Klonierstelle 1, enthält die Restriktionsschnittstellen *NdeI*, *AvrII*, *BglIII*, *HindIII*, *PmeI*. Die 51 bp lange *MCS1*-Sequenz ist unterhalb des Vektors aufgeführt. *MCS2*: Multiple Klonierstelle 2, enthält die Restriktionsschnittstellen *EcoRI*, *NheI*, *BamHI*, *EcoRV*, *PacI*. *Amp*: Ampicillin-Resistenzgen, *pMB1 ori*: minimaler *E.coli* Replikationsursprung, *rnpb term*: Transkriptionsterminator des *lacZ-ΔCpG*-Gens, *EM7*: bakterieller Promotor, enthält die Restriktionsschnittstelle *NcoI* (modifiziert nach Invivogen).

Der humane *OCT4*-Minimalpromotor (aus Kobolak et al., 2009) sowie der *OCT4*-Minimalpromotor mit dem 5'-Ende des *OCT4*-Gens, in dem sich eine Mutation befindet (CG → CA), und die Sequenz ohne diese Mutation wurden in den Vektor pMOD-LucShS v02 kloniert.

Bei dem Austausch von Guanosin durch Adenosin handelt es sich um einen konservativen Austausch, d. h. die Aminosäuresequenz die durch die Nukleotidsequenz kodiert wird, wird beibehalten.

Um die entsprechenden Promotorsequenzen direkt vor das Reporter-gen Luciferase zu klonieren, wurde der Vektor mit Hilfe des Restriktionsenzym NcoI, dessen Schnittstelle unmittelbar vor dem Reporter-gen Luciferase liegt, und dem Enzym HindIII aufgeschnitten und der bakterielle Promotor EM7 herausgeschnitten.

Die Promotorsequenzen wurden mittels PCR aus humaner genomischer DNA amplifiziert. Um sicherzustellen, dass die PCR-Produkte in der richtigen Richtung in den Vektor pMOD-LucShS v2 kloniert werden, wurden Primer mit den Restriktionsschnittstellen HindIII (5'-Ende) und NcoI (3'-Ende) entworfen. Bei den Sequenzen *OCT4*-Minimalpromotor mit den zusätzlichen 5'-Enden des *OCT4*-Gens konnte NcoI nicht verwendet werden, da die Sequenz eine interne NcoI-Schnittstelle enthält (siehe Abb. 8). Würde man diese Sequenz mit dem Restriktionsenzym NcoI schneiden, wäre die Sequenz zerstört. Daher wurde als kompatibles Restriktionsenzym BspHI eingesetzt, da die Restriktionsenzyme NcoI und BspHI identische überhängende Enden generieren (siehe Abb. 9). Beim Klonieren wurde darauf geachtet, dass kein Readingframe-shift eintritt (siehe Abb. 10 C1 und C2).

Die Lage der Schnittstellen in den jeweiligen Sequenzen und das Ergebnis der Klonierung auf Sequenzebene sind in der Abb. 10 dargestellt. Die entsprechenden Primer sind in der Abb. 11 aufgeführt.

A

5' — CCAGTTGTGTCTCCCGGTTTTCCCCTTCCACAGACACCATTGCCACCACCAT
 TAGGCAAACATCCTTCGCCTCAGTTTCTCCCCCACCTCCCTCTCCTCCACC
 CATCCAGGGGGCGGGGCCAGAGGTCAAGGCTAGTGGGTGGGACTGGGGAGGG
 AGAGAGGGGTTGAGTAGTCCCTTCGCAAGCCCTCATTTACCCAGGCCCCCGG
 CTTGGGGCGCCTTCCTTCCCC — 3'

OCT4-Minimalpromotor (aus Kobilak et al., 2009)

B

5' — GACCTAAAGCTTCCAGTTGTGTCTCCCGGTTTTCCCCTTCCACAGACACC
 ATTGCCACCACCATTAGGCAAACATCCTTCGCCTCAGTTTCTCCCCCAC
 CTCCTCTCCTCCACCCATCCAGGGGGCGGGGCCAGAGGTCAAGGCTAGT
 GGGTGGGACTGGGGAGGGAGAGAGGGGTTGAGTAGTCCCTTCGCAAGCCC
 TCATTTACCCAGGCCCCCGGCTTGGGGCGCCTTCCTTCCCCATG GCG
 GGA CAC CTG GCT TCG GAT TTC GCC TTC TCG — 3'

OCT4-Minimalpromotor mit dem 5'-Ende des OCT4-Gens

Abb. 8 Für die Klonierung verwendete Sequenzen.

Abbildung der Sequenz OCT4-Minimalpromotor (aus Kobilak et al., 2009) (A) und der Sequenz OCT4-Minimalpromotor mit dem 5'-Ende des OCT4-Gens (B). Die Sequenz OCT4-Minimalpromotor mit dem 5'-Ende des OCT4-Gens enthält eine interne NcoI-Schnittstelle (unterstrichen). Das Guanosin, das in der USSC SA8/25 gegen Adenosin ausgetauscht ist, ist rot markiert.

**Abb. 9 Restriktionsschnittstellen der Restriktionsenzyme NcoI und BspHI.**

Die Restriktionsenzyme NcoI und BspHI generieren die gleichen überhängenden Enden (rot markiert).

A 1

5' — ^{HindIII} GACCTAAAGCTTCCAGTTGTGTCTCCCGGTTTTCCCCTTCCACAGACACCATTGCCA
 CCACCATTAGGCAAACATCCTTCGCCTCAGTTTCTCCCCCACCTCCCTCTCCTCCA
 CCCATCCAGGGGGCGGGGCCAGAGGTCAAGGCTAGTGGGTGGGACTGGGGAGGGAGA
 GAGGGGTTGAGTAGTCCCTTCGCAAGCCCTCATTTACCAGGCCCCCGGCTTGGGGC
 GCCTTCCTTCCCC^{NcoI}**ATG**GTTGTCC — 3'

OCT4-Minimalpromotor (PCR-Produkt)

A 2

5' — ^{HindIII} GACCTAAAGCTTCCAGTTGTGTCTCCCGGTTTTCCCCTTCCACAGACACCATTGCCA
 CCACCATTAGGCAAACATCCTTCGCCTCAGTTTCTCCCCCACCTCCCTCTCCTCCA
 CCCATCCAGGGGGCGGGGCCAGAGGTCAAGGCTAGTGGGTGGGACTGGGGAGGGAGA
 GAGGGGTTGAGTAGTCCCTTCGCAAGCCCTCATTTACCAGGCCCCCGGCTTGGGGC
 GCCTTCCTTCCCC^{NcoI}**ATG** GCG GGA CAC CTG GCT TC**G** GAT TTC GCC TTC
^{BspHI} TCG ATC ATG AAG CAT AAT — 3'

OCT4-Minimalpromotor plus 5'-Ende des *OCT4*-Gens (PCR-Produkt)

B

5' — ^{NdeI (1)} ^{BstEII (6)} ^{AvrII (11)} ^{MfeI (18)} ^{BglII (25)} ^{HindIII (32)} ^{PmeI (39)}
 CATATGGGTGACCTAGGACAATTGTAGATCTTTAAGCTTAGTTTAAACAGTAGTTGACA
 ATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACTCACTATAGGAGGGCC
^{NcoI (116)}
 ACC**ATG** GAG GAT GCC AAG AAT ATT AAG AAA GGC CCT GCC
 Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala
 CCA TTC TAC CCT CTG GAA GAT[...] — 3'
 Pro Phe Tyr Pro Leu Glu Asp

Ausschnitt des Vektors pMOD LucShS v02

C 1

HindIII

5' — [...] CATATGGTGACCTAGGACAATTGTAGATCTTAAGCTTCCAGTTGTGTC
 TCCCGGTTTTCCCTTCCACAGACACCATTGCCACCACCATTAGGCAAACA
 TCCTTCGCCTCAGTTTCTCCCCCACCTCCCTCTCCTCCACCCATCCAGGG
 GGCGGGGCCAGAGGTCAAGGCTAGTGGGTGGGACTGGGGAGGGAGAGAGGG
 GTTGAGTAGTCCCTTCGCAAGCCCTCATTTACCAGGCCCCCGGCTTGGGG

NcoI

CGCCTTCCTTCCCCATG GAG GAT GCC AAG AAT ATT AAG AAA
 Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys

GGC CCT GCC CCA TTC TAC CCT CTG GAA GAT[...] — 3'

Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro Leu Glu Asp

Ausschnitt des pMOD-Vektors nach der Klonierung der OCT4-Minimalpromotor-Sequenz

C 2

HindIII

5' — [...] CATATGGTGACCTAGGACAATTGTAGATCTTAAGCTTCCAGTTGTGTCTCCCGGT
 TTTCCTTCCACAGACACCATTGCCACCACCATTAGGCAAACATCCTTCGCCTCAGT
 TTCTCCCCCACCTCCCTCTCCTCCACCCATCCAGGGGGCGGGGCCAGAGGTCAAGGC
 TAGTGGGTGGGACTGGGGAGGGAGAGAGGGGTTGAGTAGTCCCTTCGCAAGCCCTCAT
 TTCACCAGGCCCCCGGCTTGGGGCGCCTTCCTTCCCCATG GCG GGA CAC CTG
 Met Ala Gly His Leu

BspHI/NcoI

GCT TCG GAT TTC GCC TTC TCG ATC ATG GAG GAT GCC AAG AAT
 Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Ile Met Glu Asp Ala Lys Asn

ATT AAG AAA GGC CCT GCC CCA TTC TAC CCT CTG GAA GAT[...] — 3'

Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro Leu Glu Asp

Ausschnitt des pMOD-Vektors nach der Klonierung der OCT4-Minimalpromotor-Sequenz mit dem 5'-Ende des OCT4-Gens

Abb. 10 Sequenzdetaillierte Abbildung der Klonierung.

(A) zeigt die PCR-Produkte des humanen OCT4-Minimalpromotors (A1) und des OCT4-Minimalpromotors mit dem 5'-Ende des Leserahmens des OCT4-Gens (A2). Die benutzten Schnittstellen für das PCR-Produkt OCT4-Minimalpromotor sind HindIII und NcoI (A1). Für die PCR-Produkte OCT4-Minimalpromotor mit dem 5'-Ende wurden die Schnittstellen HindIII und BspHI verwendet. Die mit HindIII/BspHI verdauten PCR-Produkte passen in-frame in den mit den Restriktionsenzymen HindIII und NcoI geschnittenen Vektor. Das rot hervorgehobene G markiert das Guanodin, das durch eine Punktmutation durch Adenosin ersetzt wird. Die unterstrichenen Sequenzabschnitte markieren die Schnittstellen für die entsprechend angezeigten Restriktionsenzyme.

(B) zeigt einen Ausschnitt des Vektors pMOD LucShS v02. Rot hervorgehoben ist die Multiple Klonierstelle MCS1 mit den vorhandenen Restriktionsschnittstellen (vergleiche auch mit der Abb. 7). Die verwendeten Restriktionsschnittstellen HindIII und NcoI sind unterstrichen und farblich hervorgehoben. Orange markiert ist ein Ausschnitt des synthetischen LucSh-Fusionsgens. Blau hervorgehoben ist die Sequenz des bakteriellen Promotors EM7, die später bei der Klonierung herausgeschnitten wird.

(C) zeigt den klonierten Bereich des OCT4-Minimalpromotors im Vektor pMOD LucShS v02 (C1) bzw. des OCT4-Minimalpromotors inklusive des 5'-Endes des OCT4-Gens (grüne Sequenz) im Vektor pMOD LucShS v02 (C2).

Primer für die Sequenz *OCT4*-Minimalpromotor (*OCT4* -230-0 Promotor):

Primername	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Lage im Gen	Länge PCR-Produkt [bp]
5'OCT4 -230-0 HindIII	gac cta aag ctt CCA GGT GTG TCT CCC GGT TTT CCC CTT CC	76,7	<i>OCT4</i> Minimal- promotor	230
3'OCT4 -230-0 NcoI	gga caa cca tgg GGG GAA GGA AGG CGC CCC AAG C	81,5	<i>OCT4</i> Minimal- promotor	

Primer für die Sequenz *OCT4*-Minimalpromotor mit dem 5'Ende des *OCT4*-Gens ohne Punktmutation (*OCT4* -230-35 Promotor):

Primername	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Lage im Gen	Länge PCR-Produkt [bp]
5'OCT4 -230-0 HindIII	gac cta aag ctt CCA GGT GTG TCT CCC GGT TTT CCC CTT CC	76,7	<i>OCT4</i> Minimal- promotor	265
3'OCT4 -230-35 luc fusion BspHI	att atg ctt cat gat CGA GAA GGC GAA ATC CGA AGC CAG GTG TCC	79,6	<i>OCT4</i> Exon 1	

Primer für die Sequenz *OCT4*-Minimalpromotor mit dem 5'Ende des *OCT4*-Gens mit Punktmutation (*OCT4*-230-35 pm Promotor):

Primername	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Lage im Gen	Länge PCR-Produkt [bp]
5'OCT4 -230-0 HindIII	gac cta aag ctt CCA GGT GTG TCT CCC GGT TTT CCC CTT CC	76,7	<i>OCT4</i> Minimal- promotor	265
3'OCT4 -230-35 pm luc fusion BspHI	att atg ctt cat gat CGA GAA GGC GAA ATC T GGA AGC CAG GTG TCC	78,0	<i>OCT4</i> Exon 1	

Abb. 11 PCR-Primer zur Klonierung der *OCT4*-Minimalpromotor-Sequenzen.

Der mit dem Template überlappende Bereich ist in GROSSBUCHSTABEN geschrieben, in kleinen Buchstaben der Überhang (Primer-linker), **rot** markiert sind die Restriktionsschnittstellen, blau und unterstrichen ist die Punktmutation.

PCR-Ansatz:

- 1 µl Template (≈ 200-300 ng DNA)
- 1 µ sense Primer (100 pMol/µl)
- 1 µl antisense Primer (100 pMol/µl)
- 2 µl dNTPs (10 pMol/µl)
- 10 µl 10x Puffer
- 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) + 1/10 Pfu DNA Polymerase
- H₂O ad 100 µl

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen im Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700 und 2700, Applied Biosystems) durchgeführt:

Schritt	Temp [°C]	Zeit [min:sec]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5:00	1
Denaturierung	95	1:00	35
Annealing	62	0:30	
Elongation	72	1:00	
Endelongation	72	7:00	1
Hold	4	∞	n/a

5 µl der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 %igen Agarosegel hinsichtlich der richtigen Länge analysiert, der Rest wurde mit Phenol/Chloroformfällung aufgereinigt.

Anschließend wurden je 25 µl der aufgereinigten Proben für den Restriktionsverdau verwendet. Dabei werden die 5'-Überhänge erstellt, damit die DNA-Sequenz später in den mit den gleichen Restriktionsenzymen vorverdauten Vektor ligieren kann. Der Restriktionsverdau wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt:

25 µl DNA

4 µl NcoI (Invitrogen)/BspHI (NEB)

4 µl HindIII (Invitrogen)

8 µl Puffer (REact® 2, Invitrogen)

H₂O ad 80 µl

Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C.

Anschließend wurde die DNA mittels Phenol/Chloroformfällung aufgereinigt.

Zeitgleich wurde der pMOD-LucShS v02 (4198 bp, Invivogen) mit den Restriktionsenzymen HindIII (Invitrogen) und NcoI (Invitrogen) geschnitten. Der Restriktionsverdau mit zwei Enzymen gewährleistet die Klonierung in die richtige Richtung. Bei dem Verdau wurde ein 84 bp-Fragment ausgeschnitten.

Restriktionsverdau des Vektors pMOD-LucShS v02:

19 μ l Vektor-DNA (\approx 25 ng)
6 μ l HindIII
6 μ l NcoI
12 μ l REACT 1 Puffer
H₂O ad 120 μ l

Der Verdau erfolgte über 2 h bei 37°C.

Zur Überprüfung der korrekten Schnittstellen des Vektors wurden 0,5 μ l des Verdauten Vektors auf einem 1 %igem Agarosegel angeschaut.

Um das kleine herausgeschnittene Fragment darzustellen, wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Das Polyacrylamid-Gel wurde nach unten stehender Auflistung angefertigt. 5 μ l des verdauten Vektors wurden auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Gelelektrophorese bei 10 mA für eine Stunde durchgeführt. Zum Sichtbarmachen der Nucleinsäuren wurde das Polyacrylamid-Gel in Ethidiumbromid (30 μ g Ethidiumbromid auf 100 ml 1x TBE) gebadet und anschließend unter ultraviolettem Licht (bei 302 nm) visualisiert.

Polyacrylamid-Gel:

5,6 ml 40 % Acrylamid
1,5 ml 10x TBE
70,0 μ l 10 % APS
15,0 μ l TEMED
H₂O ad 15 ml

Die restliche Probe des verdauten Vektors wurde mittels Phenol/Chloroformfällung aufgereinigt. Anschließend wurde eine Dephosphorylierung zur enzymatischen Entfernung der 5'-Phosphatenden durchgeführt. Damit wird verhindert, dass der geschnittene Vektor mit sich selbst re-ligiert. Die Dephosphorylierung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

10,0 μ l DNA
1,0 μ l Phosphatase (CIAP = Calf intestinal alkaline phosphatase), 1 U/ μ l
2,0 μ l 10fach Puffer
H₂O ad 20 μ l

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1 h. Anschließend folgte eine erneute Phenol/Chloroformfällung, um die Phosphatase aus der Probe zu entfernen. Zum Schluss wurde die gereinigte DNA in TE-Puffer aufgenommen.

Die Ligation von Vektor und Insert (PCR-Produkt) erfolgte in einem Verhältnis von 1:5 (Vektor:Insert). Die Ligation des Vektors mit den Inserts wurde folgendermaßen durchgeführt:

1 µl Vektor
1-2 µl Insert
0,5 10x Ligationspuffer
1 µl T4 DNA Ligase (Invitrogen)
H₂O ad 5 µl

Die Ligation wurde bei 20°C für 1 h durchgeführt.

Nach der Ligation wurde das Ligationsprodukt mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) aufgereinigt. Je 1 µl der aufgereinigten Vektoren wurde für die Elektroporation in elektrokompente E.coli SURE (Stratagene, USA) benutzt. Die Elektroporation erfolgte unter Standard-Elektroporationsbedingungen (2.500 V, 200 Ω, 25 µF) im Gene Pulser® electroporator (BioRad). Zu den Bakteriensuspensionen wurde jeweils 1 ml LB-Medium (20 g/l, Invitrogen™, USA) hinzugefügt, für 45 min bei 37°C inkubiert und anschließend 20-200 µl auf Agarplatten ausplattiert. Von den über Nacht gewachsenen Kolonien wurden jeweils 12 Kolonien gepickt, in je 3 ml LB-Medium + Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (Schüttelapparate 3005-3020 Modell G25, GFL) bei 125 rpm inkubiert. Die Plasmide wurden mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (MN) aufgereinigt. Daraufhin wurde ein Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen HindIII (Invitrogen) und NcoI (Invitrogen) durchgeführt, um zu prüfen, in welchen Proben das Insert in den Vektor integriert ist. Das Ergebnis wurde auf einem 1 %igem Agarosegel betrachtet.

