

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten (IPEK)

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Weber

in Kooperation mit dem

Department of Urology, University of California, San Francisco, USA

Prof. Dr. Robert Blelloch, MD, PhD

# ZELLULÄRE SIGNALWEGE IN MICRORNA-UNTERSTÜTZTER ZELL-REPROGRAMMIERUNG

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Tobias Sebastian Greve**

aus Braunschweig

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Ries

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Peter Becker  
PD Dr. Klaus Metzeler  
PD Dr. Dejana Mokranjac

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Robert Blelloch, MD, PhD  
University of California, San Francisco, USA

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2020



# EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

**Greve, Tobias Sebastian**

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Zelluläre Signalwege in microRNA-unterstützter Zell-Reprogrammierung“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 15.01.2020

---

Ort, Datum

Tobias Sebastian Greve

---

Unterschrift Doktorand

# PUBLIKATIONEN

Der experimentelle Teil dieser Promotion wurde im Labor von Prof. Dr. R. Blelloch an der University of California, San Francisco, USA im Rahmen eines Promotionsstipendiums angefertigt.

Der Großteil der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurde durch den Autor bereits in den unten genannten Publikationen veröffentlicht. Es erfolgt hierauf außer bei Bildmaterial und Tabellen kein gesonderter Hinweis.

In Fällen, in denen die betreffenden Experimente nicht primär durch den Autor durchgeführt bzw. erstellt wurden, erfolgt ein gesonderter Hinweis bzw. eine Zitierung.

[1] **Greve T**, Judson RL, Blelloch R.

microRNA control of mouse and human pluripotent stem cell behavior.

*Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29: 213-39 (2013)

*[Übersichtsarbeit]*

[2] Judson RL, **Greve T**, Parchem RJ, Blelloch R.

MicroRNA-based discovery of barriers to dedifferentiation of fibroblasts to pluripotent stem cells.

*Nature Structural & Molecular Biology* 20: 1227-35 (2013)

*[Originalarbeit]*



*Man kann nicht hoffen, die Welt zum Besseren zu wenden, wenn sich der Einzelne nicht zum Besseren wendet. Dazu sollte jeder von uns an seiner eigenen Vervollkommnung arbeiten und sich dessen bewusst werden, dass er die persönliche Verantwortung für alles trägt, was in dieser Welt geschieht, und dass es die direkte Pflicht eines jeden ist, sich dort nützlich zu machen, wo er sich am nützlichsten machen kann.*

Marie Curie (1867 – 1934)



# INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis .....	3
A Übersicht .....	4
A 1 Zusammenfassung .....	4
A 2 Summary .....	5
B Einführung .....	8
B 1 Stammzellen .....	8
B 2 miRNA .....	9
B 2.1 miRNA Expression und Funktion in Stammzellen .....	11
B 3 Reprogrammierung .....	12
B 3.1 miRNAs in der Reprogrammierung .....	15
B 4 PI3K/Akt-Signalweg .....	15
B 5 Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg .....	17
C Fragestellung und Zielsetzung .....	19
D Material und Methoden .....	20
D 1 Richtlinienkonformes Arbeiten .....	20
D 2 Materialien .....	20
D 2.1 Geräte .....	20
D 2.2 Software .....	21
D 2.3 Verbrauchsmaterial .....	21
D 2.4 Chemikalien, Färbemittel, Reagenzien, Kits .....	22
D 2.5 Puffer, Medien .....	23
D 2.6 Antikörper, Liganden .....	24
D 2.7 miRNAs und Plasmide .....	25
D 2.8 Organismen .....	25
D 3 Methoden .....	26
D 3.1 Zellkultur .....	26
D 3.1.1 Arbeitsbedingungen .....	26
D 3.1.2 Zellzählung .....	26
D 3.1.3 Kultur von HEK293-Zellen .....	26
D 3.1.4 Kultur von 3T3-Fibroblasten .....	26
D 3.1.5 MEF-Kultur .....	27
D 3.1.5.1 MEF-Gewinnung .....	27
D 3.1.5.2 Herstellung inaktivierter MEF-Fütterzellen .....	28
D 3.1.6 PSC-Kultur .....	28
D 3.1.6.1 Entwöhnung von irMEFs .....	28
D 3.1.7 Kryokonservierung .....	29
D 3.2 Mikroskopie und <i>High Content Imaging</i> .....	29
D 3.3 Durchflusszytometrie .....	30
D 3.4 Plasmidpräparation .....	31
D 3.5 Protein- und Enzym-Analytik .....	34
D 3.5.1 Proteinquantifizierung mittels Westernblot .....	34
D 3.5.2 Immunzytochemie .....	35

D 3.5.3	Luciferase-basierender Reporterassay .....	35
D 3.6	Transfer genetischen Materials in Zellen.....	37
D 3.6.1	DNA-Transfektion .....	37
D 3.6.2	RNA-Transfektion .....	37
D 3.6.3	Transduktion.....	38
D 3.6.3.1	Retrovirusherstellung .....	38
D 3.6.3.2	Lentivirusherstellung .....	39
D 3.6.3.3	Stabile Genexpression in Fibroblasten durch lentivirale Transduktion	40
D 3.7	OSK-Reprogrammierung mit miRNA-Mimics .....	40
D 3.7.1	Verifikation von Stammzeleigenschaften.....	41
D 3.7.1.1	Chimärenbildung und Keimbahnkontribution .....	41
D 3.7.1.2	Immunzytochemischer Nachweis von Pluripotenzfaktoren.....	45
D 3.7.1.3	Karyotypisierung .....	45
D 4	Statistik.....	46
E	Ergebnisse.....	47
E 1	miRNA-Stabilität .....	47
E 1.1	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Mimic-Aktivität .....	48
E 1.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der Mimic-Aktivität .....	51
E 2	OSK-Reprogrammierung mit miRNA-Mimics .....	55
E 2.1	OSK-Reprogrammierung mit ESCC- und 181-miRNAs.....	55
E 2.2	Mimic-Transfektion in früher und später Phase der Reprogrammierung.....	57
E 2.3	Kombinierte Transfektion von miR-294 und miR-181d.....	57
E 2.4	Verifikation der Pluripotenz erhaltener iPSC-Linien.....	58
E 2.4.1	Expression der Pluripotenzfaktoren Nanog und SSEA1.....	58
E 2.4.2	Chimärismus und Keimbahnkontribution .....	60
E 2.4.3	Chromosomenanalyse.....	62
E 3	Signalwegsanalyse in der Reprogrammierung mit miR-294 und miR-181d.....	63
E 3.1	Einfluss auf den PI3K/Akt-Signalweg .....	63
E 3.2	Einfluss auf den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg .....	67
F	Diskussion .....	72
F 1	Wirkdauer von miRNA-Mimics nach Transfektion .....	72
F 2	Wirkung von miR-294 auf die Reprogrammierung.....	74
F 3	Wirkung von miR-181d auf die Reprogrammierung.....	75
F 4	Gemeinsame Wirkung von miR-294 und miR-181d .....	76
F 5	PI3K/Akt-Signalweg in der Reprogrammierung mit miR-294 und miR-181 .....	77
F 6	Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in der Reprogrammierung mit miR-294 und miR-181 ...	78
F 7	Fazit und Ausblick.....	79
	Literaturverzeichnis.....	81
	Abbildungsverzeichnis .....	95
	Tabellenverzeichnis .....	97
	Danksagung.....	98
	Curriculum Vitae .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
	Publikationen und Kongressbeiträge .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Kurzform	Vollständige Bezeichnung
A. dest.	Destilliertes Wasser
APC	Adenomatous-polyposis-coli-Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
CK1a	Casein kinase 1 alpha
DAPI	Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonic day / Tag der intrauterinen Embryonalentwicklung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
endo-siRNA	Endogene small interfering RNA
EpiSC	Epiblast Stammzellen
ESC	Embryonale Stammzellen
ESCC-miRNA	ESC-specific cell cycle-regulating miRNA
FBS	Fetales Bovines Serum
GFP	Green Fluorescent Protein
GSK3β	Glykogensynthase-Kinase 3 Beta
h	Stunden
HBSS	Hanks' Balanced Salt solution
HCI	High Content Imaging
hESC	Humane embryonale Stammzellen
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzellen
IZM	Innere Zellmasse
LNA	Locked nucleic acid
LTR	Long terminal repeat
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
mESC	Murine embryonale Stammzellen
min	Minuten
miR, miRNA	microRNA
mRNA	Messenger RNA
mTORC2	Mammalian target of rapamycin-Complex 2
OSK	Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Klf4
PcG	Polycomb-Gruppen Proteine
PCP	Planar cell polarity-Signalweg
PDK1/2	Phosphoinositide-dependent Kinase-1/2
PIP <sub>2/3</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat / Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PP2A	Proteinphosphatase 2
pre-miRNA	Precursor microRNA
pri-miRNA	Primäre microRNA
PSC	Pluripotente Stammzellen
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RISC	RNA-induced silencing complex
RLuc	Renilla Luciferase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen
s	Sekunden
SCID	Severe Combined Immunodeficiency Syndrome
siRNA	Small interfering RNA
UTR	Untranslatierte Region