Verdau:

3,0 µl Plasmid-DNA
0,5 µl HindIII
0,5 µl NcoI
1,0 µl REACT 2 Puffer
H₂O ad 10 µl

Anschließend wurden die Proben mit dem richtigen Insert für die DNA-Sequenzierung vorbereitet. Dazu mussten die Vektoren zunächst durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym BamHI (Invitrogen) linearisiert werden. Der Verdau wurde wie folgt durchgeführt:

10,0 µl Plasmid-DNA
1,0 µl BamHI
2,0 µl Puffer REact® 3 (Invitrogen)
H₂O ad 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Proben mittels Phenol/Chloroformfällung und DNA-Sequenzierung der Proben. Je eine zu 100 % richtige Sequenz wurde für Maxipräparation verwendet, um die Plasmide in hoher Menge für die darauf folgende Transfektion zu gewinnen.

3.7.2. Messung der Luciferaseaktivität

Um die Luciferase-Aktivität zu messen, wurden adhärent wachsende HEK 293T-Zellen (human embryonic kidney Zellen) mit den pMOD-Vektoren *pMOD OCT4 -230-0 Promotor (OCT4-Minimalpromotor)*, *pMOD OCT4 -230-35 Promotor*, *pMOD OCT4 -230-35 pm Promotor* und dem Vektor *pMOD-lucShs v02* transfiziert. Zur Vorbereitung auf die Transfektion wurden die HEK 293T-Zellen in einer 48-well Platte zu je 50.000 Zellen in 200 µl Aussaatmedium pro well ausplattiert.

Aussaatmedium:

DMEM high Glucose (4,5 g/l), 500 ml (Invitrogen™)
1 % L-Glutamin
1 % Pyruvat (5 ml auf 500 ml)
10 % FCS (50 ml auf 500 ml)

Transfektion:

Für die Transfektion wurden jeweils 100 ng des Vektors eingesetzt. Es wurde jeweils eine Doppeltransfektion mit dem Renilla Luciferase Reporter Vektor pRL-TK (Promega, USA) durchgeführt, um unterschiedliche Transfektionseffizienzen herauszurechnen. Von dem Renilla-Vektor wurde jeweils 10 ng für die Transfektion eingesetzt. Transfiziert wurde mit je 0,5 µl des Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) verdünnt mit 24,5 µl Opti-MEM® I Reduced Medium (Invitrogen™). Anschließend folgte eine Inkubation bei 37°C für 24 h.

Messung der Luciferase-Aktivität:

Die Firefly-Luciferase-Aktivität wurde 24 h nach der Transfektion gemessen. Dazu wurden die Zellen zunächst mit je 100 µl Passive Lysis buffer, 5x (Promega, USA) 1:5 verdünnt mit Aqua dest. lysiert. Für die Messung wurde jeweils 20 µl Lysat mit 100 µl beetle juice (PJK, Germany) bzw. 5 µl Lysat mit 100 µl Renilla-juice (PJK, Germany) gemischt und im Luminometer (miniLumat LB 9506, Berthold, Germany) bei einer Lichtemission von 562 nm gemessen (10 sec). Die gemessene Lichtemission ist proportional zur Promoteraktivität.

3.8. Bioinformatik**Online-Datenbanken:**

Name	Web-Adresse
ALGGEN PROMO	http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3
Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
CpG-Island Searcher	http://cpgislands.usc.edu
OMIM	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

Software:

Name	Firma
ApE (A plasmid Editor)	M. Wayne Davis (Version 1.17)
Chromas lite	Technelysium Pty Ltd (Version 2.0.1)
Clone Manager Professional Suite	Scientific and Educational (Version 6.00)
OligoPrimer Analysis Software	Molecular Biology Insights, Inc. (Version 4.1)
SDS 2.3	Applied Biosystems, USA

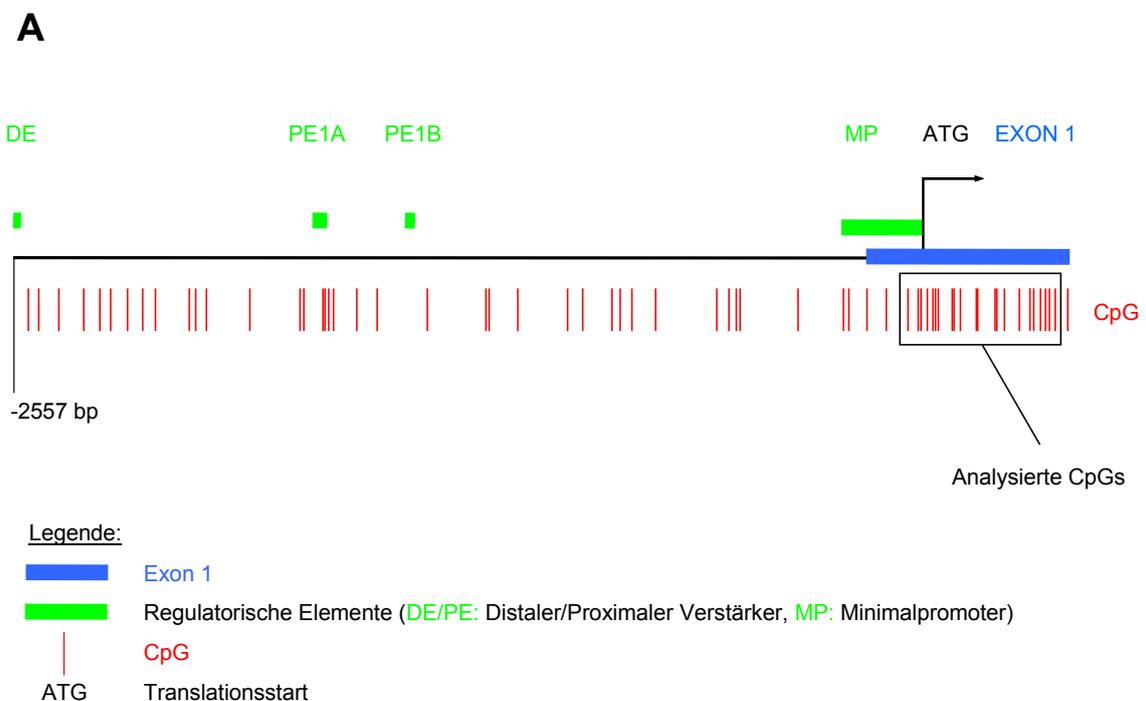
4. Ergebnisse

4.1. DNA-Methylierungsanalyse der 22 CpGs innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens

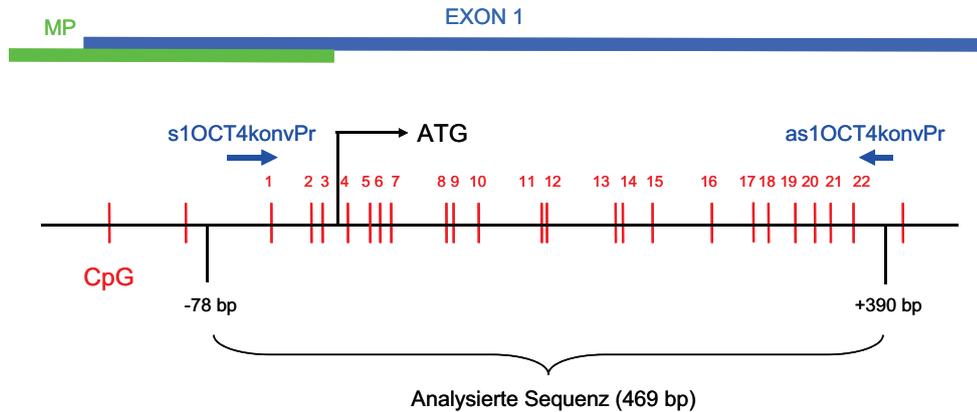
In der vorliegenden Arbeit wurde der DNA-Methylierungsstatus in einem ausgewählten Bereich innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens in fünf USSC-Linien mittels genomischer DNA-Sequenzierung nach Bisulfitkonvertierung analysiert.

Es wurden 22 CpG-Dinukleotide innerhalb eines 469 bp langen Fragments im *OCT4*-Gen untersucht, das sich über einen Teil des *OCT4*-Minimalpromotors bis in das Exon 1 erstreckt. Die CpG-reiche Region wurde mit Hilfe des Programms *CpG Island Searcher* (<http://cpgislands.usc.edu>) ermittelt. Als CpG-reiche Region wurde eine mindestens 200 bp lange DNA-Sequenz definiert mit einem durchschnittlichen CG-Gehalt von $> 50\%$ und einer ObsCpG/ExpCpG-Ratio $\geq 0,6$.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen schematisch die Lage des analysierten Bereichs im *OCT4*-Gen (Abb. 12 A-C).



B



C

**Abb. 12 Darstellung des analysierten Bereichs der regulatorischen Region innerhalb des OCT4-Gens**

(A) Schematische Darstellung des untersuchten Bereichs innerhalb der regulatorischen Region des OCT4-Gens mit Position aller CpGs innerhalb dieser Region. Schwarz umrandet sind die 22 analysierten CpGs. In der Abb.(B) ist der analysierte Bereich vergrößert dargestellt. Die 22 untersuchten CpGs sind durchnummeriert. Die verwendeten Primer (s1OCT4konvPr und as1OCT4konvPr) sind als blaue Pfeile markiert. In (C) ist der analysierte Bereich auf Sequenzebene mit Lage der Primer (blaue Pfeile) abgebildet.

Es wurde die DNA der USSC-Linien SA4/146, SA4/101, SA5/73, SA5/60 und SA8/25 verwendet. Die embryonale Stammzelle, von der bekannt ist, dass dieser Bereich vollständig unmethyliert ist (u.a. Takahashi and Yamanaka, 2006 Park et al., 2008), wurde als Vergleich herangezogen. In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA der humanen embryonalen Stammzelllinie ES I3 verwendet. Zudem wurde eine ausdifferenzierte Zelle als weitere Vergleichszelle herangezogen, da in ausdifferenzierten Zellen dieser Bereich nahezu methyliert ist (u.a. Takahashi and Yamanaka, 2006 Park et al., 2008). Hier dient als ausdifferenzierte Zelle die NK-Zelle. Um den Methylierungsstatus zu analysieren wurde die DNA der verwendeten Zellen bisulfitkonvertiert. Während der Bisulfitkonvertierung wird unmethyliertes Cytosin in Uracil konvertiert, methyliertes Cytosin bleibt unverändert (ausführliche Erklärung siehe Kapitel 3.4.1).

Anschließend wurde die konvertierte DNA mittels PCR amplifiziert, das PCR-Produkt wurde mittels TA-Cloning in *E.coli* transformiert. Aus den erhaltenen Bakterienklonen wurde die Plasmid-DNA extrahiert und anschließend sequenziert (ausführliche Erläuterungen siehe Kapitel 3.4). Eine erhaltene Sequenz entspricht einem Klon.

Die erhaltenen bisulfitkonvertierten Sequenzen wurden mit einer bekannten nicht-konvertierten Referenzsequenz verglichen. Anhand dieses Vergleichs konnten methylierte CpGs von unmethylierten CpGs unterschieden werden. Denn unmethyliertes Cytosin in der unkonvertierten Sequenz entspricht Thymin in der konvertierten Sequenz. Methyliertes Cytosin in der unkonvertierten Sequenz entspricht unverändert Cytosin in der konvertierten Sequenz.

4.1.1. Ergebnis der DNA-Methylierungsanalyse in USSC

In der Abb. 13 sind die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalyse in der untersuchten *OCT4*-Region der fünf USSC-Linien SA4/101, SA4/146, SA5/60, SA5/73 und SA8/25 vergleichend mit den Ergebnissen der ES- und NK-Zellen dargestellt.

Die DNA-Methylierung in dem untersuchten Bereich innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens in den fünf USSC-Linien beträgt durchschnittlich 41-49 % (Abb. 13 A-E).

Im Gegensatz dazu ist der entsprechende Bereich in den primären NK-Zellen deutlich stärker methyliert: in der NK-Zelle beträgt die durchschnittliche Methylierung 80 % (Intervall 41-91 %), (Abb. 13 G).

Wie bereits bekannt, ist die untersuchte *OCT4*-Genregion in ES-Zellen nahezu vollständig unmethyliert (Abb. 13 F).

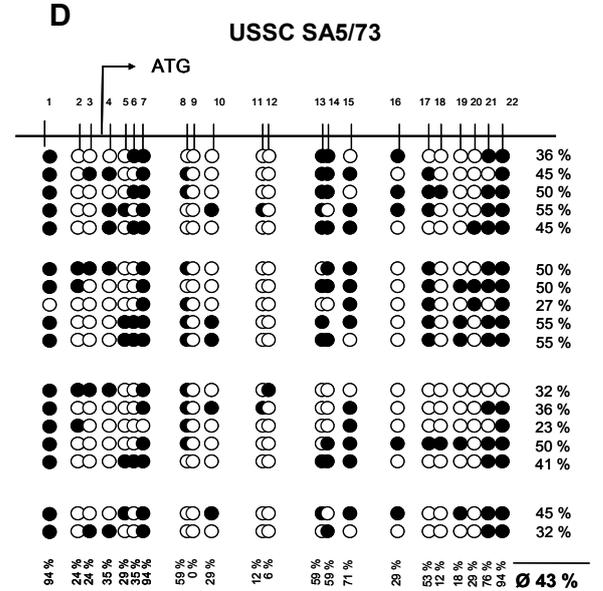
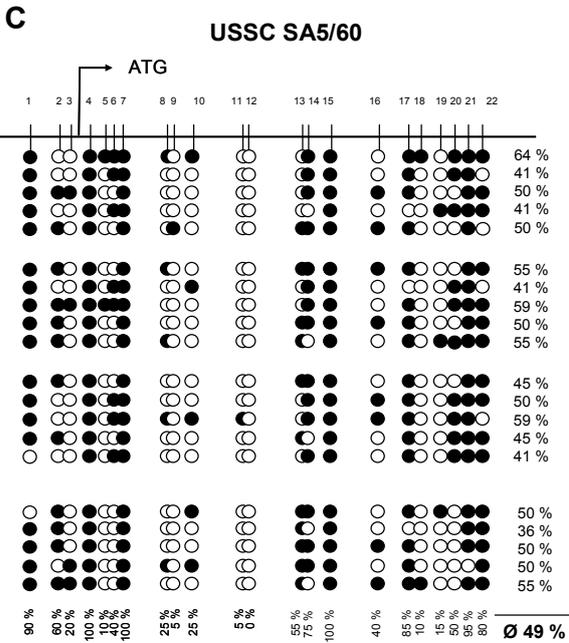
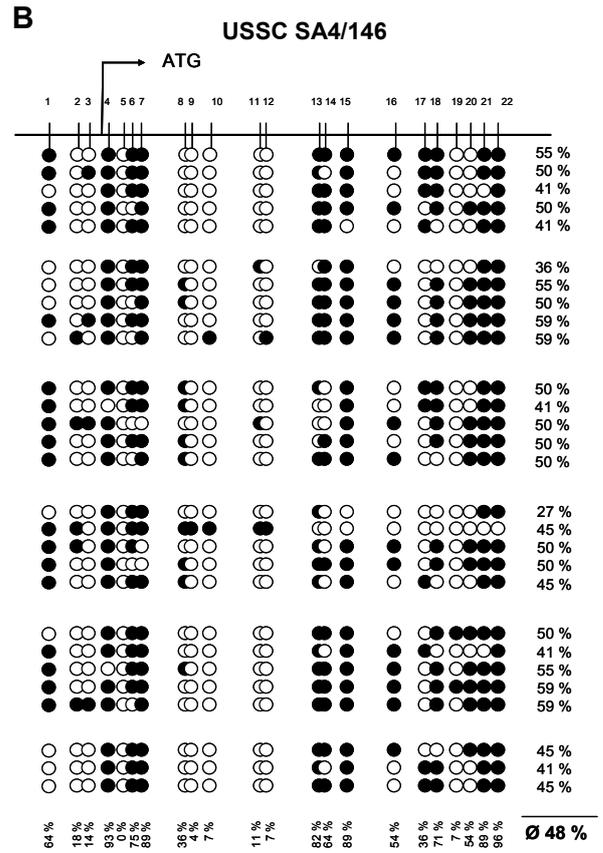
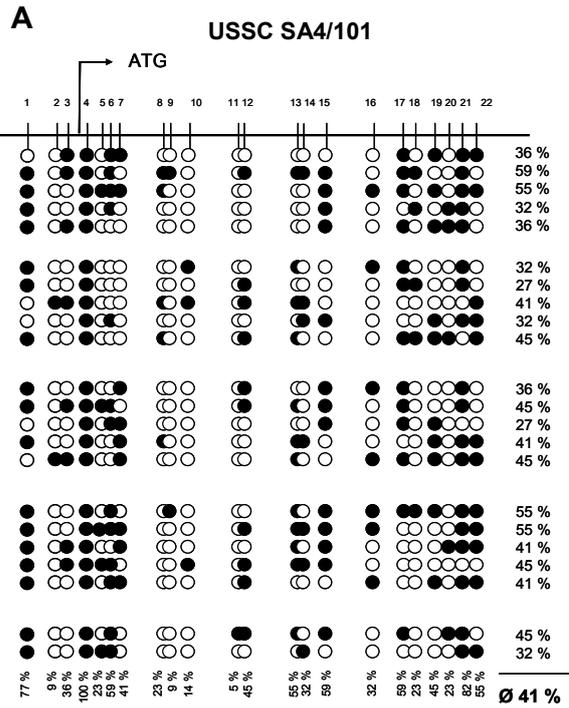
Betrachtet man die durchschnittliche DNA-Methylierung in dem analysierten *OCT4*-Genbereich an den einzelnen CpG-Positionen (Abb. 13 und Abb. 15), so fällt auf, dass in USSC die durchschnittliche Methylierung an den einzelnen CpG-Positionen mehr schwankt als die Methylierung der einzelnen Klone (Abb. 13 A-E, Prozentzahl unter jeder Spalte). In allen fünf

USSC-Linien sind die CpG-Positionen 9-12 durchweg weniger methyliert als die übrigen CpG-Positionen. In den NK-Zellen hingegen ist dieser Bereich überwiegend methyliert.

In der USSC-Linie SA8/25 fehlt in allen untersuchten Klonen die CpG-Position 5 (Abb. 13 E). In den zugrunde liegenden DNA-Sequenzen findet sich bei allen Klonen ein Basenaustausch von CG zu CA. Es handelt sich somit um eine Punktmutation die dafür sorgt, dass ein CpG verloren geht.

Vergleicht man die Methylierung der CpG-Position 5 in den anderen vier USSC-Linien, stellt sich heraus, dass dieses CpG wenig methyliert ist, in der USSC-Linie SA4/146 ist diese Position in allen Klonen unemthyliert.

Zusammenfassend ist der ausgewählte Bereich innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens in den fünf untersuchten USSC-Linien signifikant weniger methyliert als in der differenzierten primären NK-Zelle. Im Vergleich zu der Zelllinie ES I3 ist der Bereich in der USSC signifikant stärker methyliert (Abb. 14).



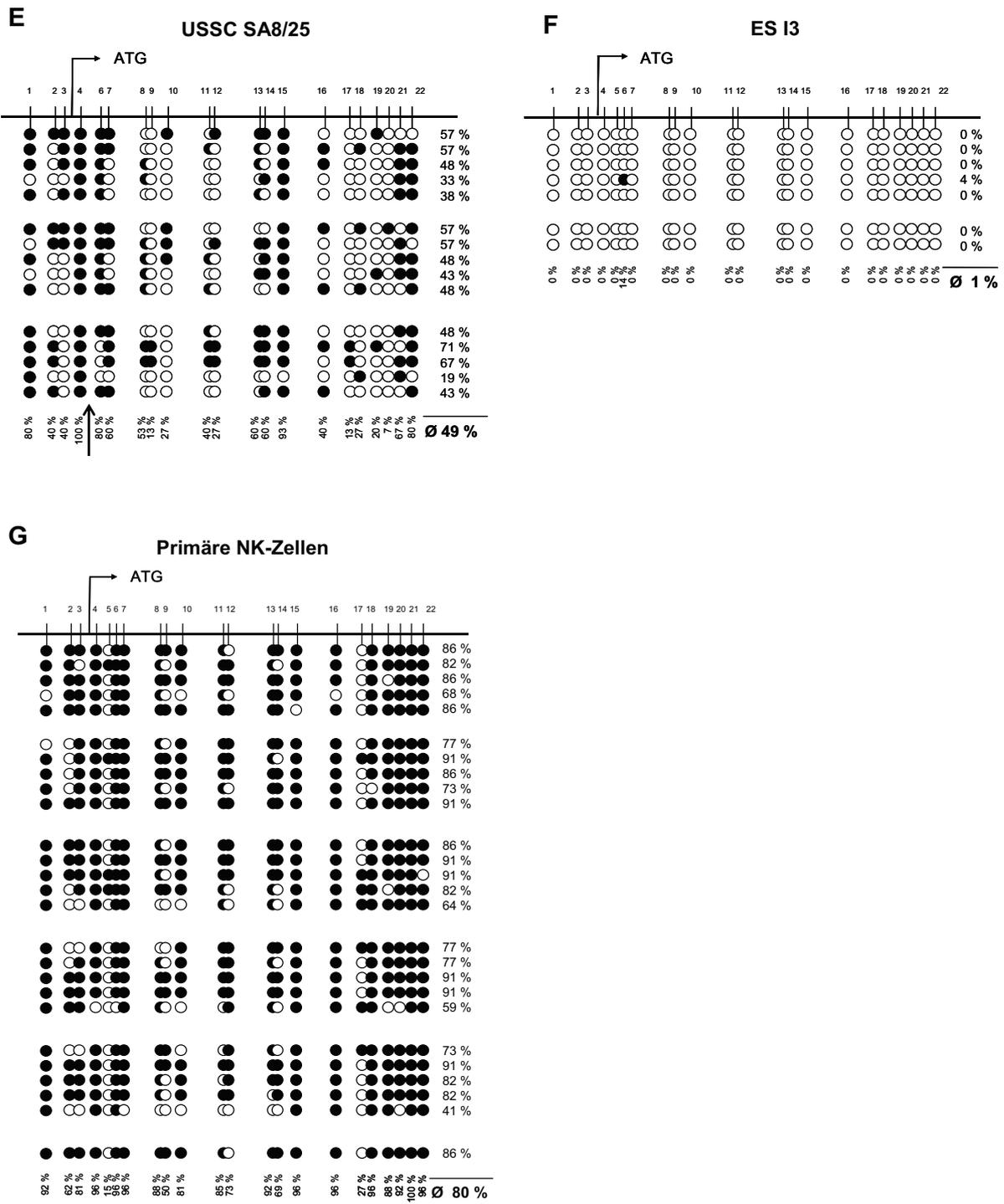


Abb. 13 Ergebnis der DNA-Methylierungsanalyse.

DNA-Methylierungsmuster der 22 untersuchten CpGs in dem ausgewählten Bereich innerhalb der regulatorischen Region des OCT4-Gens Region nach Sequenzierung bisulfittkonvertierter DNA in den fünf USSC-Linien SA4/101 (A), SA4/146 (B), SA5/60 (C), SA5/73 (D) und SA8/25 (E) im Vergleich zur ES-Zelle I3 (F) und primären NK-Zellen (G). Jede Zeile stellt eine Sequenz von einem PCR-Produkt dar, entsprechend einem E.coli-Klon. Die CpG-Positionen sind durchnummeriert und durch Kreise dargestellt. Schwarze Kreise markieren methylierte CpGs, weiße Kreise unmethylierte CpGs. Die unter jeder einzelnen Spalte aufgeführte Prozentzahl zeigt den Mittelwert der prozentualen Methylierung an der entsprechenden CpG-Position an. Die Prozentzahl hinter jeder Zeile steht für die prozentuale Methylierung des jeweiligen

Klons. Rechts unten ist der Mittelwert der prozentualen Methylierung der Gesamtzahl der Klone für die jeweilige Zelllinie aufgeführt. Diese Werte dienen als Grundlage für die Abb. 14. Das ATG markiert den Translationsstart. In der USSC-Linie SA8/25 fehlt in allen untersuchten Klonen die CpG-Position 5, markiert durch einen senkrechten Pfeil.

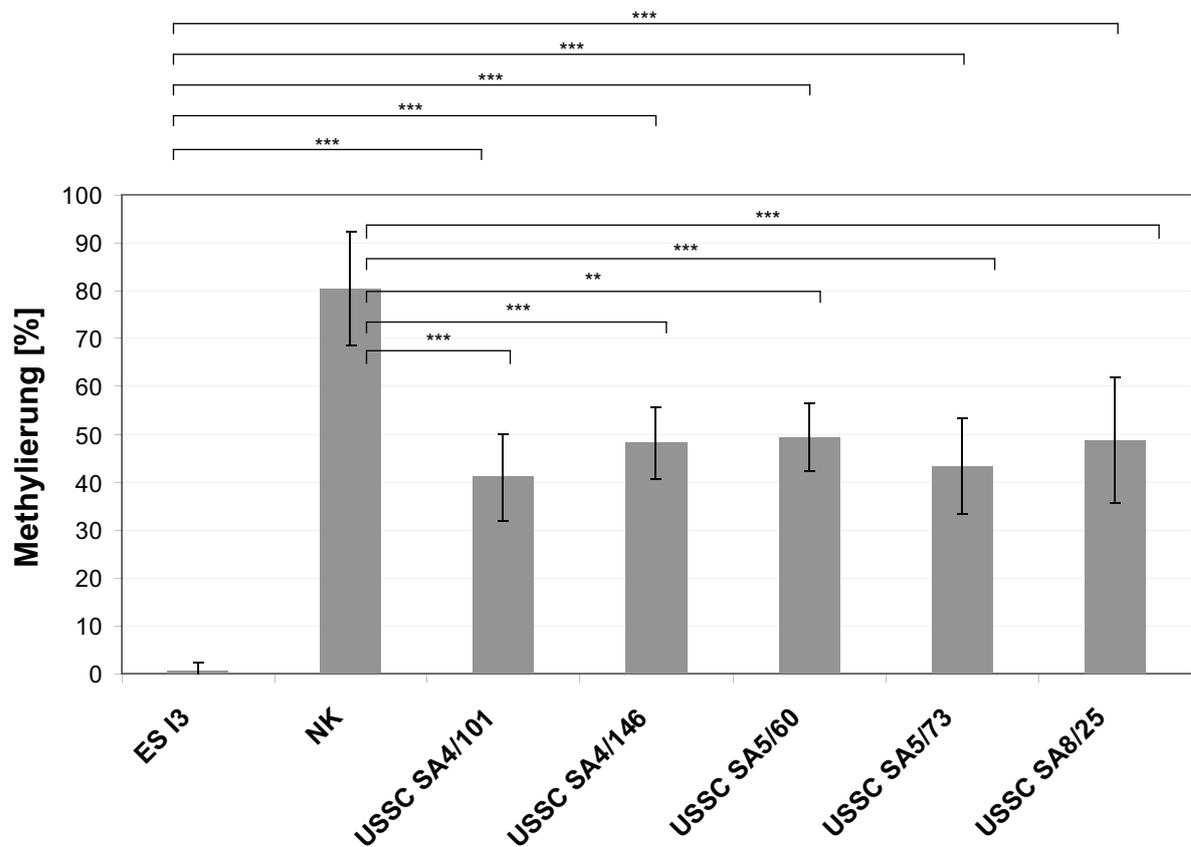


Abb. 14 Zusammenfassender Vergleich der gesamten prozentualen DNA-Methylierung für die untersuchten 22 CpG-Dinukleotide in dem ausgewählten Bereich innerhalb der regulatorischen Region des OCT4-Gens in den Zelllinien ES I3, NK-Zelle, USSC SA4/101, SA4/146, SA5/60, SA5/73 und SA8/25.

Dargestellt sind die in der Abb. 13 beschriebenen Mittelwerte der DNA-Methylierung in Prozent sowie die zugehörigen Standardabweichungen. Students T-Test (ungepaart, zweiseitig, ungleiche Varianz) wurde durchgeführt (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$).

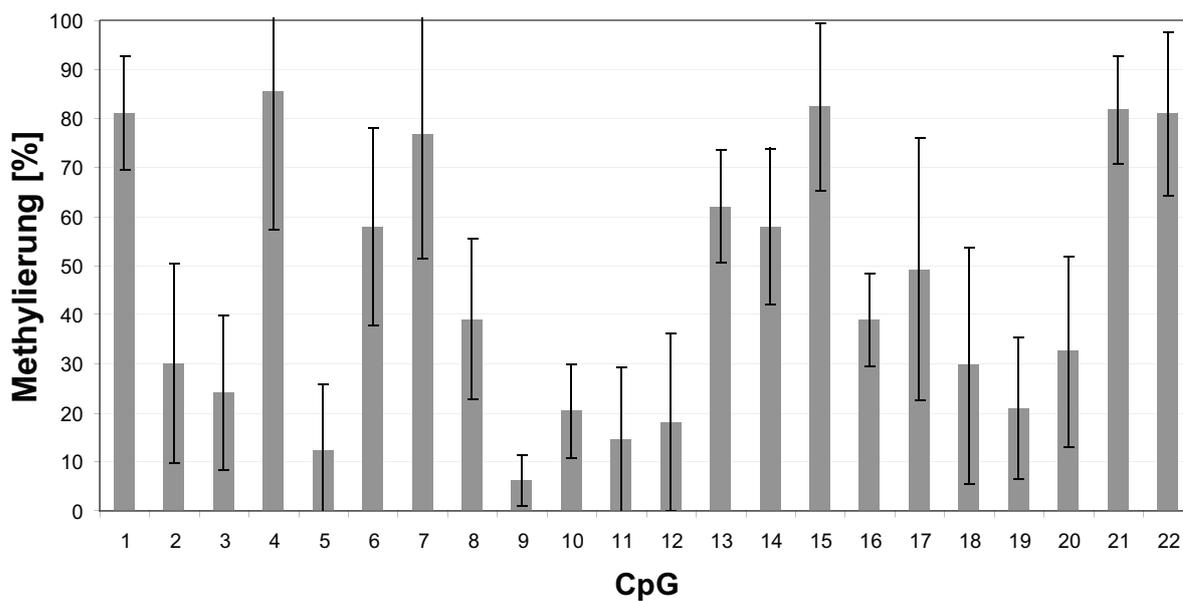


Abb. 15 Vergleich der DNA-Methylierung an den einzelnen CpG-Positionen innerhalb der regulatorischen Region des OCT4-Gens für die fünf untersuchten USSC-Linien SA4/101, SA4/146, SA5/60, SA5/73 und SA8/25.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der prozentualen Methylierung an der jeweiligen CpG-Position von den fünf USSC-Linien entnommen aus der Abb. 13 (unten aufgeführte Prozentzahlen unter den CpG-Positionen) und die zugehörige Standardabweichung.

4.1.2. Vergleich des DNA-Methylierungsstatus in nativen USSC mit dem DNA-Methylierungsstatus in USSC nach 14-tägiger Osteo-differenzierung

Die USSC-Linien SA4/146 und SA5/73 wurden hinsichtlich des DNA-Methylierungsstatus in dem ausgewählten Bereich innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens nach 14-tägiger Osteodifferenzierung untersucht und mit dem DNA-Methylierungsstatus in nativen USSC verglichen.

Die Osteodifferenzierung der nativen USSC wurde induziert durch Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerol- Phosphat (DAG). Überprüft wurde die Osteodifferenzierung durch Nachweis der Expression von Alkalischer Phosphatase, Osteocalcin, Osteopontin, Bone-Sialo-Protein und Kollagen Typ I mittels RT-PCR (Kögler et al., 2004). Durchgeführt wurde die Osteodifferenzierung durch die Arbeitsgruppe unter der Leitung von Frau Prof. Kögler. Die DNA der osteodifferenzierten USSC wurde mir für diese Arbeit von Frau Prof. Kögler zur Verfügung gestellt.

Die Ergebnisse der Methylierung der nativen USSC entsprechen den in Kapitel 4.1.1 dargestellten Ergebnissen, es handelt sich um das gleiche Material.

Es zeigt sich, dass in der USSC-Linie SA4/146 die durchschnittliche DNA-Methylierung in dem untersuchten Bereich vom nativen Zustand zum osteodifferenzierten Zustand um 10,4 % zunimmt, von 48 % auf 53 % (Abb. 16 A). In der USSC-Linie SA5/73 hingegen nimmt die durchschnittliche Methylierung um 11,6 % von 43 % auf 38 % ab (Abb. 16 B).

In der Abb. 17 ist die durchschnittliche Methylierung der beiden USSC-Linien jeweils im nativen und osteodifferenzierten Zustand vergleichend gegenübergestellt. Es zeigt sich, dass sich der DNA-Methylierungsstatus in dem untersuchten Bereich im nativen Zustand und im osteodifferenzierten Zustand nicht signifikant unterscheiden.

Auch die durchschnittliche DNA-Methylierung an den jeweiligen CpG-Positionen unterscheidet sich nicht merklich zwischen den nativen und osteodifferenzierten USSC. Das Muster der durchschnittlichen DNA-Methylierung bleibt gleich, es kommt nicht zu deutlichen Veränderungen der DNA-Methylierung an einzelnen CpG-Positionen (Abb. 16).

Nach 14-tägiger Osteodifferenzierung scheint die DNA-Methylierung in dem untersuchten Bereich des *OCT4*-Gens nicht signifikant zuzunehmen.

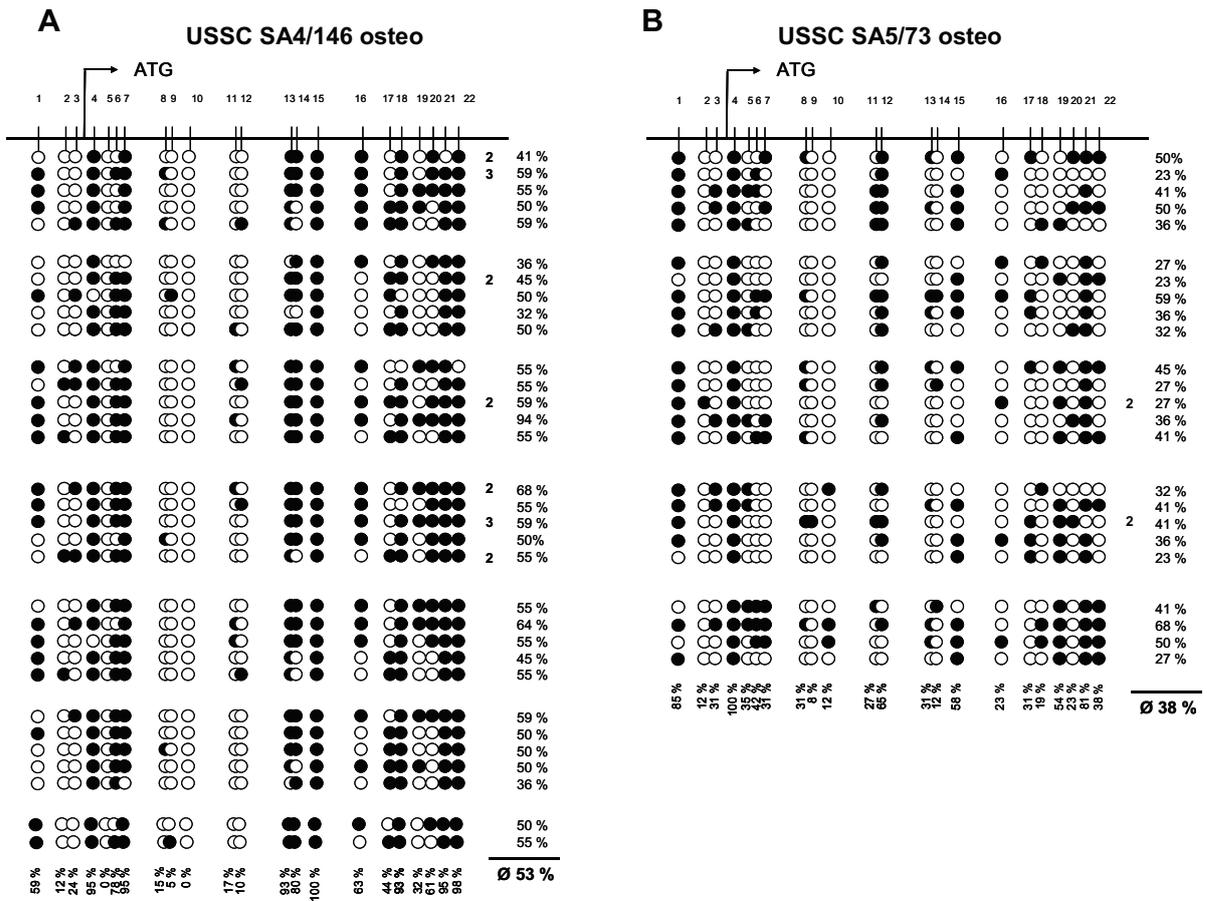


Abb. 16 Ergebnis der DNA-Methylierungsanalyse in USSC osteo.
 DNA-Methylierungsmuster der 22 untersuchten CpGs innerhalb der regulatorischen Region des OCT4-Gens nach Sequenzierung bisulfitkonvertierter DNA in den USSC-Linien SA4/146 (A) und SA5/73 (B) nach 14-tägiger Osteodifferenzierung. Die Darstellungsweise entspricht der in Abb. 13. Die natürlichen Zahlen hinter einer Zeile zeigt die Anzahl identischer Klone an.

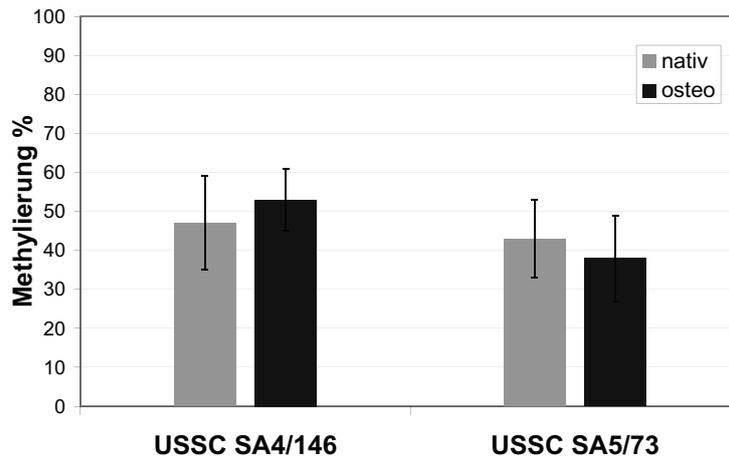


Abb. 17 Vergleich der durchschnittlichen DNA-Methylierung der 22 CpGs innerhalb der ausgewählten OCT4-Region für die USSC-Linien SA4/146 und SA5/73 in nativen Zustand und nach 14-tägiger Osteodifferenzierung.

Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert der prozentualen Methylierung der Gesamtzahl aller Klone entnommen aus der Abb. 16 (USSC SA4/146 nativ: n=29, USSC SA4/146 osteo: n=41, USSC SA5/73 nativ: n=17, USSC 5/73 osteo: n=26) sowie die zugehörige Standardabweichung. Der Students T-Test wurde durchgeführt, es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den nativen USSC und den USSC nach Osteodifferenzierung.

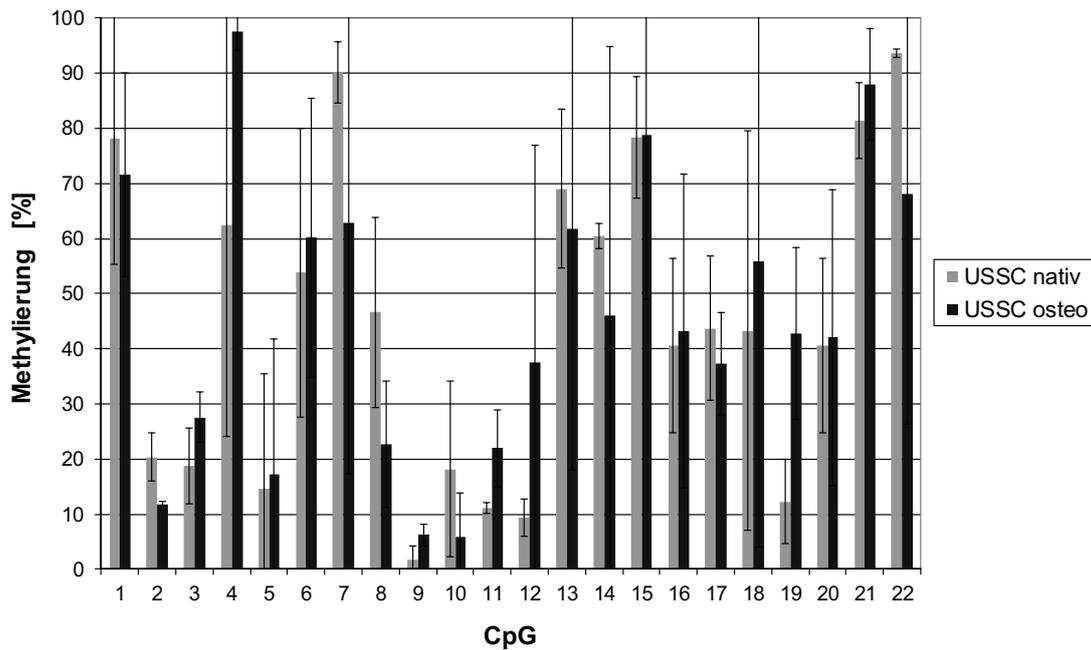


Abb. 18 Vergleich der DNA-Methylierung zwischen nativer USSC der Linien SA4/146 und SA5/73 und der gleichen Linien nach Osteodifferenzierung an den einzelnen CpG-Positionen innerhalb der regulatorischen OCT4-Region.

Die Werte der beiden nativen und osteodifferenzierten Zellen wurden zusammengefasst. Es ist jeweils der Mittelwert der prozentualen Methylierung an der entsprechenden CpG-Position mit der dazugehörigen Standardabweichung aufgetragen.

4.1.3. Ergebnisse der DNA-Methylierung in putativen iPS-Zellen

In einem weiteren Versuchsabschnitt wurde das Methylierungsmuster der ausgewählten *OCT4*-Region in putativen induzierten pluripotenten Stammzellklonen (iPS-Zellen), generiert aus der USSC-Linie SA8/25, untersucht.

Für die Generierung von iPS-Zellen wurde ein retroviraler Vektor, der die DNA der Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und C-MYC enthält in USSC der Linie SA8/25 transfiziert (Zaehres et al., 2010). Zur Verifizierung, ob die transfizierten USSC reprogrammiert wurden, wurden die putativen iPS hinsichtlich ihrer Morphologie, ihrer molekularen Signatur, ihrem Differenzierungspotentials und ihrer Möglichkeit zur Teratombildung untersucht (Zaehres et al., 2010). Eine weitere Untersuchung beinhaltete die Analyse des DNA-Methylierungsmusters der putativen iPS-Zellen. Ein Teil der DNA-Methylierungsanalyse, nämlich die Erhebung des DNA-Methylierungsstatus eines Bereichs innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens war Gegenstand meiner Arbeit. Die hier gezeigten Ergebnisse sind in die Publikation von Zaehres et al. mit eingeflossen (Zaehres et al., 2010).

Die Reprogrammierung wurde im Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin in Münster durchgeführt (Zaehres et al., 2010) und die DNA dieser Zellen für die DNA-Methylierungsanalyse im Rahmen dieser Arbeit bereitgestellt.

In der Abb. 19 ist das Ergebnis der Methylierungsanalyse der 22 untersuchten CpGs in der ausgewählten *OCT4*-Region in den putativen iPS-Zellen sowie zum Vergleich das Methylierungsmuster der Ausgangszelllinie USSC SA8/25 dargestellt. Bei dem Ergebnis der USSC-Linie SA8/25 handelt es sich um die bereits bekannten Daten, die in dem Kapitel 4.1.1 aufgeführt sind.

Die drei putativen iPS-Klone weisen eine unterschiedliche durchschnittliche Methylierung auf, so ist der putative iPS-Klon I mit einer durchschnittlichen Methylierung von 10 % deutlich weniger methyliert als die Ausgangszelllinie USSC SA8/25 mit 49 %. Insgesamt weisen 10 der 16 untersuchten Klone des putativen iPS-Klon I einen vollständig demethylierten Status auf (Abb. 19 A und B).

Die Klone IV und X hingegen unterscheiden sich mit einer durchschnittlichen DNA-Methylierung von 45 % und 33 % nicht stark von der Ursprungszelle. Bei den beiden Klonen IV und X gibt es nur vereinzelte Klone, die völlig frei von Methylierung sind (Abb. 19 C und D).

Es fällt auf, dass in den putativen iPS-Klonen IV und X anders als in der Ursprungslinie USSC SA8/25 die CpG-Position 5 vorhanden ist. Der putative iPS-Klon I weist ebenso wie die Ursprungslinie USSC SA8/25 ein fehlendes CpG an Position 5 auf.

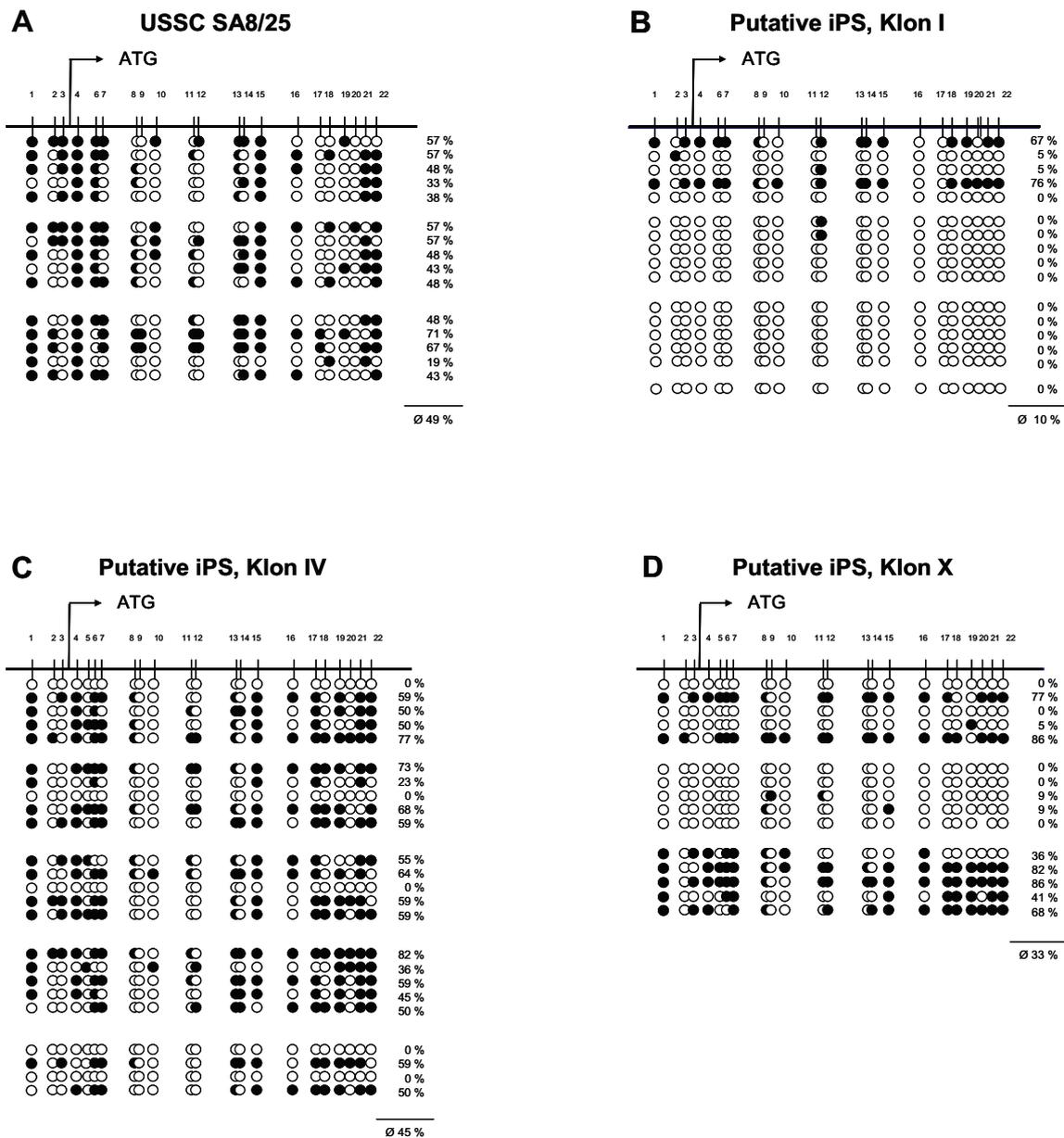


Abb. 19 Ergebnis der DNA-Methylierungsanalyse in putativen iPS-Zellen.

DNA-Methylierungsmuster der 22 untersuchten CpGs in dem ausgewählten Bereich innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens nach Sequenzierung bisulfitkovertierter DNA in nativen USSC SA8/25 (A), putativen iPS Klon I (B), Klon IV (C), und Klon X nach retroviraler Transfektion der Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *C-MYC* in USSC der Linie SA8/25. Die Darstellungsweise entspricht derjenigen in der Abb. 13.

Die Abb. 20 zeigt die durchschnittliche Gesamtmethylierung des untersuchten Bereichs in USSC SA8/25 und in den drei putativen induzierten pluripotenten Stammzell-Klonen aus der USSC-Linie SA8/25. Hier zeigt sich, dass die DNA-Methylierung nach Einleitung der Reprogrammierung der USSC in dem putativen iPS-Klon I um 80 % abgenommen hat, in dem iPS-Klon IV um 8 % und in dem iPS-Klon X um 33 %. Nach Durchführung des Student's t-Tests zeigte sich, dass die DNA-Methylierung bei dem iPS Klon I signifikant ($p < 0,001$) niedriger ist als in der Ursprungszelle USSC SA8/25. Bei den iPS Klonen IV und X ist die DNA-Methylierung im Vergleich mit der Ursprungszelle nicht signifikant niedriger.

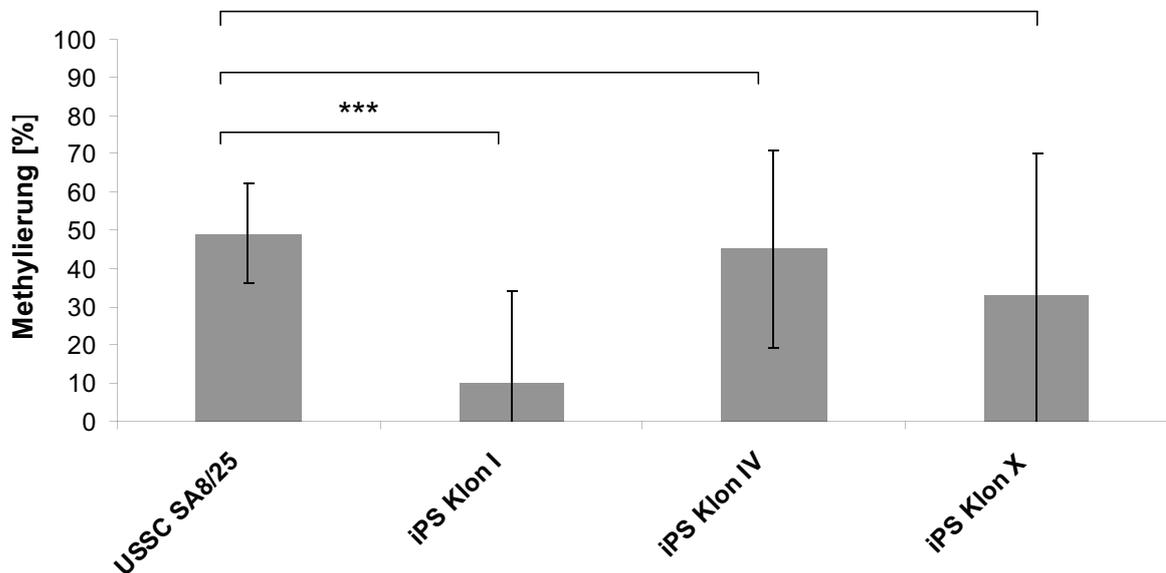


Abb. 20 Vergleich der durchschnittlichen DNA-Methylierung der 22 CpGs innerhalb der ausgewählten OCT4-Region für die iPS Klone I, IV und X sowie der Ursprungszelle USSC SA8/25.

Aufgetragen ist jeweils der Durchschnittswert der Methylierung aller Klone je Zellpopulation (USSC SA8/25: $n=15$, iPS Klon I: $n=16$, iPS Klon IV: $n=24$, iPS Klon X: $n=15$) sowie die zugehörige Standardabweichung. Students T-Test wurde durchgeführt (** $p < 0,001$, kein Sternchen: nicht signifikant).

4.2. Nachweis von OCT4 Expression auf mRNA-Ebene

In dieser Versuchsreihe sollte die OCT4-Expression auf mRNA-Ebene in verschiedenen USSC-Linien mittels quantitativer Real-time PCR (siehe Kapitel 3.5.2) nachgewiesen werden.

Es wurden die USSC-Linien SA4/146, SA4/101, SA5/60, SA5/73 und SA8/25 verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurde die embryonale Stammzelle ES I3 herangezogen, da bereits bekannt ist, dass embryonale Stammzellen OCT4 exprimieren (Boiani and Schöler, 2005). Die ausdifferenzierte NK-Zelle wurde als Negativ-Kontrolle verwendet.

Die Abb. 21 zeigt die relative Expression von OCT4 auf Transkriptionsebene der USSC-Linien SA4/146, SA4/101, SA5/60, SA5/73, SA8/25 sowie der NK-Zellen im Vergleich zu ES I3. Es wurde auf ES I3 normiert (1,0), da embryonale Stammzellen OCT4 exprimieren (Boiani and Schöler, 2005). Die relative OCT4-Expression in den untersuchten USSC-Linien liegt im kaum detektierbaren Bereich von 0,0001 bis 0,0006. In NK-Zellen beträgt die relative OCT4-Expression 0,004.

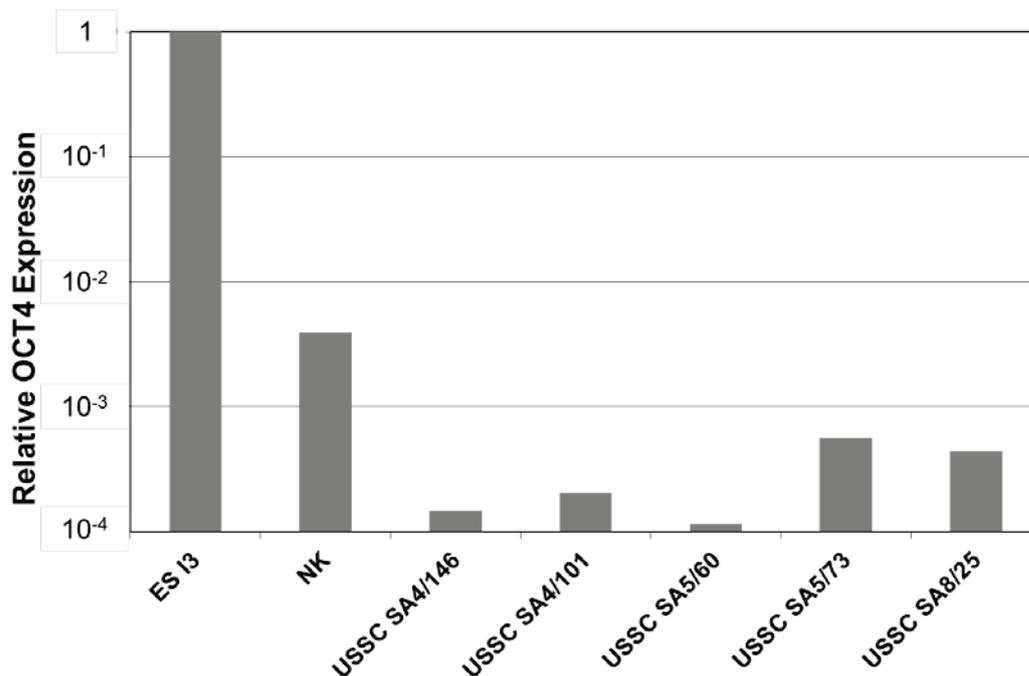


Abb. 21 Relative OCT4-Expression auf Transkriptionsebene in USSC.

Vergleich der relativen OCT4-Expression auf Transkriptionsebene in den Zelllinien ES I3, USSC SA4/146, SA4/101, SA5/60, SA5/73 und SA8/25 sowie in primären NK-Zellen mittels quantitativer Real-time PCR. Eingesetzt wurden jeweils 40 ng cDNA der oben genannten Zellen. Normalisiert wurde gegen β -Actin. Die relative Expression wurde jeweils in Bezug auf ES I3 gesetzt ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Angezeigt sind die Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte aus je drei technischen Replikaten. Die Expressionswerte sind auf einer logarithmischen Skala dargestellt.

4.3. Nachweis von OCT4-Expression auf Proteinebene

Auf Transkriptebene konnte keine OCT4-Expression in USSC nachgewiesen werden. Um endgültig die Frage zu klären, ob USSC OCT4 exprimieren, wurde mittels Westernblot untersucht, ob auf Proteinebene OCT4 gebildet wird.