# A ÜBERSICHT

## A 1 Zusammenfassung

Die künstliche Umwandlung (Reprogrammierung) von reifen, ausdifferenzierten Zellen, z.B. Fibroblasten, in unreife, differenzierungsfähige Stammzellen, sog. *induced pluripotent stem cells* (iPS-Zellen oder iPSCs) ist eine zukunftssträchtige Technik mit hohem Potential für die medizinische Forschung, etwa bei Verwendung als *in vitro*-Zellmodell, aber auch in der Therapie, insbesondere im Bereich der regenerativen Medizin. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen sind iPSCs ethisch unbedenklich und umgehen das Problem der Immunabstoßung, da sie aus körpereigenen Zellen des Patienten hergestellt werden. Die Technologie der Reprogrammierung adulter Zellen wurde 2006 erstmals etabliert und erfolgt mittels retroviral-vermittelter Überexpression der Proteine Oct4, Sox2 und Klf4 (OSK). Die Rolle endogener microRNAs (miRNAs) und zellulärer Signalwege, sowie die damit verbundenen molekularen Mechanismen bei der Regulation der Reprogrammierung, sind seitdem Gegenstand intensiver Forschung, aber bleiben bis heute noch weitgehend ungeklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Zellmodell muriner Fibroblasten (MEFs) miRNAs zu identifizieren, die die Effizienz der Reprogrammierung im Rahmen des OSK-Protokolls erhöhen, um nachfolgend herauszufinden, welche intrazellulären Signalwege diesem Effekt zugrunde liegen. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hatten *in silico*-Analysen Hinweise dafür geliefert, dass miR-294 und miR-181d sowie die davon möglicherweise beeinflussten Signalwege von PI3K/Akt und Wnt/ $\beta$ -Catenin mögliche Kandidaten darstellen.

Zunächst wurden nach Herstellung spezieller Reporterkonstrukte umfassende Studien zur Stabilität von miRNA-Mimics nach deren Transfektion in Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die maximale Wirkung von Mimics bezogen auf die Bindung der Ziel-mRNA und Hemmung der Transkription für bis zu 7 Tage nach Transfektion in den Zellen anhält. MEFs wurden 24 h nach Beginn der OSK-Reprogrammierung mit miR-294-Mimic oder miR-181d-Mimic transfiziert. Diese Behandlung erhöhte die Reprogrammierungseffizienz der MEFs in iPSCs um den Faktor 14 (für miR-294) bzw. 3 (für miR-181d). Der Effekt war aber nur dann zu beobachten, wenn die Mimic-Transfektion innerhalb von 1 – 4 Tagen nach Beginn der OSK-Reprogrammierung, d.h. in der Initiierungsphase, durchgeführt wurde. Ein additiver Effekt oder Synergismus bei Kotransfektion beider Mimics in die Zellen war nicht festzustellen. Die nach Mimic-Transfektion generierten iPSCs wiesen alle Kennzeichen für Pluripotenz auf. Dies wurde durch Blastozysteninjektion und Überprüfung des Chimärismus, sowie den immunzytochemischen Nachweis typischer Pluripotenzmarker verifiziert. Die

Effizienz-steigernde Wirkung beider Mimics wird tatsächlich durch Aktivierung des PI3K/Akt- und Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in der Frühphase der OSK-Reprogrammierung vermittelt, wie anhand von Westernblotuntersuchungen, Immunzytochemie und Einsatz spezifischer Luciferase-basierter Reporterassays übereinstimmend belegt werden konnte. Dabei zeigte sich, dass PI3K/Akt von miR-294 und Wnt/ $\beta$ -Catenin von miR-294 wie auch miR181d aktiviert wird. Interessanterweise scheinen also unterschiedliche, von beiden miRNAs beeinflusste Signalwege, ähnliche, stabilisierende Effekte auf den Prozess der OSK-Reprogrammierung in den Zellen auszuüben.

Die Resultate der vorliegenden Studien liefern erstmals experimentelle Belege dafür, dass die Transfektion von miR-294 und miR-181d in adulte Fibroblasten die Wirksamkeit des klassischen OSK-Protokolls zur Gewinnung pluripotenter Stammzellen steigert. Somit kann möglicherweise auch deren sichere Anwendbarkeit in der regenerativen Medizin, insbesondere der zell-basierten Therapie, verbessert werden.

## A 2 Summary

The artificial transformation (reprogramming) of adult, differentiated cells, e.g. fibroblasts into naïve pluripotent stem cells, called induced pluripotent stem cells (iPSCs) is a highly-promising technique in medical and pharmaceutical research. These artificially reprogrammed cells could serve as *in vitro* cellular disease model and could also harbor the possibility to be employed for cellular therapies in regenerative medicine. In contrast to embryonic stem cells, iPSCs are less ethically problematic and circumvent immunologic rejection when replanted autologously. This reprogramming technique was first described in 2006 and was achieved via retrovirally conveyed overexpression of the pluripotency associated transcription factors Oct4, Sox2 and Klf4 (OSK-reprogramming). The role of endogenous microRNAs (miRNAs), cellular signaling pathways and their associated molecular mechanisms in the context of reprogramming were extensively studied since then but remain largely elusive.

The aim of this study was to identify miRNAs that enhance the efficiency of OSK-reprogramming in murine embryonic fibroblasts (MEFs) and to study signaling pathways which are associated with these miRNAs. Preceding studies of our research group included computationally derived *in silico* analysis which revealed miR-294 and miR-181d as putative OSK-reprogramming enhancers and PI3K/Akt- and Wnt/ $\beta$ -Catenin-signaling as putative target pathways in this setting.

Initially, we showed by use of specific reporter constructs that miRNA mimics are actively inhibiting target mRNA molecules for 7 days in MEFs. Transfection of miRNAs was performed 24 hours after initiation of OSK-reprogramming. In presence of these miR-294

and miR-181d, reprogramming efficiency, i.e. the number of successfully reprogrammed colonies, was increased 14-fold and 3-fold respectively. In a time-series experiment, we were able to show that only transfection of these miRNAs in the early phase of reprogramming (days 1 – 4) resulted in increased iPSC colony formation. An additive effect or synergy upon cotransfection of these miRNAs was not visible. The resulting colonies were verified for their true pluripotent embryonic stem cell like state using different methods, i.e. blastocyst injection with chimera formation and immunocytochemical detection of endogenous pluripotency markers.