Es wurden Proteinlysate der USSC-Linien SA4/164, SA5/73, SA4/101 und SA5/60, der ES-Zelle MEL-1, sowie der Zelllinie NK 92 eingesetzt. Die ES-Zelle dient als Positiv-Kontrolle, da sie nachgewiesenermaßen OCT4 bildet. NK 92 dient als Negativkontrolle, da sie als ausdifferenzierte Zelle kein OCT4 exprimiert.

Der primäre Antikörper α -Oct-3/4 (N-19) erkennt das Protein OCT4 mit dem Molekulargewicht von 43-50 kDa (gemäß Herstellerangaben).

In der Abb. 22 ist das Ergebnis des Westernblots dargestellt. Wie erwartet, zeigt sich bei der ES-Zelle eine starke Bande im Bereich von 43 kDa, entsprechend dem Molekulargewicht des OCT4-Proteins. Bei der NK-Zelllinie erscheint keine Bande. In den vier USSC-Linien sind deutlich Banden zu erkennen, diese laufen allerdings tiefer als 40 kD.

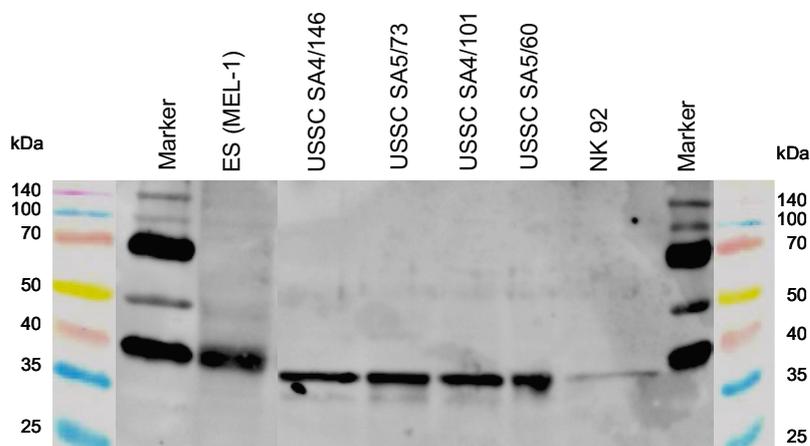


Abb. 22 Westernblot zum Nachweis der OCT4-Expression.

Es wurden je 10 μ g Protein der Zellen ES (MEL-1 human embryonic stem cell), USSC SA4/146, SA5/73, SA4/101, SA5/60 und NK 92 auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde auf eine Hybond-P PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit dem primären Ziegen- (goat) Antikörper α -Oct3/4 (N-19) inkubiert, der humanes OCT4-Protein bei einer Größe von 43-50 kDa erkennt. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper donkey anti-goat IgG-HRP inkubiert. Sichtbar gemacht wurde der Westernblot mit dem Amersham Detektiersystem.

Da die Banden bei den USSC-Linien etwas tiefer gelaufen sind als bei der ES-Zelle wurde ein weiterer Westernblot unter Verwendung eines spezifischen OCT4-Blockingpeptids durchgeführt. Damit sollte geklärt werden, ob es sich um eine spezifische Bindung an das Protein OCT4 oder um eine unspezifische Antikörperbindung handelt.

Der Westernblot wurde parallel mit und ohne Blockingpeptid durchgeführt. Das spezifische Blockingpeptid wurde im Überschuss mit dem primären Antikörper α -Oct-3/4 (N-19) vorinkubiert. Er kann dann nicht mehr an das Antigen des OCT4-Proteins binden, so dass keine Bande erscheint, wo eine spezifische Bande normalerweise zu erwarten wäre (bei ungefähr 43 kDa). Erscheint dennoch eine Bande, so handelt es sich um eine unspezifische Bindung.

Das Ergebnis des Westernblots unter Verwendung des Blockingpeptids ist in der Abb. 23 dargestellt. Abb. 23 A zeigt das Ergebnis des Westernblots ohne Blockingpeptid, Abb. 23 B den parallel durchgeführten Westernblot mit Blockingpeptid. In Abb. 23 A ist wie in dem zuvor durchgeführten Westernblot (Abb. 22) eine starke Bande in Höhe von 43 kDa bei ES-Zellen zu sehen, sowie schwächere aber deutliche Banden bei USSC, die tiefer zu liegen scheinen. In Abb. 23 B, im Durchgang mit Blockingpeptid, ist bei den ES-Zellen keine Bande zu sehen. Der primäre Antikörper wurde neutralisiert, so dass die zuvor gesehene Bande bei den ES-Zellen spezifisch für OCT4 ist. Bei USSC und etwas schwächer bei der NK-Zelllinie 92 sind weiterhin die Banden zu sehen. Damit ist nachgewiesen, dass es sich nicht um eine spezifische Bindung an das Protein OCT4, sondern um unspezifische Bindungen des primären und/oder sekundären Antikörpers handelt. Somit ist in den USSC keine Expression von OCT4 auf Proteinebene nachweisbar.

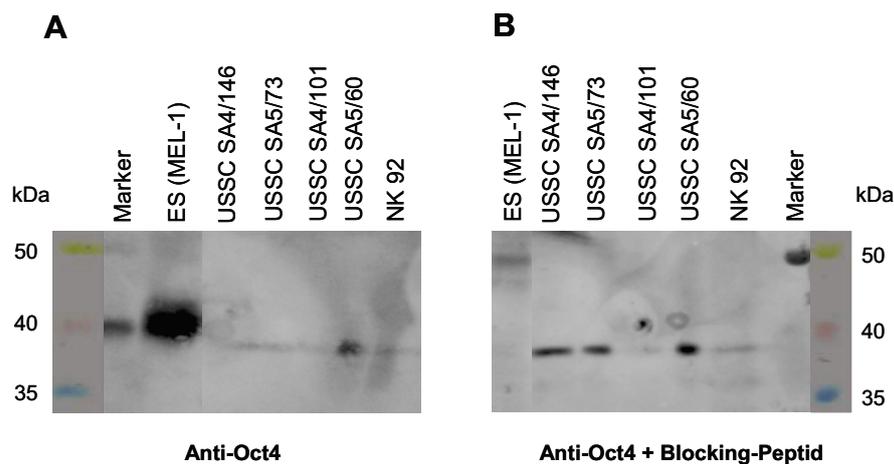


Abb. 23 Westernblot zum Nachweis einer OCT4-Expression, Durchführung mit und ohne Blockingpeptid.

Der Westernblot wurde wie in der Abb. 22 beschrieben durchgeführt (A). Zusätzlich wurde in (B) der primäre Antikörper (α -Oct3/4 (N-19) mit dem spezifischen Blockingpeptid im Verhältnis 1:2 (doppelte Menge des Blockingpeptids) vorinkubiert.

4.4. Vergleichende OCT4-Promotoraktivitätsmessung mittels Luciferase-Assay

Im Rahmen der Bisulfitkonvertierung und Sequenzierung eines ausgewählten Bereichs innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens wurde in der USSC-Linie SA8/25 eine Punktmutation gefunden. In Exon 1 befindet sich an Position 21 (gezählt von dem Translationsstart) anstelle der Nukleinbase Guanin die Nukleinbase Adenin. Literaturrecherchen ergaben, dass diese Punktmutation eine von vielen Polymorphismen im *OCT4*-Gen ist (Hussain et al., 2008). Bei dieser Punktmutation handelt es sich jedoch um die Besonderheit, dass aus der Basenabfolge CG die Basenabfolge CA wird und somit in der USSC-Linie SA8/25 in der analysierten Sequenz ein CpG weniger vorhanden ist. Dadurch, dass ein CpG verloren geht, kann an dieser Stelle keine Methylierung stattfinden. Es wurde untersucht, ob diese Punktmutation durch das fehlende CpG Auswirkungen auf die Promotoraktivität hat.

Zunächst wurde aus genomischer DNA der *OCT4*-Minimalpromotor (*OCT4 -230-0 Promotor*) und der *OCT4*-Minimalpromotor mit dem 5'-Ende des *OCT4*-Gens (die ersten 35 Basenpaare des Exons 1, gezählt von dem Translationsstart) mit (*OCT4 -230-35 pm Promotor*) und ohne Punktmutation (*OCT4 -230-35 Promotor*) isoliert. Die drei Sequenzen *OCT4 -230-0 Promotor* (*OCT4*-Minimalpromotor), *OCT4 -230-35 Promotor* und *OCT4 -230-35 pm Promotor* wurden mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden mithilfe entsprechender Primer Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII (sense Primer für alle drei Sequenzen) und NcoI bzw. BspHI (antisense Primer für *OCT4 -230-35 Promotor* bzw. *OCT4 -230-35bp pm Promotor*) angehängt.

Anschließend wurden die PCR-Produkte mit diesen Restriktionsenzymen verdaut und in den Vektor pMOD-LucShS v02 kloniert, der zuvor mit den Restriktionsenzymen NcoI und HindIII linearisiert wurde. Der Vektor pMOD-LucShS v02 enthält ein synthetisches LucSh-Fusionsgen (Luciferase), das für das Enzym Firefly-Luciferase kodiert. Mit Hilfe der Luciferaseaktivitätsmessung kann die Aktivität des jeweils vorgeschalteten Promotors gemessen werden.

Das Startcodon ATG in den Sequenzen *OCT4 -230-35 Promotor* und *OCT4 -230-35 pm Promotor* wurde beibehalten und die Sequenzen so in den Vektor pMOD-LucShS v02 kloniert, dass kein *Readingframe shift* entsteht.

Die Sequenz *OCT4 -230-0 Promotor* (*OCT4*-Minimalpromotor) enthält kein Startcodon, dementsprechend besitzt der fertige Vektor lediglich das ATG des Luciferase-Gens. Die Abbildungen Abb. 24 und Abb. 25 stellen schematisch und auf Sequenzebene die Klonierstrategie dar.

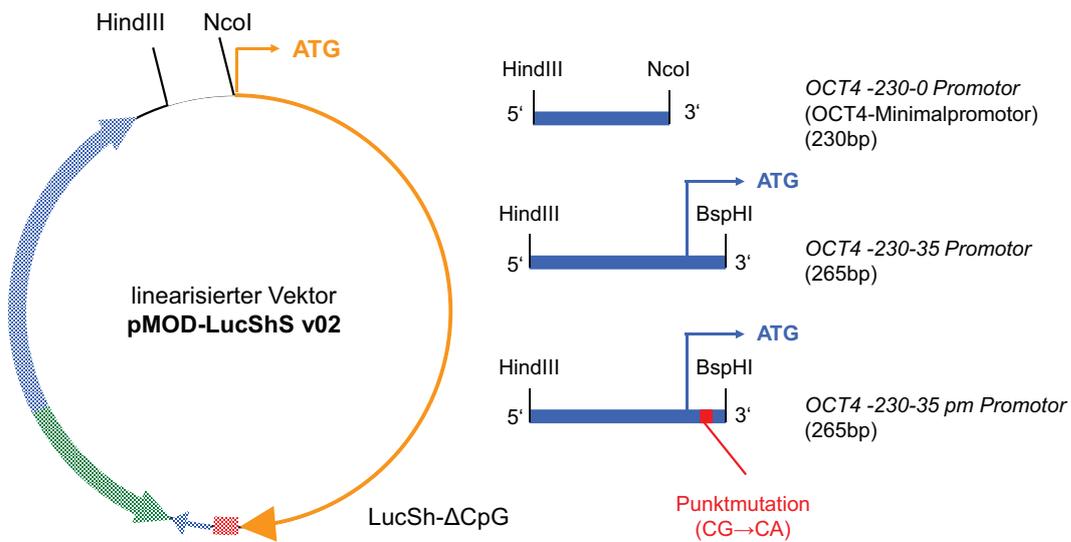
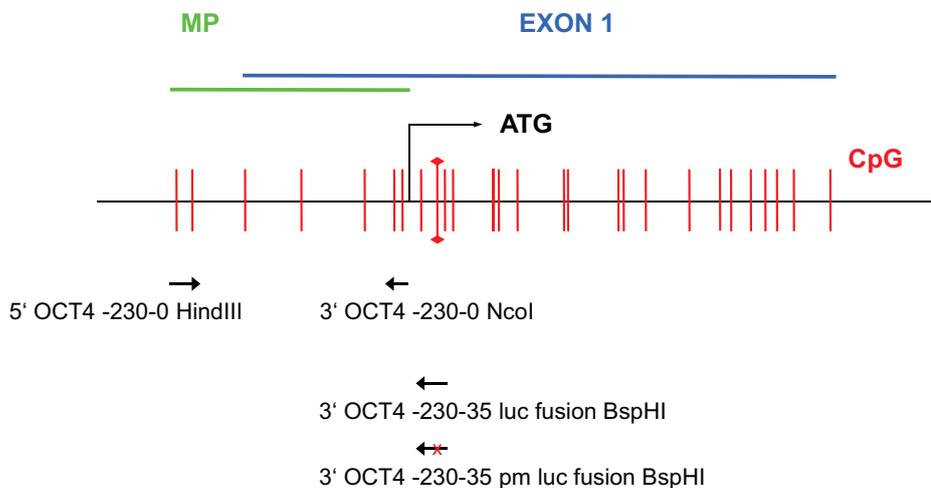


Abb. 24 Schematische Darstellung der Klonierung.

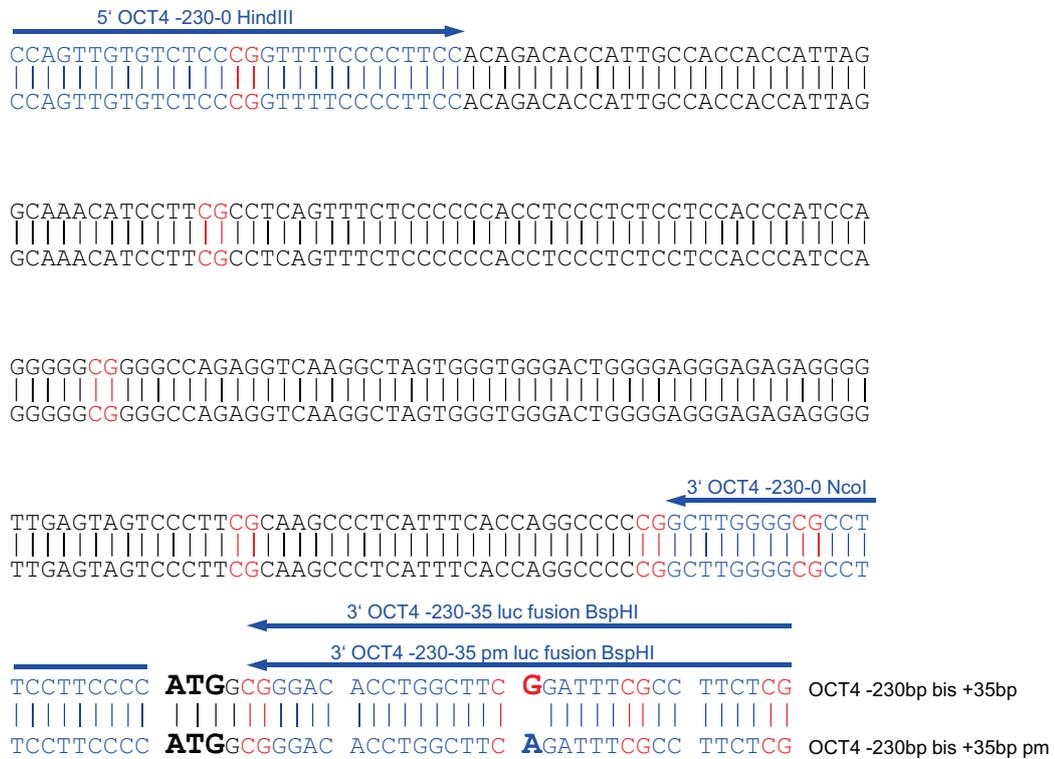
Es sind die drei Sequenzen OCT4 -230-0 Promotor (OCT4-Minimalpromotor), OCT4 -230-35 Promotor und OCT4 -230-35 pm Promotor nach Amplifizierung mittels PCR dargestellt. Mit Hilfe entsprechender Primer wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII/NcoI bzw. HindIII/BspHI angehängt. Der Vektor pMOD-LucShS v02 wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und NcoI linearisiert. NcoI und BspHI erschaffen identische überhängende Enden, sodass auch die HindIII/BspHI-PCR-Produkte in-frame in den Vektor passen. Mit den Sequenzen OCT4 -230-35 Promotor und OCT4 -230-35 pm Promotor wurde das sequenzeigene ATG von OCT4 in den Vektor pMoD-LucShS v02 mit hinein kloniert, unter Erhalt des offenen Leserasters. Die detaillierten Sequenzen sind der Abb. 10 zu entnehmen.

A

Chromosom 6p21.31



B

**Abb. 25 Grundlagen der Klonierung.**

(A) Schematische Darstellung des OCT4-Genabschnitts, der als Grundlage für die OCT4-Promotoraktivitätsmessung dient. Es sind der Minimalpromotor (MP) und das Exon 1 des OCT4-Gens mit der Lage der CpG-Dinukleotide abgebildet. Das CpG-Dinukleotid, das in der USSC-Linie SA8/25 durch eine Punktmutation verloren geht, wurde hervorgehoben. Zudem ist die Lage der Primer, die für die Amplifikation der drei Sequenzen verwendet wurden, dargestellt. Die Primer 5' OCT4 -230-0 HindIII und 3' OCT4 -230-0 NcoI amplifizieren den OCT4-Minimalpromotor. Die Primer 5' OCT4 -230-0 HindIII und 3' OCT4 -230-35 luc fusion BspHI amplifizieren den OCT4-Minimalpromotor mit dem 5' Ende des Exons 1 ohne die Punktmutation (OCT4 -230-35 Promotor). Die Primer 5' OCT4 -230-0 HindIII und 3' OCT4-230-35 pm luc fusion BspHI amplifizieren den OCT4-Minimalpromotor mit dem 5'-Ende des Exon 1, der die Punktmutation enthält (OCT4 -230-35 pm Promotor). Das sequenzeigene Startcodon ATG in den Sequenzen OCT4 -230-35 Promotor und OCT4 -230-35pm Promotor wurde bei der Klonierung in den Vektor beibehalten. Daher wurden die beiden antisense-Primer so konzipiert, dass das offene Leseraster des Vektor beibehalten wurde.

(B) Darstellung des OCT4-Genabschnitts auf Sequenzebene. Abgebildet ist ein Alignment der USSC-Linie SA5/73 und SA8/25, bei der das Cytosin durch ein Guanodin (konservativer Austausch) ersetzt wurde. Der Translationsstart (ATG) ist fett markiert. Die CpG-Dinukleotide sind rot gefärbt. Die Bindungsstellen der Primer sind blau markiert.

Die nach der Klonierung erhaltenen Konstrukte *pMOD-OCT4 -230-0 Promotor (OCT4-Minimalpromotor)*, *pMOD-OCT4 -230-35 Promotor* und *pMOD-OCT4 -230-35 pm Promotor* wurden in HEK 293T Zellen transfiziert. Anschließend wurde die relative Promotoraktivität der jeweiligen Konstrukte mittels Luciferase-Assay gemessen.

Für die Transfektion wurde die HEK 293T-Zelle gewählt, da es sich um eine embryonale Zelllinie handelt, bei der die Transfektion etabliert ist. Sie eignet sich daher als Modellzelle, um die Konstrukte zu testen.