After corroborating the *in silico* analysis with this experimental data, we employed Western blot, immunocytochemistry and luciferase reporter assays to show that the reprogramming efficiency-increasing effect of these miRNAs in the initiation phase of OSK-reprogramming was at least in part mediated through PI3K/Akt-signaling and canonic Wnt/ $\beta$ -Catenin-signaling. PI3K/Akt-signaling was upregulated upon transfection of miR-294 and canonic Wnt/ $\beta$ -Catenin-signaling was upregulated by miR-294 and miR181d.

The present study for the first time provides experimental evidence, that transfection of miR-294 and miR-181d in adult fibroblasts increases the efficiency of the established OSK-reprogramming protocol which might ultimately facilitate its use for safe cell-based therapy in regenerative medicine.



# B EINFÜHRUNG

## B 1 Stammzellen

Stammzellen sind körpereigene Zellen, die im Stande sind, verschiedene Zell- und Gewebetypen auszubilden. Charakteristisch ist ihre Fähigkeit zur asymmetrischen Zellteilung, d.h. sowohl zur Selbsterneuerung durch Bildung identischer Tochterzellen mit Stammeigenschaften als auch zur Ausdifferenzierung in reifere Zelltypen. Dabei unterscheiden sich Stammzellen durch den Grad ihres Differenzierungspotenzials. Unipotente Zellen sind in der Lage, lediglich einen Zelltyp auszubilden, wie etwa viele Progenitorzellen. Oligopotente und multipotente Stammzellen hingegen können je nach Beeinflussung in wenige bzw. mehrere verschiedene Zellarten reifen, wie dies zum Beispiel bei vielen hämatopoetischen Stammzellen zu finden ist. Auf die Begriffe Toti- und Pluripotenz wird im Folgenden genauer eingegangen.

Die nach Befruchtung der Eizelle entstandene Zygote besteht nach mehreren Teilungszyklen aus totipotenten Stammzellen, die jeweils im Stande sind, einen vollständigen Organismus hervorzubringen. Pluripotente (embryonale) Stammzellen (PSCs) haben diese Fähigkeit nicht mehr, können aber jede beliebige, somatische Stamm- und Progenitorzelle des erwachsenen Organismus ausbilden. Im Fokus der vorliegenden Arbeit lagen murine *in vivo* Stammzellen der inneren Zellmasse (IZM) und des Epiblasten sowie *in vitro* Stammzellen, die aus diesen Stadien der Embryonalentwicklung gewonnen wurden. Hierzu gehören embryonale Stammzellen (ESC) und Epiblast-Stammzellen (EpiSC). Ein weiterer Schwerpunkt lag auf Untersuchungen zu Eigenschaften von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs). Diese werden aus somatischen Zellen durch Einsatz von *in vitro* Manipulation und einem Vorgang, der als Reprogrammierung oder auch Dedifferenzierung bezeichnet wird, gewonnen.

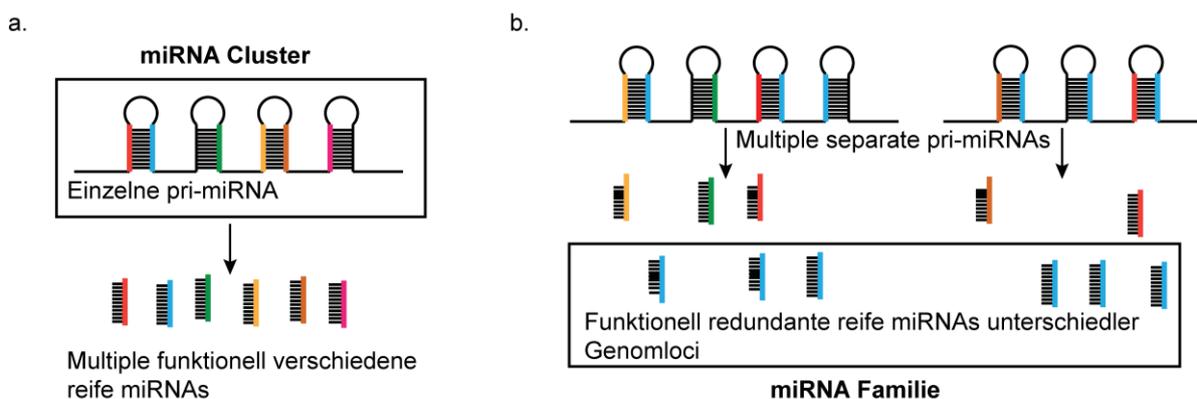
Murine ESCs können aus der IZM von Blastozysten extrahiert werden [3,4]. Diese exprimieren eine Reihe gut charakterisierter Transkriptionsfaktoren, die zur Zellerneuerung und Aufrechterhaltung der Pluripotenz beitragen [5]. Werden mESCs in Blastozysten injiziert, integrieren sie sich in die IZM und tragen auf diese Weise zur Entstehung sämtlicher Gewebe im Embryo bei. Entsprechend modifizierte Individuen werden als Chimären bezeichnet [6-8].

In der Maus formt sich am Tag 3,5 der Embryonalentwicklung (E3,5) die Blastozyste. Diese besteht aus der IZM und dem Trophektoderm. Zellen der IZM werden als pluripotent bezeichnet, weil sie sich zu jedem Gewebetyp des Embryos differenzieren können. Die IZM selbst differenziert sich zu primitivem Entoderm und dem Epiblasten [9]. Die Zellen des Epiblasten bilden im weiteren Verlauf alle Zelllinien des Embryos und werden daher ebenfalls

als pluripotent bezeichnet. Stabile Linien pluripotenter Stammzellen können bis zum Tag 8 der murinen Embryonalentwicklung gewonnen werden (E8,0), obwohl die Gastrulation, d.h. die Formation der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Entoderm, bereits begonnen hat [10]. Ob es sich bei diesen Zellen um *in vitro* dedifferenzierte E8,0 Zellen oder aber Überreste pluripotenter *in vivo* Zellen handelt, ist unklar. Die Transkriptionsfaktoren, welche die Pluripotenz in Stammzellen aufrechterhalten, sind zunehmend gut charakterisiert. Oct4, Sox2 und Nanog wurden in der IZM und in ESCs als hierarchisch übergeordnete Pluripotenzfaktoren identifiziert [5,11-14]. Sie binden oft gemeinsam an Promotoren vieler miRNA- und Protein-kodierender Gene in ESCs. Sie aktivieren hierdurch Gene, inklusive ihrer eigenen, welche die Aufrechterhaltung von Pluripotenz fördern [15,16]. Zudem kommt es durch Kookkupation von Oct4, Sox2 und Nanog mit Polycomb-Gruppen Proteinen (PcG) auch zur Repression von Genen, welche in der Zelldifferenzierung involviert sind [17,18].

## B 2 miRNA

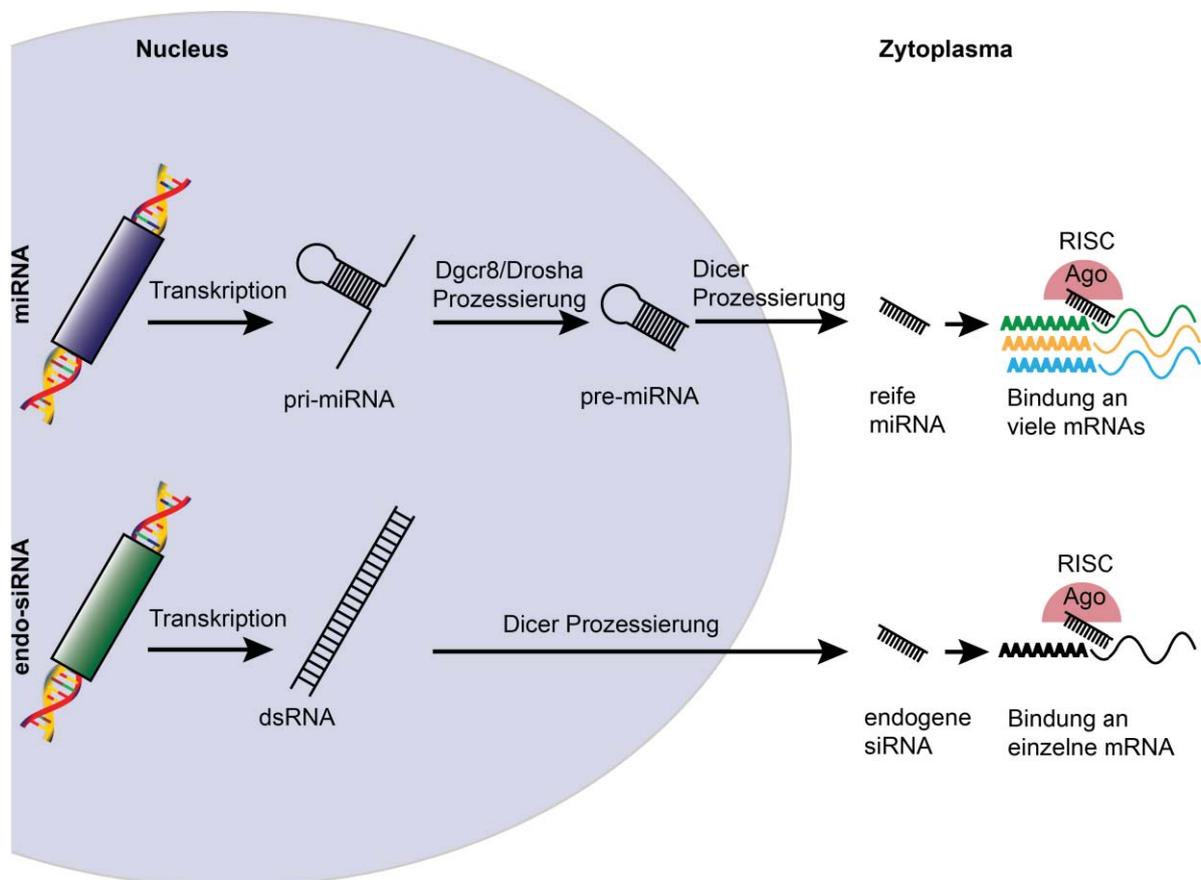
Bei miRNAs handelt es sich um nicht kodierende, kurze RNA-Moleküle mit einer Länge von meist 20 – 23 Basen, die hoch spezifisch an Ziel-mRNAs binden und die Translation hemmen [19]. Aktuell sind weit über tausend verschiedene miRNA-Sequenzen beschrieben, die die Bildung von mehr als 60% aller Genprodukte regulieren [20]. Einzelne miRNAs können wenige oder auch hunderte verschiedene mRNAs binden und in ihrer Funktion hemmen, sodass sich ein sehr komplexes Regulationsnetzwerk ergibt [21]. Das Bindungsmotiv von miRNAs heißt *Seed*-Sequenz und umfasst 6 – 8 Basen am 5' Ende der miRNA. Hierüber wird die Bindung an die Ziel-mRNA vermittelt [22]. miRNAs mit übereinstimmender *Seed*-Sequenz binden identische Ziel-mRNAs und werden als miRNA-Familie bezeichnet. Mehrere miRNAs, die vom selben Genlocus als Primärtranskript transkribiert werden, bezeichnet man als miRNA-Cluster (**Abb. 1**) [23].



**Abb. 1: Klassifikation von miRNAs**

Es werden miRNA-Cluster und -Familien unterschieden. miRNA-Cluster werden als pri-miRNA transkribiert und in reife miRNAs mit verschiedenen Seed-Sequenzen prozessiert. Eine miRNA-Familie ist eine Gruppe von miRNAs mit gleicher oder ähnlicher Seed-Sequenz, die mitunter von unterschiedlichen Genloci bzw. Clustern transkribiert wird. Bildmaterial Greve et al., 2013 mit Modifikationen [1].

Ein Genlokus, welcher meist mehrere miRNAs kodiert, wird zunächst als längeres Transkript, der sog. primären miRNA (pri-miRNA) abgelesen [24] und durch die Enzyme Drosha und Dicer im Zellkern bzw. Zytoplasma in reife doppelsträngige miRNAs prozessiert. Die reifen miRNAs rekrutieren RNA-Bindeproteine der Argonautenfamilie und bilden den *RNA-induced silencing complex* (RISC) aus [22,25-27]. Durch komplementäre Bindung der *Seed*-Sequenz der miRNA bindet der RNA-beladene RISC am 3'-untranslatierten Ende (UTR) der Ziel-mRNA [28]. Abhängig von der Bindungsenergie der Basenpaarung zwischen miRNA und Ziel-mRNA erfolgen entweder eine Destabilisierung mit anschließendem Abbau der mRNA oder eine Hemmung der mRNA-Translation. Dabei begünstigt eine perfekte Paarung zwischen *Seed*-Sequenz und Bindungsmotiv eine mRNA-Degradation, wohingegen eine partielle Komplementarität der Sequenzen eine Hemmung der mRNA-Translation begünstigt [29-31]. Letzter Mechanismus spielt *in vivo* dabei die größere Rolle [32] (**Abb. 2**).



**Abb. 2: Schema der miRNA-Biogenese**

Die RNA-Polymerase II transkribiert miRNA-Cluster in Form von pri-miRNAs, die durch das RNase-III Enzym Drosha und das RNA-Bindeprotein Dgcr8 in ca. 70-nt lange, Hairpin-geformte Präkursor miRNAs (pre-miRNAs) prozessiert werden. Nach Ausschleusung der pre-miRNAs vom Nucleus in das Zytoplasma werden sie durch das RNase-III-ähnliche Enzym Dicer in 20 – 23 nt lange, doppelsträngige reife miRNA-Moleküle gespalten. Ein Strang wird dann durch ein RNA-Bindeprotein der Argonautenfamilie (Ago1 – 4) gebunden und formt den RISC. Endogene small interfering RNAs (endo-siRNAs) umgehen die Prozessierung durch Drosha und Dgcr8. Ihre doppelsträngigen Vorläufer (dsRNA) werden erst durch Dicer gespalten, bevor sie zur Formierung des RISC beitragen. Bildmaterial Greve et al., 2013 mit Modifikationen [1].

## B 2.1 miRNA Expression und Funktion in Stammzellen

Das miRNA Profil von PSCs ist mittlerweile gut charakterisiert [16,33-38]. In somatischen adulten Zellen wird meist eine Vielzahl verschiedener Familien exprimiert. Hingegen überwiegt in PSCs eine bestimmte miRNA-Familie deutlich gegenüber allen anderen. Diese wird *ESC-specific cell cycle-regulating* (ESCC) miRNA-Familie genannt. miRNAs dieser Familie weisen die gemeinsame Seed-Sequenz **AAGUGC** auf [38] (**Abb. 3**).

ESCC Familie	
miR-302 Cluster	miR-302a uaagugcuuccauguuuugguga
	miR-302b uaagugcuuccauguuuaguag
	miR-302d uaagugcuuccauguuugagugu
	miR-291a-3p aaagugcuuccacuuugugugc
miR-290 Cluster	miR-294 aaagugcuuccuuuuugugugu
	miR-295 aaagugcuacuacuuugagucu

**Abb. 3: Die Familie der ESCC-miRNAs und ihre Sequenzen**

Das miR-302 Cluster enthält die miRNAs miR-302a, b, c und das miR-290 Cluster enthält miR-291a-3p, 294, 295. Die 7 nt messende Seed-Sequenz ist gleich und entspricht der der ESCC-Familie. Bildmaterial Greve et al., 2013 mit Modifikationen [1].