Um Messfehler aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen auszugleichen, wurden die zu untersuchenden Konstrukte mit dem Reportervektor pRL-TK (=Renilla Luciferase Reporter-Vektor) co-transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion die Luciferaseaktivität gemessen. Die Luciferaseaktivität der Firefly-Luciferase wurde gegen die Luciferaseaktivität der Renilla-Luciferase normalisiert.

Der Versuch wurde zweimal unter gleichen Bedingungen mit je vier technischen Replikaten durchgeführt. Für die Vergleichbarkeit wurde die relative Fluoreszenzaktivität auf den pMOD-Leervektor normalisiert. Dazu wurde die Fluoreszenzaktivität des Leervektors als 100 % gesetzt und die übrigen Fluoreszenzaktivitäten in Relation zu der des Leervektors gesetzt.

Es zeigt sich, dass alle Konstrukte eine Promotoraktivität aufweisen, indem sie zu einer messbaren Expression der Luciferase führen (Abb. 26). Desweiteren zeigt sich, dass die drei Vektoren *pMOD OCT4 -230-0 Promotor (OCT4-Minimalpromotor)*, *pMOD OCT4 -230-35 Promotor* und *pMOD OCT4 -230-35 pm Promotor* eine deutlich höhere OCT4-Promotoraktivität als der Vektor pMOD LucShS v02 aufweisen. Die höchste relative Promotoraktivität weist der Vektor *pMOD OCT4 -230-0 Promotor (OCT4-Minimalpromotor)* auf, sie beträgt das Sechsfache der Aktivität des Vektors pMOD LucShS v02. Die Vektoren *pMOD OCT4 -230-35 Promotor* und *pMOD OCT4 -230-35 pm Promotor* zeigen lediglich eine 4,4- bis 4,8-fach höhere Aktivität im Vergleich zum Vektor pMOD LucShS v02 und haben somit eine geringere Aktivität als der Vektor *pMOD OCT4 -230-0 Promotor (OCT4-Minimalpromotor)*. Die relative OCT4-Promotoraktivität zwischen den Vektoren *pMOD OCT4 -230-35 Promotor* und *pMOD OCT4 -230-35 pm Promotor* unterscheiden sich nicht signifikant.

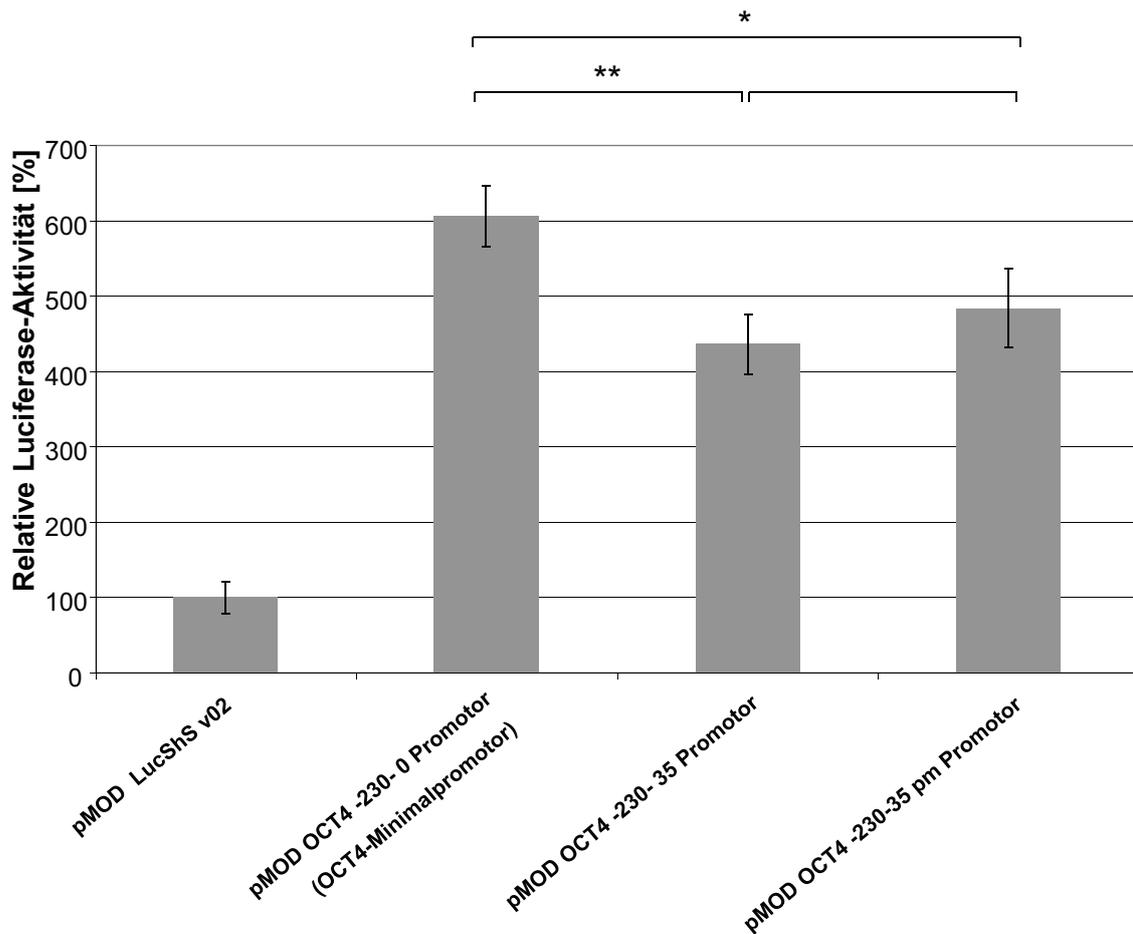


Abb. 26 Ergebnis der vergleichenden OCT4-Promotoraktivitätsmessung.

Vergleich der Promotoraktivitäten der Fragmente OCT4 -230-0 Promotor (OCT4-Minimalpromotor), OCT4 -230-35 Promotor und OCT4 -230-35 pm Promotor mittels Luciferaseaktivitätsmessung. Die Fragmente wurden in den Vektor pMOD-luc-shS v02 kloniert. Um die Promotoraktivitäten der Fragmente pMOD OCT4 -230-0 Promotor (OCT4-Minimalpromotor), pMOD OCT4 -230-35 Promotor und pMOD OCT4 -230-35 pm Promotor zu vergleichen, wurden die Konstrukte in HEK293T-Zellen transfiziert. Jedes Konstrukt wurde mit dem Vektor pRL-TK (Renilla-Luciferase) co-transfiziert und die Firefly-luciferase-Aktivität nach 24 h gemessen. Die Aktivität der Firefly-Luciferase wurde gegen die Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert. Dargestellt ist die relative Fireflyluciferase-Aktivität der Vektoren pMOD-230-0 Promotor (OCT4-Minimalpromotor), pMOD-230-35 Promotor, pMOD-230-35 pm Promotor und des Leervektors pMOD. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei biologischen Replikaten mit je vier technischen Replikaten. Normalisiert wurde auf die Firefly-luciferase-Aktivität des Vektors pMOD LucShS v02 (100 %). Es wurde der Students-T-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, kein Sternchen: nicht signifikant).

5. Diskussion

5.1. DNA-Methylierungsanalyse der 22 CpGs innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens in USSC

Der Transkriptionsfaktor OCT4 ist mit entscheidend für den Erhalt der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen (ESC). In der embryonalen Stammzelle, die fast die einzige Zelle ist, die OCT4 exprimiert, ist die regulatorische Region des *OCT4*-Gens unmethyliert. Mit zunehmender Differenzierung nimmt zeitgleich auch die Methylierung der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens zu. In differenzierten Zellen schließlich ist keine OCT4-Expression vorhanden, die regulatorische Region des *OCT4*-Gens ist nahezu vollständig methyliert (Deb-Rinker et al., 2005). Die unrestringierte somatische Stammzelle (USSC), eine von Frau Prof. Kögler entdeckte Zellpopulation aus humanem Nabelschnurblut, ist eine pluripotente Zelle, die in alle drei Keimblätter differenzieren kann. (Kögler et al., 2004). Der DNA-Methylierungsstatus der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens war in der relativ neuartigen Zelle bisher unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der DNA-Methylierungsstatus einer ausgewählten Region innerhalb der regulatorischen Region und des Exons 1 des *OCT4*-Gens in der unrestringierten somatischen Stammzelle (USSC) erhoben und mit dem DNA-Methylierungsstatus derselben Region in Zellen verschiedener Differenzierungsstadien verglichen.

Ausgewählt wurde ein 469 bp langes Fragment innerhalb des Minimalpromotors und dem Exon 1 des *OCT4*-Gens (siehe Abb. 12). Da der humane *OCT4*-Promotor nicht klar definiert ist (Deb-Rinker et al., 2005), wurde ein Bereich aus der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens, basierend auf den vergleichenden Analysen der stromaufwärts gelegenen *OCT4*-Region von Nordhoff et al. (Nordhoff et al., 2005) und mit Hilfe des Onlineprogramms *CpG Island searcher* (Definition: % CG = 50 %; ObsCpG/ExpCpG = 0,6; Länge 200 bp; Abstand zu angrenzenden CpG-Inseln 100 bp) gewählt.

In der Publikation von Yang et al. (Yang et al., 2005) wurde ein möglicher *OCT4*-Minimalpromotor mittels Promotoraktivitätsmessung in humanen embryonalen Karzinom-Zellen identifiziert. Diese *OCT4*-Minimalpromotor-Sequenz weist kaum CpGs auf, sodass DNA-Methylierung vermutlich wenig Einfluss auf diese Region hat.

Bei der Literaturrecherche fällt auf, dass alle Arbeitsgruppen, die den DNA-Methylierungsstatus der *OCT4*-Promotorregion untersuchen, unterschiedliche Sequenzen zugrunde legen, die unterschiedlich lang und unterschiedlich deckungsgleich sind, sowie eine variierende Anzahl von CpGs aufweisen (Marikawa et al., 2005; Zhang et al., 2008; Park et al., 2008; Takahashi and

Yamanaka, 2006). Es existiert kein klar definierter Bereich innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens, der relevant für die DNA-Methylierung ist.

In dieser Arbeit wurde für die DNA-Methylierungsanalyse wie eingangs beschrieben ein Bereich innerhalb des *OCT4*-Minimalpromotors und Exons 1 des *OCT4*-Gens, der sehr viele CpGs aufweist und somit für die DNA-Methylierung relevanter zu sein scheint, ausgesucht. Verglichen mit den Sequenzen anderer Arbeitsgruppen, ist die hier analysierte Sequenz länger, weist mehr CpGs auf und befindet sich stromabwärts im translatierten Bereich. Nicht nur die Promotorregion, sondern auch die stromabwärts gelegenen Regionen sind von funktioneller Relevanz für die Genexpression. In der Publikation von Hsieh wird dargestellt, dass auch unmittelbar stromabwärts an den Promotor angrenzende methylierte Regionen die Transkription behindern. Hsieh zeigt mittels Genreporter-Assays, dass die Methylierung innerhalb der kodierenden Region des Luciferasegens die Genexpression um das ca. 10-fache reduziert und somit einen Einfluss auf die Genexpression nimmt (Hsieh, 1997).

Brenet et al. konnten zeigen, dass die DNA-Methylierung des Exon 1 mit der Genexpression korreliert. Eine ausgeprägte Methylierung des Exon 1 führte zu einer Verminderung der Genexpression. War eine Genexpression nachweisbar, zeigte sich Exon 1 hypomethyliert. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass die Methylierung von Exon 1 stark mit einer Verminderung der Genexpression korreliert (Brenet et al., 2001). Basierend auf diesen Erkenntnissen ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit untersuchte Region innerhalb des regulatorischen Bereichs des *OCT4*-Gens, der einen Teil des *OCT4*-Minimalpromotors und Exon 1 umfasst, von funktioneller Relevanz ist.

Die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalyse zeigen, dass die analysierte Region in USSC signifikant stärker methyliert ist als in der embryonalen Stammzelle. Im Gegensatz zu der differenzierten NK-Zelle ist der Bereich innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens in USSC signifikant weniger methyliert. Somit ähnelt die USSC in ihrem DNA-Methylierungsmuster der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens weder dem einer embryonalen Stammzelle, noch einer ausdifferenzierten Zelle.

Es stellte sich die Frage, ob der DNA-Methylierungsstatus des ausgewählten Bereichs innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens in USSC mit einer Expression von *OCT4* einhergeht. Mittels quantitativer RT-PCR ließ sich auf mRNA-Ebene keine *OCT4*-Transkription in den untersuchten USSC-Linien detektieren. Auch im Westernblot war kein *OCT4*-Protein in den USSC nachweisbar. Somit exprimiert die USSC weder auf Transkript- noch auf Proteinebene *OCT4*.

Weder die NK-Zelle noch die USSC exprimieren OCT4, obwohl sich die DNA-Methylierung in dem untersuchten Bereich innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens signifikant unterscheiden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass zelltyp- bzw. gewebespezifische Unterschiede des DNA-Methylierungsmusters existieren. Schneider et al. konnten zeigen, dass die durchschnittliche DNA-Methylierung u. A. des *OCT4*-Promotors je nachdem, ob man Proben aus Chorionzotten oder aus Blut- oder Hirngewebe betrachtet, variiert (Schneider et al., 2010). Es scheint einen weiten Bereich zu geben, in dem die durchschnittliche DNA-Methylierung je nach Zell- bzw. Gewebeart divergiert, ohne dass sie zu einer Änderung der Genexpression führt (keine OCT4-Expression in differenzierten Zellen).

Hsieh fand mittels Luciferasereporter-Assay heraus, dass der Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Genexpression nicht linear, sondern exponentiell ist. D.h. schon eine geringe durchschnittliche DNA-Methylierung eines Gen-Abschnitts führt zu einer nahezu vollständigen Herunterregulierung der Genexpression. Nimmt die durchschnittliche DNA-Methylierung nur wenig zu, ist keine Genexpression mehr nachweisbar (Hsieh, 1994). Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass trotz signifikanter Unterschiede in der DNA-Methylierung in dem untersuchten Bereich zwischen USSC und NK-Zellen in beiden Zellen keine OCT4-Expression stattfindet.

Bei der Analyse des DNA-Methylierungssatus in USSC muss berücksichtigt werden, dass durch die Kultivierung der Zellen das DNA-Methylierungsmuster verfälscht werden kann. So führt eine ausgedehnte Zellkultur mit vielen Passagen zu Veränderungen der Methylierung (Meissner et al., 2008). Die Zellkultur war nötig um eine ausreichend hohe Zellzahl für die durchgeführten Untersuchungen zu erreichen. Um jedoch artifizielle Methylierung durch lange Zellkultur weitgehend auszuschließen, wurden Zellen aus möglichst kurzzeitiger Kultur (maximal sieben Passagen) verwendet. Um also das „wahre“ DNA-Methylierungsmuster in USSC zu bestimmen, dass nicht durch die Zellkultur und damit verbundenen Behandlung der adhärent wachsenden Zellen beeinflusst wurde, müssten die primären, direkt frisch aus dem Nabelschnurblut gewonnen USSC verwendet werden. Da die Zahl der aus frischem Nabelschnurblut gewonnenen USSC sehr gering ist, lassen sich Analysen ohne vorherige Kultivierung zur Vermehrung der Zellzahl schwer durchführen.

Bei der Analyse der DNA-Methylierung in dem ausgewählten Bereich innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens fiel auf, dass bei den untersuchten USSC-Linien die DNA-Methylierung an den einzelnen CpG-Positionen variierte. Aber bestimmte CpG-Positionen, vor allem der Bereich der die CpG-Postionen 9-12 umfasst, sind in nahezu allen untersuchten USSC-Linien unmethyliert. Ebenso schwankt die Standardabweichung in diesem Bereich weniger stark,

als Hinweis dafür, dass die CpG-Positionen 9-12 in allen fünf USSC-Linien weniger methyliert sind. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass an dieser Stelle Transkriptionsfaktoren binden. In CpG-reichen Regionen ist die Wahrscheinlichkeit für die Bindung von Transkriptionsfaktoren erhöht (Deaton and Bird, 2011). Zudem scheint die Bindung von Transkriptionsfaktoren während der Entwicklung dafür zu sorgen, dass dieser Bereich vor Methylierung geschützt wird. So binden z.B. die Transkriptionsfaktoren RAR beta und p53 an *OCT4* (Ovitt and Schöler, 1998; Sylvester and Schöler, 1994; Li et al., 2012). Die Transkriptionsfaktoren RAR und p53 sind mit der Herunterregulation der *OCT4*-Expression assoziiert (Sylvester and Schöler, 1994; Li et al., 2012). Betrachtet man die in dieser Arbeit analysierte *OCT4*-Gensequenz (469 bp lange Sequenz innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens) mit einem Programm, das potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren an einer DNA-Sequenz ermittelt, stellt sich heraus, dass RAR und p53 potentiell im Bereich des Genabschnitts, in dem sich die CpG-Positionen 9-12 befinden, binden können (Online-Programm ALGGEN-PROMO). Es ist also vorstellbar, dass im Zuge der Herunterregulierung der *OCT4*-Expression damit assoziierte Transkriptionsfaktoren an der DNA binden. In diesem Bereich kann dann die Methyltransferase, die für die DNA-Methylierung verantwortlich ist, die ebenfalls an der Regulation der Genexpression beteiligt ist, nicht binden, sodass dieser Bereich, die CpG-Positionen 9-12, aufgrund der Konkurrenz um die Bindungsstelle, nicht methyliert wird.

5.1.1. DNA-Methylierungsstatus in nativen USSC nach 14-tägiger Osteodifferenzierung

Yeo et al. konnten in *embryonic bodies* zeigen, dass die DNA-Methylierung in Promotorregionen von Stammzellgenen wie z.B. dem *OCT4*-Gen mit fortschreitender Differenzierung zunimmt. Gleichzeitig geht die zunehmende DNA-Methylierung mit einer abnehmenden Genexpression einher (Yeo et al., 2007).

Ebenso konnte die Gruppe um Deb-Rinker belegen, dass während der neuronalen Differenzierung von humanen NT2-Zellen die DNA-Methylierung der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens schrittweise zunimmt, während die *OCT4*-Expression schrittweise abnimmt (Deb-Rinker et al., 2005).

Daher wurde der DNA-Methylierungsstatus in dem ausgewählten Bereich innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens der USSC-Linien SA4/146 und SA5/73 nach 14-tägiger Osteodifferenzierung untersucht und mit dem DNA-Methylierungsstatus der entsprechenden Region in nativen USSC verglichen.

In den analysierten USSC-Linien ließen sich keine signifikanten Änderungen der prozentualen DNA-Methylierung in der untersuchten Region in den verschiedenen Differenzierungsstadien feststellen.