Die einzelnen Mitglieder dieser miRNA-Familie werden von verschiedenen Clustern transkribiert. Obwohl sich das Expressionsniveau dieser miRNA-Cluster in mESCs, mEpiSCs und hESCs unterscheidet, dominiert die ESCC-Superfamilie mit einem absoluten miRNA-Anteil von 20-50% (**Tabelle 1**). PSCs bilden somit eine hohe Zahl funktionell redundanter miRNAs.

Während der Differenzierung von PSCs ist die Synthese von ESCC-miRNAs supprimiert [34]. Dies lässt vermuten, dass die ESCC-miRNAs wichtige Aufgaben für die Aufrechterhaltung und Funktion der Pluripotenz in PSCs erfüllen.

Im Jahr 2008 konnten drei Arbeitsgruppen eine Verbindung zwischen der Synthese der Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog mit den dominanten und Pluripotenz-spezifischen miRNA-Clustern mmu-miR-290-295, hsa-371-372, sowie den konservierten Clustern miR-302-367 und miR-106a-363 herstellen [16,39,40]. All diese Cluster beinhalten auch Mitglieder der ESCC-Familie.

	Anteil der zellulären miRNA pro Hundert [%]					Spezies-konservierung	Tumor-assoziation
	hESC		mESC		mEpiSC		
	Min.	Max.	Min.	Max.	Einzelstudie		
Cluster mit ESCC-miRNAs							
miR-371-373	0,00	0,67	–	–	–	hsa, mml	Keimzelltumor
miR-290-295	–	–	14	63	4	mmu, rno	Plazenta, Keimzelltumor
miR-302-367	15,00	31,00	0,1	0,9	23,5	hsa, mml, mmu, xtr	Keimzelltumor
miR-17-92b	5,00	13,00	6	17,5	2,7	hsa, mml, mmu, rno, xtr, dre	Keimzelltumor, Lymphom
miR-106a-363	0,50	1,50	2,3	4,8	2,9	hsa, mml, mmu, rno, xtr, dre	Keimzelltumor, Lymphom
miR-106b-25	0,25	6,00	1,9	3,1	1,8	hsa, mml, mmu, rno, xtr, dre	Keimzelltumor, Lymphom
Gesamtanteil ESCC-miRNAs							
	16,00	36,00	19	44	32		
Referenz							
	Morin, 2008 [36]	Bar, 2008 [35]	Jouneau, 2012 [37]	Marson, 2008 [16]	Jouneau, 2012 [37]	Kiezun, 2012 [38]	Landgraf, 2007 [34]

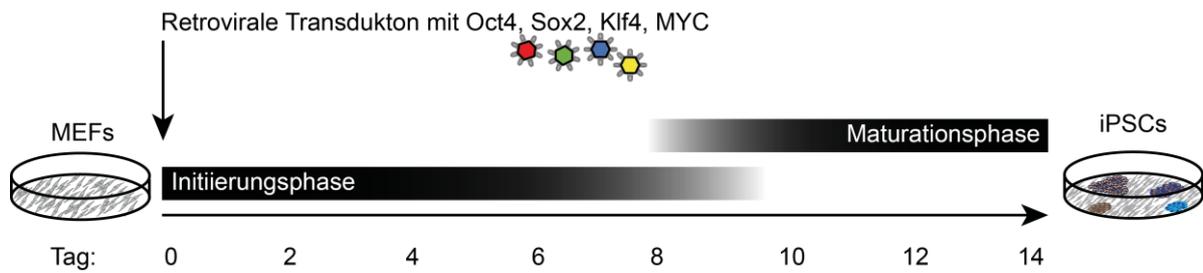
**Tabelle 1: miRNA-Expression in pluripotenten Stammzellen**

Abkürzungen: dre, *Danio rerio*; hsa, *Homo sapiens*; mml, *Macaca mulatta*; mmu, *Mus musculus*; rno, *Rattus norvegicus*; xtr, *Xenopus tropicalis*. Tabelle Greve et al., 2013 mit Modifikationen [1].

### B 3 Reprogrammierung

Unter Reprogrammierung versteht man im Allgemeinen ein Remodelling epigenetischer Markierungen und damit eine Änderung des Differenzierungsstatus einer Zelle oder Zellpopulation. Dies geschieht physiologischerweise während der Embryonalentwicklung, kann aber auch *in vitro* erreicht werden [41]. In letzterem Fall wird der Terminus für die direkte *in vitro*-Dedifferenzierung von somatischen Zellen zurück zu pluripotenten Zellen durch exogene Überexpression von Transkriptionsfaktoren verwendet. Prinzipiell kann Reprogrammierung in jeder somatischen Zelle durchgeführt werden. Als besonders geeignet haben sich Fibroblasten erwiesen, da diese relativ leicht zugänglich und einfach kultivierbar sind.

Im Jahr 2006 konnte dies an murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) erstmals gezeigt werden. Nach retroviral-vermittelter exogener Überexpression der Proteine Oct4, Sox2, Klf4 und MYC (OSKM) nahm eine Subpopulation der Zellen die Morphologie und das molekulare Profil von ESCs an [42,43]. Die dafür benötigten Transkriptionsfaktoren werden Pluripotenzfaktoren und die damit erhaltenen Zellen induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) genannt (**Abb. 4**).



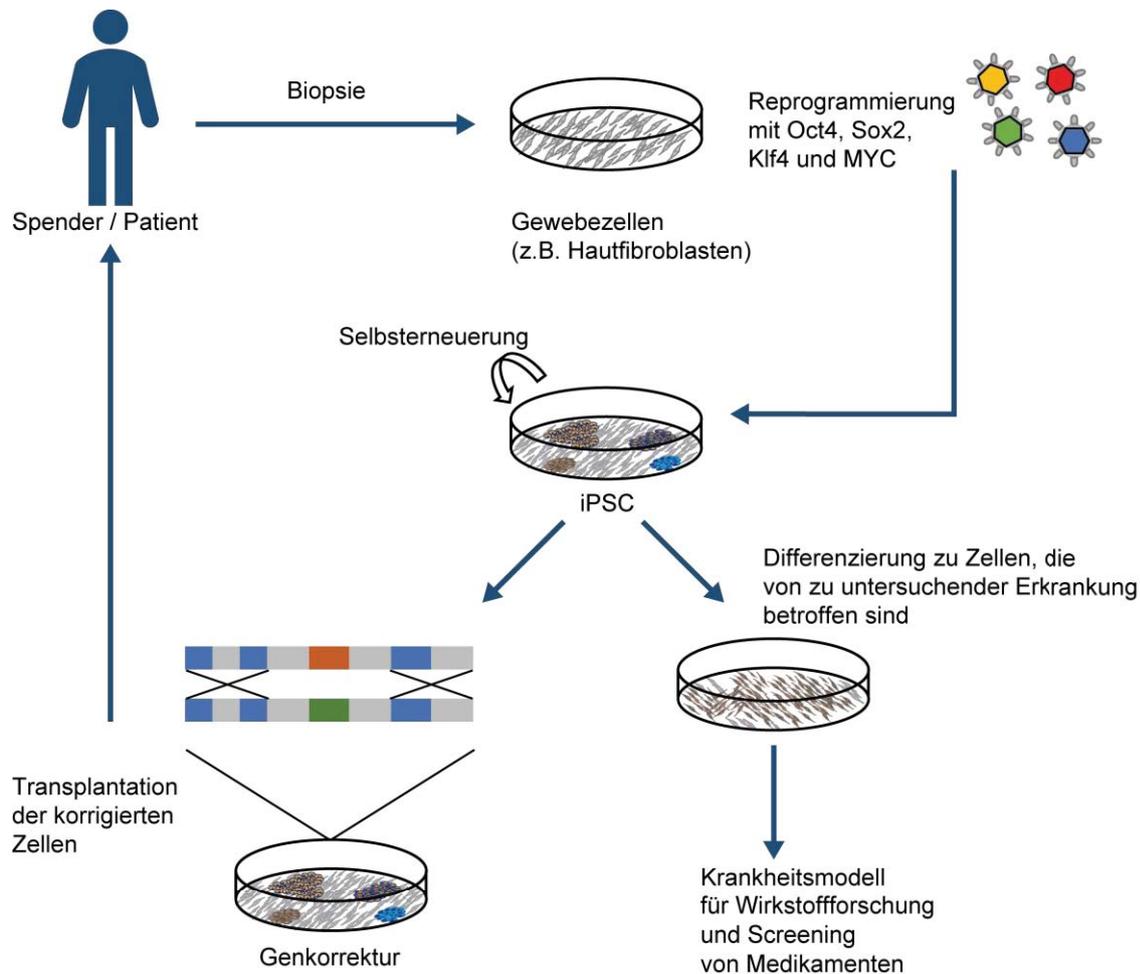
**Abb. 4: Schematische Darstellung der Reprogrammierung**

Im Originalprotokoll der Erstbeschreiber werden die Pluripotenzfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und MYC retroviralvermittelt in MEFs überexprimiert. Die transduzierten Zellen durchlaufen eine Initiierungsphase mit einer Mesenchymal-Epithelialen-Transition. Ein kleiner Anteil der Zellen überwindet diese Hürde und tritt in die Maturationsphase über. Nach ca. 14 Tagen entstehen die ersten iPSCs. Für die Verifikation von Stammzeleigenschaften und die weitere Anwendung werden die potenziellen iPSC-Kolonien gepickt und subkultiviert. Bildmaterial Judson et al., 2013 mit Modifikationen [2].

Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass sich die über diese sog. OSKM-Reprogrammierung generierten iPSCs nicht nur unbegrenzt teilen, sondern auch in die drei Keimblätter differenzieren und zur Bildung von Chimären beitragen konnten.

Die etablierte Reprogrammierungstechnologie somatischer Zellen erregte aufgrund ihrer enormen Relevanz für eine Vielzahl pharmakologischer und medizinischer Anwendungsmöglichkeiten insbesondere in der regenerativen Medizin große Aufmerksamkeit [44-46]. So erleichtert sie die Modellierung ansonsten schwer in Kultur zu untersuchender Erkrankungen. Weiterhin birgt diese Technik theoretisch die Möglichkeit, Patienten Zellen zu entnehmen, bei diesen *in vitro* Genkorrekturen durchzuführen und autolog zu retransplantieren. Eine Abstoßungsreaktion würde somit umgangen werden. Weiterhin machen iPSCs die Verwendung menschlicher Embryonen für diagnostische und therapeutische Zwecke überflüssig (Abb. 5).

Die retroviral-vermittelte Überexpression von Transkriptionsfaktoren birgt die Gefahr der dauerhaften genomischen Integration der retroviral eingeschleusten Gene und damit auch der vermeintlichen Re-Aktivierung dieser Loci. Darüber hinaus besteht die Gefahr der Insertionsmutagenese und ein hierdurch bedingtes erhöhtes Mutationsrisiko der resultierenden Zellen sofern sie nach erneuter Differenzierung autolog reimplantiert werden sollen [47,48]. Da insbesondere die vermehrte Synthese des Transkriptionsfaktors und potenten Onkogens MYC zur Tumorentstehung beitragen kann [49], wurde in Folgestudien die Reprogrammierung mit alleiniger Überexpression von Oct4, Sox2 und Klf4 etabliert (OSK-Reprogrammierung). Dieses MYC-freie Protokoll weist bei geringerer Gesamtzahl resultierender pluripotenter Kolonien (Reprogrammierungseffizienz) aufgrund einer verlangsamten Zellteilungsrate eine konsistentere Kinetik auf. Damit ist es ein besonders geeignetes Modell für die Identifikation neuer putativ Reprogrammierungsfördernder Moleküle wie Transkriptionsfaktoren, miRNAs oder anderer Zusatzstoffe [50,51].



**Abb. 5: Gewinnung und mögliche Anwendung von iPSCs**

Adulte Zellen werden mittels retroviraler-vermittelter Überexpression von Pluripotenzfaktoren zu iPSCs reprogrammiert. Die gewonnenen iPSC-Linien werden subkultiviert und können als *in vitro* Krankheitsmodell, expandiert oder nach genetischer Modifikation in den Patienten replantiert werden. Bildmaterial Roßbach et al., 2011 mit Modifikationen [52].

Grundsätzlich ist die Reprogrammierung in eine Initiierungsphase und eine Maturationsphase gegliedert (Abb. 4) [53,54]. Eine vollständige Initiierungsphase ist durch eine erfolgreiche Mesenchymale-Epitheliale-Transition (MET) mit Aktivierung von E-Cadherin gekennzeichnet. In der Maturationsphase werden daraufhin verschiedene Pluripotenzfaktoren in hierarchischer Reihenfolge aktiviert [54]. Die Maturationsphase wird dabei nur von einer Subpopulation der transduzierten MEFs ab Tag 8 erreicht [53], da die weitere Progression durch die reverse Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) gehemmt wird, welche durch den Transkriptionsfaktor Snail initiiert und unterhalten wird [53,55]. Die TGF $\beta$ - und Rho-Signalwege sind beide etablierte, positive Einflussfaktoren der EMT [56,57]. Die Pluripotenz von reprogrammierten Kolonien putativer iPSCs wird über ein mehrstufiges Verfahren verifiziert. Hierbei wird die Fähigkeit zur Chimärenbildung und Keimbahnkontribution der entstandenen iPSCs getestet. Zusätzlich erfolgt der Nachweis von Pluripotenzmarkern, wie Nanog und SSEA1, auf mRNA oder Proteinebene gemessen. Darüber hinaus erfolgt die Bestimmung des Anteils an iPSCs mit korrektem Chromosomensatz bestimmt.

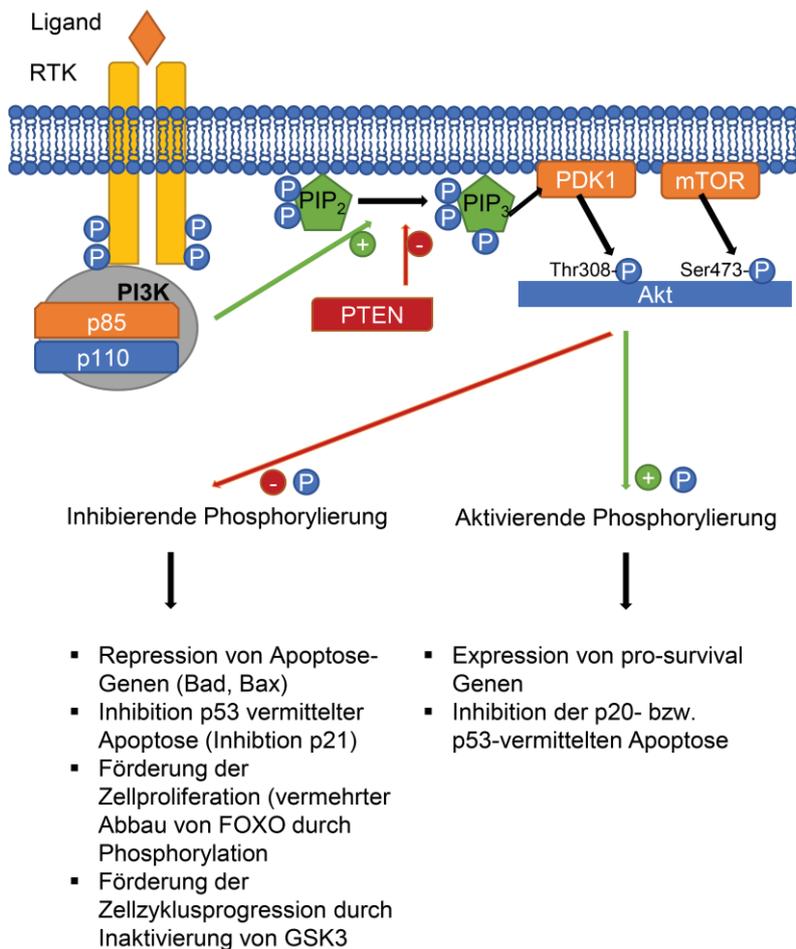
### B 3.1 miRNAs in der Reprogrammierung