Im Gegensatz zu den zuvor zitierten Arbeiten von Yeo et al. und Deb-rinker et al. weist die in dieser Arbeit herangezogene Vergleichszelle USSC nativ bereits einen zu ca. 50 % methylierte Promotorregion auf, wohingegen die Referenzzellen bei den Autoren Yeo et al. (ES-Zellen) und Deb-Rinker et al. (humane NT2-Zellen) jeweils einen freien *OCT4*-Promotor aufweisen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde für den Vergleich des DNA-Methylierungsstatus der *OCT4*-Region in USSC nativ mit USSC osteo jeweils DNA aus der gleichen Zelllinie, jedoch nicht aus ein und der selben Kultur verwendet. Von den USSC ist bekannt, dass sie unter Zellkulturbedingungen spontan osteogen differenzieren (Langenbach et al., 2010). Daher ist nicht auszuschließen, dass eine unterschiedlich ausgeprägte spontane osteogene Differenzierung in den verschiedenen Kulturen das Ausmaß der DNA-Methylierung beeinflusst hat. Um diese Ungewissheit zu minimieren, müsste in einem neuen Versuchsansatz aus einem Zellkulturansatz mit USSC zu einem frühen Zeitpunkt DNA gewonnen werden, die verbliebenen Zellen weiter kultiviert und nach Induktion der Osteodifferenzierung die DNA dieser Zellen für den Vergleich des DNA-Methylierungsstatus verwendet werden.

Zudem müssten insgesamt mehr USSC-Linien untersucht werden, um die erhobenen Ergebnisse statistisch abzusichern.

In den beiden untersuchten USSC-Linien konnte bereits am Tag 0 vor der Osteodifferenzierung keine *OCT4*-Expression nachgewiesen werden, sodass sich eine weitere Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der DNA-Methylierung und Genexpression während der Osteodifferenzierung von USSC erübrigte.

5.1.2. DNA-Methylierungsanalyse in putativen iPS-Zellen

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der DNA-Methylierungsstatus von putativen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS), die aus USSC generiert worden sind, erhoben. Die DNA dieser Zellen wurde aus dem Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin (Münster) bereitgestellt. Zur Herstellung der iPS-Zellen wurden verschiedene USSC-Linien mit retroviralen Vektoren, welche die DNA der vier Pluripotenzfaktoren *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *c-MYC* enthalten, transduziert. Nach Kultivierung der transduzierten Zellen wurden drei Klone abstammend von der USSC-Linie SA8/25 selektiert, weiter kultiviert und expandiert (Zaehres et al., 2010). Die DNA dieser drei Klone (Klon I, Klon IV und Klon X) wurden für die Analyse des DNA-Methylierungsstatus benutzt. Untersucht wurde dieselbe Region innerhalb des regulatorischen Bereichs und Exon 1 des *OCT4*-Gens, wie zuvor bei den USSC-Linien.

Da iPS-Zellen humanen embryonalen Stammzellen (hESC) hinsichtlich Morphologie, Genexpression, Pluripotenz und DNA-Methylierungsstatus ähneln (Takahashi et al., 2007), war die

Erwartung, dass der DNA-Methylierungsstatus der analysierten Region nahezu unmethyliert ist, vergleichbar wie in hESC. Die Gruppe um Takahashi und Yamanaka konnte zeigen, dass nach erfolgreicher Reprogrammierung adulter humaner Hautfibroblasten mit den Faktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC der OCT4-Promotors weitgehend unmethyliert ist, als Hinweis darauf, dass der OCT4-Promotor aktiv ist. Mittels Luciferasereporter-Assay wurde bestätigt, dass der OCT4-Promotor in den reprogrammierten Zellen aktiv ist (Takahashi et al., 2007).

Es zeigte sich, dass sich die drei iPS-Zellklone in ihrem DNA-Methylierungsmuster stark unterscheiden, lediglich der iPS-Klon I war signifikant niedriger methyliert im Vergleich zur abstammenden USSC SA8/25. Die drei putativen iPS-Klone wurden weiteren Analysen unterzogen: es wurde eine quantitative RT-PCR zum Nachweis der endogenen Pluripotenzmarker OCT4, SOX2 und NANOG durchgeführt. Zudem wurde das globale microRNA-Profil erhoben und die putativen iPS-Klone hinsichtlich ihres Potentials zu differenzieren und Teratome zu bilden untersucht (Zaehres et al., 2010). Luciferasereporter-Assays um die OCT4-Promotoraktivität in den iPS-Klonen zu messen wie in der Arbeit von Takahashi und Yamanaka oder Überprüfung der OCT4-Expression auf Proteinebene wurden nicht durchgeführt.

Die Untersuchungen von Zaehres et al. ergaben, dass lediglich der putative iPS-Klon I in allen Versuchen den Kriterien einer induzierten pluripotenten Stammzelle entspricht und wurde in der Publikation von Zaehres et al. veröffentlicht. Die putativen iPS Klone IV und X scheinen nur partiell reprogrammiert worden zu sein.

Die erfolgreiche Reprogrammierung des Klon I aus der USSC SA8/25 spiegelt sich also in dem DNA-Methylierungsstatus des Bereichs innerhalb der regulatorischen Region und Exon 1 des *OCT4*-Gens wider. Denn im Gegensatz zu den Klonen IV und X, die sich nicht als iPS erwiesen haben, ist in dem Klon I die DNA-Methylierung deutlich zurück gegangen und gleicht dem DNA-Methylierungsstatus einer humanen embryonalen Stammzelle.

Bei dem Vergleich des DNA-Methylierungsstatus des ausgewählten Bereichs innerhalb der regulatorischen Region von *OCT4* in den drei iPS-Zellklonen fiel zudem auf, dass bei dem Klon I das CpG 5 von den 22 untersuchten CpGs fehlt, wie auch bei der Ursprungslinie USSC SA8/25. Bei den beiden iPS-Zellklonen IV und X sind alle 22 CpGs vorhanden. Da eine Zelle zwei Allele eines Gens besitzt, die nicht zwangsläufig identisch sind, könnte es möglich sein, dass Klon I die mutierte Sequenz eines Allels darstellt und Klon IV und X die nicht-mutierte Sequenz des anderen Allels darstellen. Jedoch findet sich die beschriebene Mutation durchgängig in allen analysierten Sequenzen in der Ursprungszelllinie USSC SA8/25 (vor Transduktion). Dies spricht dafür, dass beide Allele des *OCT4*-Gens der USSC SA8/25 die Mutation tragen. Die fehlende Mutation in den beiden Klonen IV und X ließe sich dadurch erklären, dass sie nicht von der Ursprungslinie SA8/25 stammen. Die sich stark unterscheidenden DNA-Methylierungsmuster von Klon I (abstammend

von der USSC SA8/25, weitgehend demethyliert) zu den Klonen IV und X (wahrscheinlich von einer anderen USSC-Linie abstammend, stärker methyliert) unterstützen die Vermutung, dass es sich um unterschiedliche Zellen handelt und spricht dafür, dass verschiedene USSC-Linien unterschiedlich auf die Reprogrammierung ansprechen.

Die Autoren der Publikation “Induction of pluripotency in human cord blood unrestricted somatic stem cells” (Zaehres et al., 2010), in der die in meiner, hier vorliegenden Arbeit erhobenen DNA-Methylierungsdaten des iPS-Klons I eingegangen sind, kommen zu dem Schluss, dass die USSC sich besonders gut für die Reprogrammierung eignet, besser als z.B. NK-Zellen aus Nabelschnurblut, da bei der USSC die DNA-Methylierung in der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens weniger dicht ist.

5.1.3. DNA-Methylierungsdaten im Zusammenhang mit weiteren Mechanismen der Genregulation in USSC

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, das DNA-Methylierungsmuster einer Region innerhalb des Minimalpromotors und Exon 1 des *OCT4*-Gens in USSC zu untersuchen und die Frage zu klären, ob USSC den Transkriptionsfaktor OCT4 exprimieren. Obwohl in USSC der analysierte OCT4-Region signifikant weniger methyliert ist, als in der differenzierten NK-Zelle, konnte keine OCT4-Expression in USSC nachgewiesen werden, weder auf Transkriptions-, noch auf Proteinebene.

Dieses Ergebnis liefert einen Beitrag zur Charakterisierung der USSC hinsichtlich ihres epigenetischen Musters eines wichtigen Pluripotenzgens, dem *OCT4*-Gen.

An der Regulation der Genexpression sind neben der DNA-Methylierung weitere Mechanismen beteiligt, wie z.B. die Histonmodifikation oder die RNA-Interferenz. Zudem sind neben *OCT4* weitere Gene für die Pluripotenz verantwortlich. Zur detaillierten Charakterisierung des Differenzierungsstatus der USSC müssen die verschiedenen Mechanismen der Genregulation berücksichtigt werden.

In der bereits im vorherigen Abschnitt erwähnten Publikation von Santourlidis et al. wurde der DNA-Methylierungsstatus der Promotorregion zweier weiterer Pluripotenzgene, *NANOG* und *SOX2*, in USSC untersucht. Die *NANOG*-Promotorregion weist ein uneinheitliches DNA-Methylierungsmuster auf. Einige USSC-Linien scheinen weitgehend frei von Methylierung zu sein, in der USSC-Linie SA4/146 hingegen ist die *NANOG*-Promotorregion stärker methyliert. Für das Pluripotenzgen *SOX2* konnte gezeigt werden, dass der *SOX2*-Promotor wie auch der zugehörige Enhancer *SRR1* bis auf vereinzelt methylierte CpGs vollständig frei von Methylierung ist (Santourlidis et al., 2011).

Zusätzlich haben die Autoren als weiteren wichtigen epigenetischen Mechanismus die Histonmodifikationen innerhalb der Promotorregionen von *OCT4*, *NANOG* und *SOX2* untersucht. Es zeigt sich eine „bivalente“ Chromatinstruktur, d.h. es treten gleichzeitig Histonmodifikationen in den Pluripotenzgenen auf, die sowohl negativ als auch positiv mit der Transkription korrelieren. In der Veröffentlichung von Bernstein et al. wurde erstmals die „bivalente“ Chromatinstruktur für einige Transkriptionsfaktoren in ESC beschrieben. Diese geht zwar mit einer niedrigen Expression der entsprechenden Transkriptionsfaktoren einher, lässt jedoch die Möglichkeit offen, die jeweiligen Gene zu aktivieren (Bernstein et al., 2006).

Santourlidis et al. kommen zu dem Schluss, dass die epigenetische Signatur der Promotoren der drei Pluripotenzgene in der USSC soweit offengehalten ist, dass es dieser somatischen Stammzelle ein hohes Differenzierungspotential ermöglicht (Santourlidis et al., 2011).

Die Expression von *OCT4*, *NANOG* und *SOX2* auf RNA- und Proteinebene haben die Autoren Santourlidis et al. nicht untersucht.

Ein weiterer Mechanismus der Genregulation erfolgt auf microRNA-Ebene (RNA-Interferenz). Die Hochregulation der microRNA miR-145 führt in hESC zu einer verminderten Expression von *OCT4* und leitet die Differenzierung ein (Xu et al., 2009). In der Arbeit von Iwaniuk wurde gezeigt, dass in nativen USSC die microRNA miR-145 hoch exprimiert ist. Dieses Ergebnis unterstützt die Tatsache, dass die Expression von *OCT4* in USSC unterdrückt ist. ESC-spezifische microRNAs, wie z.B. die micro RNA miR-302, die an dem Erhalt der Pluripotenz der hESC beteiligt ist, waren hingegen in den nativen USSC nicht nachweisbar bzw. gering exprimiert (Iwaniuk, 2011). Somit gleicht der microRNA-Status in USSC mehr einer differenzierten Zelle als einer hESC.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte keine *OCT4*-Expression in USSC nachgewiesen werden, weder auf mRNA-Ebene noch auf Proteinebene. In der Literatur finden sich Untersuchungen hinsichtlich der *NANOG*- und *SOX2*-Expression in USSC. Zaibak et al. konnten auf mRNA-Ebene mittels Real-time-PCR eine Expression von *SOX2* nachweisen (Zaibak et al., 2009). *OCT4* ließ sich auf mRNA-Ebene in Übereinstimmung mit den hier erhobenen Daten nicht detektieren. Der Nachweis von *SOX2*-Transkription in USSC durch Zaibak et al. steht im Einklang mit der Tatsache, dass Santourlidis et al. auf Methylierungsebene einen weitgehend unmethylierten Promotorbereich für *SOX2* demonstrieren konnten (siehe vorangegangener Abschnitt).

Zaehres et al. untersuchten ebenfalls mittels Real-time PCR die Expression der drei Pluripotenzmarker auf mRNA-Ebene in USSC. Sie konnten weder eine *OCT4*-, *NANOG*- noch *SOX2*-Transkription nachweisen (Zaehres et al., 2010).

Beide Gruppen haben keine Untersuchung der Expression von *OCT4*, *NANOG* und *SOX2* auf Proteinebene durchgeführt.

5.2. Vergleichende *OCT4*-Promotor-Aktivitätsmessung

Bei der Erhebung des DNA-Methylierungsstatus der ausgewählten *OCT4*-Region in der USSC SA8/25 fiel ein Sequenz-Polymorphismus auf. Das *OCT4*-Gen ist sehr polymorph, es wurden 106 Variationen in der Gensequenz, die für den Transkriptionsfaktor OCT4 kodiert, gefunden. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Einzelnukleotid-Polymorphismen, die sich in den Introns und flankierenden Bereichen des *OCT4*-Gens befinden (Hussain et al., 2008).

Der in dieser Arbeit untersuchte Sequenz-Polymorphismus befindet sich im kodierenden Bereich in Exon 1. Es handelt sich hierbei ebenfalls um eine Punktmutation, bei der die Base Guanin durch die Base Adenin an Position 21 bp (ausgehend vom Translationsstart) ausgetauscht ist. Die Aminosäuresequenz wird durch die Mutation nicht verändert. Sowohl das Nukleotidtriplett t_{CG} als auch t_{CA} (Punktmutation) kodieren für die Aminosäure Serin.

Durch die Punktmutation wird aus CG die Sequenzfolge CA, wodurch eine potentielle Methylierungsstelle verloren geht. An dieser Stelle kann das Cytosin nicht mehr methyliert werden. Wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben, kann eine Methylgruppe direkt die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA stören (Bird, 2002). Somit stellte sich die Frage, ob diese Mutation die *OCT4*-Promotoraktivität beeinflusst. Da an der mutierten Stelle keine Methylgruppe angehängt werden kann, könnten Transkriptionsfaktoren besser binden, was zu einer höheren Promotoraktivität führen würde im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz ohne Mutation.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden der *OCT4*-Minimalpromotor (*OCT4* -230-0 Promotor), sowie die Fusionskonstrukte aus dem *OCT4*-Minimalpromotor und das 5'-Ende des Exon 1 mit (*OCT4* -230-35 pm Promotor) und ohne der entsprechenden Punktmutation (*OCT4* -230-35 Promotor) in den Vektor pMOD-luc-shS v02 kloniert. Die Konstrukte wurden in HEK 293T-Zellen transfiziert und die Promotoraktivität mittels Luciferaseaktivitätsmessung verglichen.

Zwischen den beiden Fusionskonstrukten pMOD *OCT4* -230-35 Promotor und pMOD *OCT4* -230-35 pm Promotor zeigte sich kein signifikanter Unterschied der *OCT4*-Promotoraktivität. Daher muss davon ausgegangen werden, dass das fehlende CpG bedingt durch die Punktmutation in Exon 1, 21 bp stromabwärts vom Translationsstart des *OCT4*-Gens gelegen, keinen Einfluss auf die *OCT4*-Promotoraktivität nimmt. Eine genauere Aussage über den Einfluss der Mutation auf die Promotoraktivität könnte durch Wiederholung dieses Experiments mit *in vitro* methylierten Plasmiden getroffen werden.

Vergleicht man die prozentuale Methylierung an dem CpG an Position +20 bp/+21 bp gerechnet von dem Translationsstart (entspricht dem CpG 5 der untersuchten CpGs innerhalb der ausgewählten *OCT4*-Region) in den untersuchten USSC-Linien ohne Punktmutation (USSC

SA4/101, SA4/146, SA5/60 und SA5/73) sowie in NK-Zellen, so fällt auf, dass dieses CpG meist nicht methyliert ist. In der USSC-Linie SA4/146 sind sogar alle untersuchten Sequenzen an dieser Stelle unmethyliert.

Da in den untersuchten USSC-Linien, bei denen die Punktmutation nicht vorhanden ist, das entsprechende CpG an Position +20 bp/+21 bp in der Regel nicht methyliert ist, die Punktmutation nicht zu einem Aminosäureaustausch führt und sich kein Unterschied in der Promotoraktivität zwischen den Konstrukten mit und ohne Punktmutation nachweisen ließ, handelt es sich bei dieser Punktmutation anscheinend um keine relevante Mutation in Hinsicht auf die OCT4-Expression.

6. Schlussfolgerung

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, das DNA-Methylierungsmuster eines Bereichs innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens in fünf USSC-Linien zu untersuchen. Es zeigte sich erstmalig eine Diskrepanz zwischen dem stammzellspezifischen epigenetischen Mustern des *OCT4*-Gens in USSC und der fehlenden Transkription des Gens. Es wurde erstmals gezeigt, dass USSC kein OCT4 auf Proteinebene exprimieren, als Hinweis dafür, dass das *OCT4*-Gen in USSC nicht aktiv ist.

Da der DNA-Methylierungsstatus jedoch nur in einem kleinen Bereich innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens untersucht wurde, sollte in zukünftigen Arbeiten die Analyse des DNA-Methylierungsstatus auf die gesamte regulatorische Region des *OCT4*-Gens ausgeweitet werden, um ein detaillierteres Bild der epigenetischen Signatur im Zusammenhang mit der fehlenden OCT4-Expression zu erhalten.