Im Allgemeinen verläuft der Prozess der Reprogrammierung innerhalb einer Zellpopulation nicht homogen, sodass nie alle Zellen den gleichen Entwicklungsstatus und das damit verbundene Transkriptionsprofil aufweisen [53,54,58,59]. Unterschiede ergeben sich auch durch die verschiedenen Kombinationen an Faktoren, die für die Reprogrammierung verwendet werden, durch Abweichungen der Überexpressionstechniken oder auch aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzung der Zellkulturmedien. Jeder dieser Faktoren führt mitunter zu deutlichen Unterschieden im Transkriptom und in der Effizienz der Reprogrammierung [58,60,61]. Interessanterweise haben einige miRNAs unabhängig der gewählten Reprogrammierungskonditionen reproduzierbare Effekte auf die Genexpression. So konnte für etwa ein Dutzend miRNAs gezeigt werden, dass deren exogene Überexpression die Anzahl resultierender pluripotenter Kolonien erhöht [56,57,62-69], wobei die ESCC-miRNAs die Reprogrammierungseffizienz dosisabhängig um bis zu 70-fach steigerten [66].

Die Pluripotenz-assoziierten miR-290- und miR-302-Cluster werden endogen erst spät während der Reprogrammierung aktiviert [59,66,70], da der Promotor dieses Clusters zwar von Oct4, Sox2 und Klf4 gebunden wird, eine Transkription jedoch erst nach epigenetischer Remodllierung des Promotors erfolgt [16,66].

### B 4 PI3K/Akt-Signalweg

Der PI3K/Akt-Signalweg überträgt extrazelluläre Signale ins Zellinnere und ist in Eukaryoten hoch konserviert. Die Schlüsselenzyme sind die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Serin/Threonin-Kinase Akt, auch genannt Proteinkinase B, welche drei Isoformen (Akt 1 – 3) besitzt [71]. Liganden wie das Wachstumshormon *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) binden und stimulieren dabei transmembranäre Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK). Dies führt an der intrazellulären Seite der Plasmamembran zur Rekrutierung und Aktivierung des dimeren Moleküls PI3K. Aktive PI3K phosphoryliert membranständiges PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub>. Dieses wiederum rekrutiert Akt an die innere Zellmembran, wo es durch PDK1 [72] sowie mTOR [73] und eine Reihe weiterer Enzyme phosphoryliert und somit aktiviert wird [74]. Neben der PI3K-vermittelten Akt-Aktivierung existieren auch weitere Tyrosin- oder Serin/Threonin-Kinasen, welche Akt in Abhängigkeit bestimmter Stimuli phosphorylieren [75,76]. Ein wichtiger negativer Regulator des PI3K/Akt-Signalweges ist das Protein *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN), welches PIP<sub>3</sub> dephosphoryliert und damit die Rekrutierung von Akt zur Zellmembran inhibiert. PTEN ist ein Tumorsuppressorgen [74,77] (**Abb. 6**).



**Abb. 6: Der PI3K/Akt-Signalweg**

Ablauf der Aktivierung der Proteinkinase Akt und hierdurch ausgelöste zellulärer Effekte. Liganden aktivieren transmembranäre Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK). Dies führt intrazellulär zur Rekrutierung und Aktivierung des von PI3K. Aktive PI3K phosphoryliert membranständiges PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub>. Dieses wiederum rekrutiert Akt an die innere Zellmembran, wo es durch PDK1 und mTOR an Threonin (308) und Serin (473) phosphoryliert und somit aktiviert wird. Weitere Details siehe Text.

Signaltransduktion, die zu aktiviertem Akt führt, beeinflusst das Überleben, die Proliferation, das Wachstum und die Migration von Zellen [78-82].

Sie inhibiert antiapoptotisch wirkende Proteine durch Regulation auf Transkriptionsebene oder auch durch direkte Proteinphosphorylierung [71]. Ein Beispiel direkter Phosphorylierung ist die Familie der apoptotisch wirkenden Forkhead Transkriptionsfaktoren, welche hierdurch vom Nukleus in das Zellplasma translozieren und proteasomal abgebaut werden [83].

Akt fördert die G1-S-Zellzyklusprogression durch Hyperphosphorylierung und Inaktivierung von GSK3β, was zu verringerter Degradierung von Cyclin D1 führt [71]. Die Akt-vermittelte Inaktivierung von GSK3β führt auch zu einer verminderten Aktivität des kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalweges [84,85]. Weiterhin reguliert Akt auf direkte und indirekte Weise die CDK Inhibitoren p21<sup>Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup>, was wiederum die Checkpoint-Inhibition hemmt und so die Zellzyklusprogression fördert [86].

Auch die Zellmigration wird vom PI3K/Akt-Signalweg beeinflusst. So etwa phosphoryliert Akt das für das Zytoskelett maßgebliche Aktin, was auch bei der Metastasierung eine wichtige

Rolle spielt [55].