Eine in dem untersuchten Bereich innerhalb der regulatorischen Region des *OCT4*-Gens gefundene Punktmutation in der USSC-Linie SA8/25, die zu einer Elimination eines CG-Dinukleotids führt, hatte keine Auswirkung auf die *OCT4*-Promotoraktivität. Auch hier könnte in folgenden Arbeiten der Promotorreporter-Assay um die Analyse des gesamten regulatorischen Bereichs des *OCT4*-Gens erweitert werden, um auszuschließen, dass durch Fehlen des distalen und proximalen Enhancers keine ausreichende Promotoraktivität gemessen wurde. Desweiteren könnte eine genauere Aussage über die Auswirkung der Punktmutation auf die Promotoraktivität getroffen werden, in dem der Versuch mit *in vitro* methylierten Plasmiden wiederholt würde.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten über den DNA-Methylierungsstatus und die Expression des *OCT4*-Gens in USSC ergänzen die bisherigen Kenntnisse über weitere Pluripotenzmarker in USSC: so besteht ebenfalls eine Differenz zwischen der weitgehend unmethylierten regulatorischen Region des *SOX2*-Gens und der nicht vorhandenen Transkription des Gens. Ähnliche Ergebnisse finden sich für das Pluripotenzgen *NANOG*. Was die Diskrepanz der stammzellspezifischen epigenetischen Signatur der USSC und der fehlenden Transkription der entsprechenden stammzellspezifischen Transkriptionsfaktoren für diese Zelle und ihren möglichen Einsatz in der Medizin bedeutet, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

7. Literaturliste

Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D (2006) Epigenetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor NY*, Kapitel 18

Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell* **116**: 281–297

Bartel DP (2009) MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**: 215–233

Bayart E and Cohen-Haguener (2013) Technological Overview of iPS Induction from Human Adult Somatic Cells. *Current Gene Therapy* **13**: 73-92

Ben-David U and Benvenisty N (2011) The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nature Reviews Cancer* **11**: 268-277

Ben-Shushan E, Pikarsky E, Klar A, Bergman Y (1993) Extinction of Oct-3/4 gene expression in embryonal carcinoma x fibroblast somatic cell hybrids is accompanied by changes in methylation status, chromatin structure, and transcriptional activity of the Oct-3/4 upstream region. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 891-901

Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal R, Feil R, Schreiber SL, Lander ES (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**: 315-326

Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007) The mammalian epigenome. *Cell* **128**: 669-681

Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics* **2000**, **9**: 2395-2402

Bibikova M, Chudin E, Wu B, Zhou L, Garcia EW, Liu Y, Shin S, Plaia TW, Auerbach JM, Arking DE, Gronzalez R, Crook J, Davidson B, Schulz TC, Robins A, Khanna A, Sartipy P, Hyllner J, Vanguri P, Savant-Bhonsale S, Smith AK, Chakravarti A, Maitra A, Rao M, Barker DL, Loring JF, Fan JB (2006) Human embryonic stem cells have a unique epigenetic signature. *Genome Res* **16**: 1075-1083

Bird A (1986) CpG-rich islands and the function of DNA-methylation. *Nature* **321**: 209-213

- Bird A** (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**: 6-21
- Boiani M**, Eckardt S, Schöler HR, McLaughlin KJ (2002) Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev.* **16**: 1209-1219
- Boiani M**, Schöler HR (2005) Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **23**: 872-884
- Bortvin A**, Eggan K, Skaletsky H, Akutsu H, Berry DL, Yanagimachi R, Page DC, Jaenisch R (2003) Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* **130**: 1673-1680
- Boyer LA**, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Gunther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**: 947-956
- Brambrink T**, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, Jaenisch R (2008) Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell stem cell* **2**: 151-159
- Brenet F**, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND, Scandura JM (2011) DNA Methylation of the First Exon Is Tightly Linked to Transcriptional Silencing. *PLoS ONE* **6**(1): e14524. doi:10.1371/journal.pone.0014524
- Cantz T**, Key G, Bleidißel M, Gentile L, Han DW, Brenne A, Schöler HR (2008) Absence of OCT4 Expression in Somatic Tumor Cell Lines. *Stem cells* **26**: 692-697
- Collas P**, Noer A, Timoskainen (2007) Programming the genome in embryonic and somatic stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* **11**: 602-620
- Deaton AM**, Bird A (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **25**: 1010-1022
- Deb-Rinker P**, Ly D, Jezierski A, Sikorska M, Walker PR (2005) Sequential DNA methylation of the Nanog and Oct-4 upstream regions in human NT2 cells during neuronal differentiation. *JBC* **280**: 6257-6260

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**: 457-463

Federation AJ, Bradner JE, Meissner A (2014) The use of small molecules in somatic-cell reprogramming. *Trends Cell Biol.* **24(3)**: 179-187

Feldman N, Gerson A, Fang J, Li E, Zhang Y, Shinkai Y, Cedar H, Bergmann Y (2006) G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nature Cell Biol.* **8**: 188-194

Fouse SD, Shen Y, Pellegrini M, Cole S, Meissner A, Van Neste L, Jaenisch R, Fan G (2008) Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/K27 trimethylation. *Cell Stem Cell* **2**: 160-169

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *PNAS* **89**: 1827-1831

Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) CpG Islands in Vertebrate Genomes. *J. Mol. Bio.* **196**: 261-282

Ghodsziad A, Niehaus M, Kögler G, Martin U, Wernet P, Bara C, Khaladj N, Loos A, Makoui M, Thiele J, Mengel M, Karck M, Klein HM, Haverich A, Ruhparwar A (2009) Transplanted human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells improve left-ventricular function and prevent left-ventricular dilatation and scar formation after acute myocardial infarction. *Heart* 2009 **95**: 27-35

Goldring CEP, Duffy PA, Benvenisty N, Andrews PW, Ben-David U, Eakins R, French N, Hanley NA, Kelly L, Kitteringham NR, Kurth J, Ladenheim D, Laverty H, McBlane J, Narayanan G, Patel S, Reinhardt J, Rossi A, Sharpe M, Park BK (2011) Assessing the Safety of Stem Cell Therapeutics. *Cell Stem Cell* **8**: 618-628

Hall PA, Watt FM (1989) Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* **106**: 619-633

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R (2007) Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* **318**: 1920-1923

Hanna J, Saha K, Jaenisch R (2010) Pluripotency and Cellular Reprogramming: Facts, Hypotheses, Unresolved Issues. *Cell* **143**: 508-525

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996) Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Medical Sciences* **93**:9821-9826

Herr W, Cleary MA (1995) The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes Dev.* **9**: 1679-1693

Higuchi A, Ling Q-D, Kumar SS, Munusamy MA, Alarfaj AA, Chang Y, Kao S-H, Lin K-C, Wang H-C, Umezawa A (2015) Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material. *Lab. Invest.* **95**: 26-42

Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R (2005) Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* **121**: 465-477

Hochedlinger K, Plath K (2009) Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* **136**: 509-523

Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, Zhao T, Ye J, Yang W, Liu K, Ge J, Xu J, Zhang Q, Zhao Y, Deng H (2013) Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science* **341**: 651-654

Hsieh CL (1994) Dependence of Transcriptional Repression on CpG Methylation Density. *MOL.CELL.BIOL.* **14**(8): 5487-5494

Hsieh CL (1997) Stability of Patch Methylation and Its Impact in Regions of Transcriptional Initiation and Elongation. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5897-5904

-
- Huangfu D**, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA (2008) Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol.* **26(11)**: 1269-1275
- Hussain SK**, Sequerra R, Bertucci C, Hastings NC, Rieder M, Schwartz SM (2008) Sequence variation in the human transcription factor gene POU5F1. *BMC Genetics* **9**:15
- Iwaniuk KM** (2011) Molekulare Netzwerke: microRNAs in der neuronalen Differenzierung unrestringierter somatischer Stammzellen aus Nabelschnurblut (USSC). Inaugural-Dissertation
- Jaenisch R**, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33**: 245-254
- Jenuwein T**, Allis CD (2001) Translating the Histone Code. *Science* **293**: 1074-1079
- Jones PA**, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 415-428
- de Jong J** and Looijenga LHJ (2006) Stem cell marker OCT3/4 in tumor biology and germ cell tumor diagnostics: history and future. *Crit Rev Oncog.* **12**: 171-203
- Kellner S** and Kikyo N (2010) Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. *Histol Histopathol.* **25**: 405-412
- Kernan NA**, Bartsch G, Ash RC, Beatty PG, Champlin R, Filipovich A, Gajewski J, Hansen JA, Henslee-Downey J, McCullough J, McClave P, Perkins HA, Phillips GL, Sanders J, Stroncek D, Thomas ED, Blume KG (1993) Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the national marrow donor program. *NEJM* **328**: 593-602
- Kim JB**, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hübner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Schöler HR (2009) Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* **136**: 411-419

Kluth SM, Buchheiser A, Houben AP, Geyh S, Krenz T, Radke TF, Wiek C, Hanenberg H, Reinecke P, Wernet P, Kögler G (2010) DLK-1 as a marker to distinguish unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stromal cells in cord blood. *Stem cells and Development* **19**: 1471-1483

Kobolak J, Kiss K, Polgar Z, Mamo S, Rogel-Gaillard C, Tancos Z, Bock I, Baji AG, Tar K, Pirtity MK, Dinnyes A (2009) Promoter analysis of the rabbit POU5F1 gene and its expression in preimplantation stage embryos. *BMC Molecular Biology* **10**: 88

Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *Exp Med* **200**:123-135

Kouzarides T (2007) Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **128**, 693–705

Krishnan BR, Jamry I, Chaplin DD (1995) Feature mapping of the HLA class I region: localization of the POU5F1 and TCF19 genes. *Genomics* **30**: 53-58

Krumlauf R (1994) Hox genes in development. *Cell* **78**: 191-201

Langenbach F, Naujoks C, Kersten-Thiele PV, Berr K, Depprich RA, Kubler NR, Kögler G, Handschel J (2010) Osteogenic Differentiation Influences Stem Cell Migration Out of Scaffold-Free Microspheres. *Tissue Engineering Part A*, **16(2)**: 759-766

Lee J, Kim HK, Rho JY, Han YM, Kim J (2006) The human Oct-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem.* **281**: 33554-33565

Li JY, Pu MT, Hirasawa R, Li BZ, Huang YN, Zeng R, Jing NH, Chen T, Li E, Sasaki H, Xu GL (2007) Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt 3b in the methylation of Oct4 and Nanog. *Mol Cell Biol* **27**: 8748-8759

Li M, He Y, Dubois W, Wu X, Shi J, Huang J (2012) Distinct regulatory mechanisms and functions of p53-activated and p53-repressed DNA damage response genes in embryonic stem cells. *Mol Cell* **46(1)**: 30-42

- Liedtke S**, Enczmann J, Waclawczyk S, Wernet P, Kögler G (2007) Oct4 and its Pseudogenes confuse stem cell research. *Cell Stem Cell* **1**: 364-366
- Liedtke S**, Buchheiser A, Bosch J, Bosse F, Kruse F, Zhao X, Santourlidis S, Kögler G (2010) The HOX Code as a “biological fingerprint” to distinguish functionally distinct stem cell populations derived from cord blood. *Stem cell research* **5**: 40-50
- Lowry OH**, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275
- Marikawa Y**, Fujita TC, Alarcón VB (2005) Heterogeneous DNA methylation status of the regulatory element of the mouse Oct4 gene in adult somatic cell population. *Cloning and stem cells* **7**: 8-16
- Meissner A**, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES (2008) Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* **454**: 766-770
- Mikkelsen TS**, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, Bernstein BE, Jaenisch R, Lander ES, Meissner A (2008) Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis *Nature* **454**: 49–55
- Miranda TB** and PA Jones (2007) DNA-Methylation: the Nuts and Bolts of Repression. *J.Cell.Physiol.* **213**:384-390
- Miyoshi N**, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, Nishikawa S, Tanemura M, Mimori K, Tanaka F, Saito T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M (2011) Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature MicroRNAs. *Cell Stem Cell* **8**: 633-638
- Mohammad HP**, Baylin SB (2010) Linking cell signaling and the epigenetic machinery. *Nature Biotechnology* **28**: 1033-1038
- Mohn F**, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB, Bibel M, Schübeler D (2008) Lineage-Specific Polycomb Targets and De Novo DNA Methylation Define Restriction and Potential of Neuronal Progenitors. *Molecular Cell* **30**: 755-766

- Mueller T**, Luetzkendorf J, Nerger K, Schmoll HJ, Mueller LP (2008) Analysis of OCT4 expression in an extended panel of human tumor cell lines from multiple entities and in human mesenchymal stem cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**:495-503
- Nemes C**, Varga E, Polgar Z, Klincumhom N, Pirity MK, Dinnyes A (2014) Generation of Mouse Induces Pluripotent Stem Cells by Protein Transduction. *Tissue Eng Part C Methods* **20 (5)**: 383-392
- Nichols J**, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor OCT4. *Cell* **95**: 379-391
- Niwa H**, Miyazaki J, Smith A (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**:372-376
- Niwa H** (2001) Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Str & Func* **26**: 13748
- Nordhoff V**, Hübner K, Bauer A, Orlova I, Malapetsa A, Schöler HR (2001) Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mamm Genome* **12**: 309-317
- Ogawa M**, Porter PN, Nakahata T (1983) Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells (an interpretive review) *Blood* **61**: 823-829
- Okano M**, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**: 247-257
- Okazawa H**, Okomoto K, Ishino F, Ishino-Kaneko T, Takeda S, Toyoda Y, Muramatsu M, Hamada H (1991) The oct3 gene, gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer. *EMBO J* **10**: 2997-3005
- Okita K**, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**: 313-318
- Ovitt CE**, Schöler HR (1998) The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol Hum Reprod* **4**: 1021-1031

- Palmieri SL**, Peter W, Hess H, Schöler HR (1994) Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol.* **166**: 259-267
- Pan G**, Chang ZY, Schöler HR, Pei D (2002) Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Research* **12**: 321-329
- Pan G**, Qin B, Liu N, Schöler HR, Pei D (2004) Identification of a Nuclear Localization Signal in OCT4 and Generation of a Dominant Negative Mutant by Its Ablation. *J. Biol. Chem.* **279**: 37013-37020
- Pan G**, Li J, Zhou Y, Zheng H, Pei D (2006) A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *The FASEB Journal* **20**: 1094-1102
- Park H-S**, Hwang I, Choi K-A, Jeong H, Lee J-Y, Hong S (2015) Generation of induced pluripotent stem cells without genetic defects by small molecules. *Biomaterials* **39**: 47-58
- Park I**, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ (2008) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* **451**: 141-146
- Pera MF**, Reubinoff B, Trounson A (2000) Human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science* **113**: 5-10
- Pfaffl MW** (2004) Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* **1**: 92-95
- Razak SRA**, Ueno K, Takayama N, Nariai N, Nagasaki M, Saito R, Koso H, Lai C-Y, Murakami M, Tsuji K, Michiue T, Nakauchi H, Otsu M, Watanabe S (2013) Profiling of MicroRNA in Human and Mouse ES and iPS Cells Reveals Overlapping but Distinct MicroRNA Expression Patterns. *PLoS One* **8**(9): e73532
- Reik W** (2007) Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* **447**: 425-432
- Reimann V**, Creutzig U, Kögler G (2009) Stem cells derived from cord blood in transplantation and regenerative medicine. *Dtsch Arztebl Int* **106**: 831-836

Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD (1996) Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Santourlidis S, Wernet P, Ghanjati F, Graffmann N, Springer J, Kriegs C, Zhao X, Brands J, Araúzo-Bravo MJ, Neves R, Koegler G, Uhrberg M (2011) Unrestricted somatic stem cells (USSC) from human umbilical cord blood display uncommitted epigenetic signatures of the major stem cell pluripotency genes. *Stem Cell Research* **6**: 60-69

Schneider E, Pliushch G, Hajj NE, Galetzka D, Puhl A, Schorch M, Frauenknecht K, Riepert T, Tresch A, Müller AM, Coerdts W, Zechner U, Haaf T (2010) Spatial, temporal and interindividual epigenetic variation of functionally important DNA methylation patterns. *Nucleic Acids Research* **38**(12): 3880-3890

Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P (1990) New type of POU domain in germ line specific protein Oct-4. *Nature* **344**: 435-438

Schrödel A (2010) Biologie in unserer Zeit. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim, S. 236

Sylvester I, Schöler HR (1994) Regulation of the Oct-4 gene by nuclear receptors. *Nucleic Acids Research* **22**(6): 901-911

Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663-676

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**: 861-872

Takeda J, Seino S, Bell GI (1992) Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal localisation and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res.* **20**:4613-20

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145-1147

-
- Venter JC** et al. (2001) The Sequence of the Human Genome. *Science* **291**: 1304-1351
- Waddington CH** (1957) The strategy of the genes. Allen and Unwin, London
- Wang J**, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, Orkin SH (2006) A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* **444**: 364-368
- Weksberg R**, Smith AC, Squire J, Sadowski P (2003) Beckwith-Wiedemann-Syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Human Molecular Genetics* **12**: R61-R68
- Wernig M**, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* **448**: 318-325
- Wernig M**, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine –Paton M, Isacson O, Jaenisch R (2008) Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improves symptoms of rats with Parkinson’s disease. *PNAS* **105**: 5856-5861
- Wobus AM**, Boheler KR (2005) Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* **85**: 635-678
- Wolffe AP**, Jones PL, Wade PA (1999) DNA demethylation. *PNAS* **96**:5894-5896
- Wu G** and Schöler HR (2014) Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regeneration* **3**:7
- Wu H** and Zhang Y (2014) Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions. *Cell* **156**: 45-68
- Wu SC** and Zhang Y (2010) Active DNA demethylation: many roads leads to Rome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**: 607-620

Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS (2009) MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2 and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* **137**: 647-658

Yang H-M, Do H-J, Oh J-H, Kim J-H; Cha K-Y, Chung H-M, Kim J-H (2005) Characterization of Putative Cis-Regulatory Elements That Control the Transcriptional Activity of the Human Oct4 Promoter. *Journal of Cellular Biochemistry* **96**:821-830

Yeo S, Jeong S, Kim J, Han J-S, Han Y-M, Kang Y-K (2007) Characterization of DNA methylation change in stem cell marker genes during differentiation of human embryonic stem cells. *BBRC* **359**: 536-542

Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, Hübner K, Schöler HR (1996) Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* **122**: 881-894

Yevtodiyenko A and Schmidt JV (2006) DLK1 expression marks developing endothelium and sites of branching morphogenesis in the mouse embryo and placenta. *Developmental dynamics* **235**: 1115-1123

Zaehres H, Kögler G, Arauzo-Bravo MJ, Bleidissel M, Santourlidis S, Weinhold S, Greber B, Kim JB, Buchheiser A, Liedtke S, Eilken HM, Graffmann N, Zhao X, Meyer J, Reinhardt P, Burr B, Waclawczyk S, Ortmeier C, Uhrberg M, Schöler HR, Cantz T, Wernet P (2010) Induction of pluripotency in human cord blood unrestricted stem cells. *Experimental Hematology* **38**: 809-818

Zaibak F, Bello P, Kozlovski J, Crombie D, Ang H, Dottori M, Williamson R (2009) Unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood grow in serum-free medium as spheres. *BCM Biotechnology* **9**:101

Zhang H-J, Siu MK-Y, Wong ES-Y, Wong K-Y, Li AS-M, Chan KY-K, Ngan HY-S, Cheung AN-Y (2008) Oct4 is Epigenetically Regulated by Methylation in Normal Placenta and Gestational Trophoblastic Disease. *Placenta* **29**: 549-554

8. Danksagung

Diese Arbeit entstand in dem Zeitraum von August 2008 bis Juni 2013 in der AG Natürliche Immunität des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika. An dieser Stelle bedanke ich mich bei Allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Markus Uhrberg bedanke ich mich dafür, dass er es mir ermöglichte in seiner Gruppe zu promovieren und für die Bereitstellung des Themas. Ich danke ihm für seine Ideen und Ratschläge, seine fachliche und persönliche Unterstützung, sein Vertrauen in mich.

Frau Prof. Gesine Kögler danke ich für die Bereitstellung der USSC.

Herrn Dr. Simeon Santourlidis danke ich für die Betreuung der DNA-Methylierungsanalysen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hans-Ingo Trompeter, der nicht nur die Promotorreporter-Assays in geduldiger und hervorragender Weise betreut hat, sondern auch wesentlich an Form und Inhalt dieser Arbeit mitgewirkt hat. Ich danke ihm für seine Motivation, seine Geduld, und seine immer anregende und konstruktive Kritik. Die Zusammenarbeit mit ihm hat mir große Freude bereitet.

Ich danke allen Mitarbeitern des ITZ, die mir geholfen und mich in meiner Arbeit unterstützt haben, insbesondere Frau Gabi Tillmann, Herrn Damian Marx und Frau Gabriele Häger für die Sequenzierungen, sowie Frau Dr. Nina Graffmann und Herrn Dr. Rui Neves für die vielen Erklärungen und Hilfestellungen.

Christophe Klumb danke ich für seine unermüdliche Hilfe sowohl im als auch außerhalb des Labors. Ohne seine Motivation wäre die Arbeit nicht beendet worden.

Zuletzt danke ich meinen Eltern Karin und Dr. Helmut Springer für ihre immerwährende Unterstützung und Vertrauen während des Studiums und der Promotionszeit.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 08.12.2015

Judith S. Springer