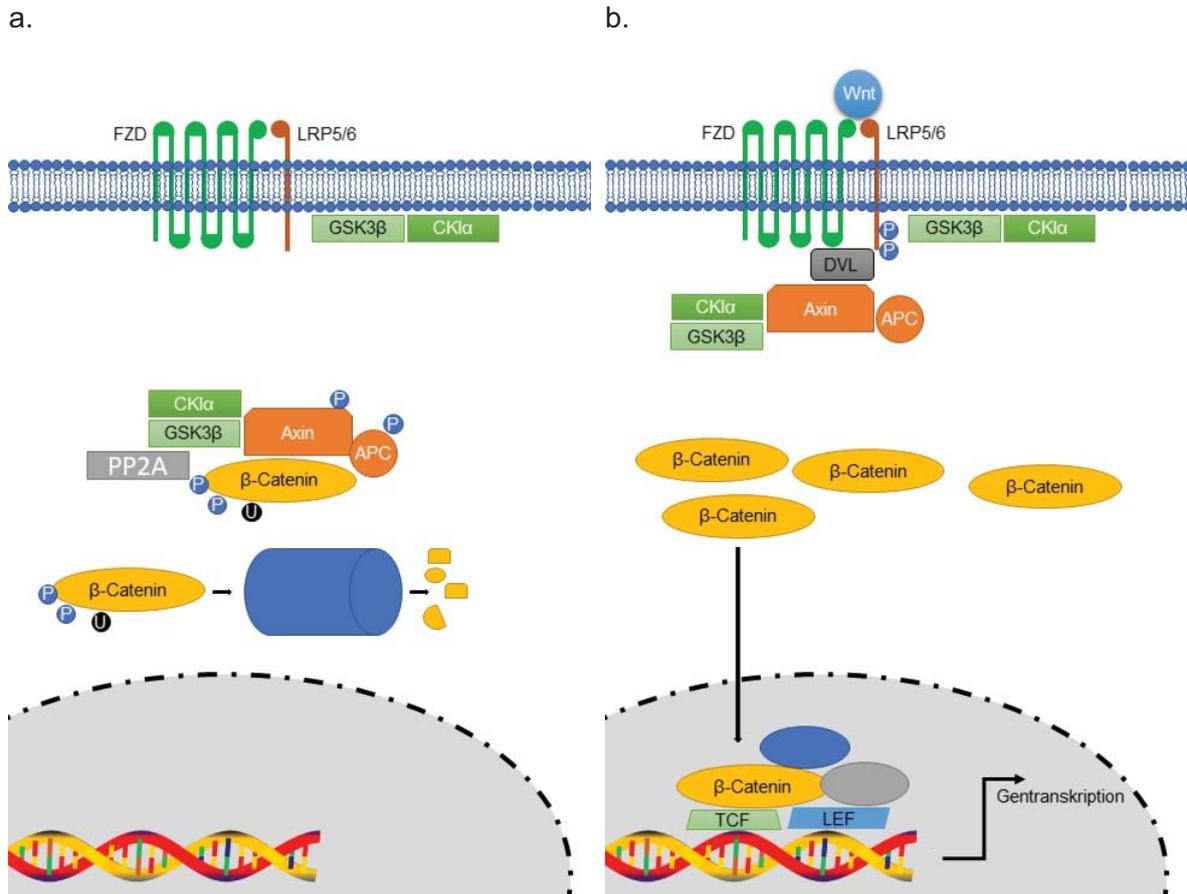
Der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges wurde eine Schlüsselrolle bei der EMT im Rahmen der Onkogenese zugesprochen [55]. Die EMT ist durch eine verminderte Expression von E-Cadherin gekennzeichnet. Akt aktiviert in diesem Kontext das Zink-finger Protein Snail, welches wiederum den Promotor des Gens für E-Cadherin bindet und dessen Transkription reprimiert [87,88].

Auch die Angiogenese wird durch den PI3K/Akt-Signalweg positiv beeinflusst, was für das Tumorstadium eine wichtige Rolle spielt. Der PI3K/Akt-Signalweg wird hierbei durch Bindung von VEGF aktiviert [89] und fördert die Angiogenese über Aktivierung von NFκB [90].

## **B 5 Wnt/β-Catenin-Signalweg**

Auch der Wnt/β-Catenin-Signalweg wird in dieser Arbeit hinsichtlich seiner Rolle in der miRNA verstärkten Reprogrammierung untersucht. Grundsätzlich unterscheidet man den klassischen, kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalweg von zwei nicht-kanonischen Signalwegen, dem Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalweg und der *Planar cell polarity*-Signalweg (PCP-Signalweg). Gemeinsam ist diesen Signalwegen, dass sie evolutionär hoch konserviert sind und über die Bindung eines Wnt-Liganden an einen Rezeptor der Frizzled-Familie aktiviert werden. Der kanonische Wnt/β-Catenin-Signalweg reguliert primär Gentranskription, wohingegen der PCP-Signalweg Einfluss auf das Zytoskelett hat. Der Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalweg reguliert die intrazelluläre Calcium-Konzentration [91,92].

Charakteristisch für den in dieser Arbeit vornehmlich untersuchten kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalweg ist die zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors β-Catenin. Im aktivierten Zustand, d.h. bei Bindung eines Wnt-Liganden an einen Frizzled-Rezeptor, kommt es zur Akkumulation von β-Catenin im Zytoplasma, das in den Nukleus transloziert und durch Komplexbildung mit *T-cell factor/lymphoid enhancing factor* (TCF/LEF) an entsprechenden TCF/LEF-Motiven bestimmter Promotoren die Gentranskription aktiviert [93]. Im inaktiven Zustand hingegen wird β-Catenin durch den sogenannten Degradationskomplex bestehend aus Axin, APC, PP2A, CK1a und GSK3β dual phosphoryliert und nach Ubiquitynylierung im Proteasom abgebaut [93]. Eine regulatorische Rolle spielt hierbei auch das GSK3β-*interacting protein* (GSKIP), welches über Komplexbildung mit weiteren Proteinen GSK3β inhibiert und den kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalweg so aktivieren kann [94,95]. Der kanonische Wnt/β-Catenin-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese, der Tumorgenese und der Geweberegeneration in adultem Knochenmark, Haut und Intestinum [96] (**Abb. 7**).



**Abb. 7: Der kanonische Wnt/β-Catenin-Signalweg**

a. Inaktiver Zustand; β-Catenin wird durch den Degradationskomplex phosphoryliert, ubiquityliert und proteasomal abgebaut. b. Aktiver Zustand; der Degradationskomplex ist inaktiv, β-Catenin akkumuliert im Zytoplasma, transloziert in den Nukleus und bindet mit TCF/LEF an typische Bindungsmotive und aktiviert so die Gentranskription.

Inhibition von GSK3β zusammen mit Inhibition von ERK (Teil der Raf/MEK/ERK-Kaskade) ist ein wichtiger Faktor in der Selbsterneuerung von pluripotenten ESCs. In mESC liegt GSK3β hyperphosphoryliert vor und weist daher eine geringe Kinaseaktivität auf [97]. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass der dem Wnt/β-Catenin-Signalweg nachgeschaltete Effektor TCF3 wichtige Promotorregionen mit Oct4, Sox2 und Nanog kookkupiert. Konträr wurde aber auch nachgewiesen, dass der kanonische Wnt/β-Catenin-Signalweg im Laufe der Differenzierung aktiviert wird [98-100]. Zusammenfassend ist jedoch im pluripotenten naiven Grundzustand der mESC der Wnt/β-Catenin-Signalweg trotz inaktiviertem GSK3β nicht etabliert – β-Catenin befindet sich überwiegend an der Plasmamembran [85,101].

Der Rolle des Wnt/β-Catenin-Signalweges bei der OSK-Reprogrammierung, insbesondere bei Transfektion von miRNAs, ist bisher kaum untersucht.

## C FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Im Fokus dieser Dissertation stand die Frage, inwiefern miRNAs die Effizienz der Reprogrammierung adulter Zellen zu iPSCs fördern und welche Signalwege hierbei eine Rolle spielen.

Durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass von 570 chemisch synthetisierten miRNA-Mimics, welche am Tag 1 und Tag 7 während der OSK-Reprogrammierung transfiziert wurden, nur wenige die Effizienz der Reprogrammierung signifikant und reproduzierbar steigerten. Dazu gehörten miR-302b und miR-294, welche Teil der ESCC-Familie sind. Eine ähnliche Wirkung wurde dabei auch erstmals für Mitglieder der 181-Familie, miR-181a, b, c, d, gezeigt, die bis dahin nicht mit der Reprogrammierung in Verbindung gebracht worden waren. Um herauszufinden, welche intrazellulären Signalwege durch die ESCC- und 181-Familie im Kontext der OSK-Reprogrammierung beeinflusst werden, erfolgte in einer Voruntersuchung eine Kombination aus Literaturrecherchen und *in silico* Analysen. Diese Untersuchungen führten zur Identifizierung einer Reihe regulatorischer Proteine und zellulärer Prozesse. Hierzu zählen Komponenten und Zielgene des Wnt/ $\beta$ -Catenin- und PI3K/Akt-Signalweges.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollten im Zellmodell muriner, embryonaler Fibroblasten (MEFs) folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Wie lange ist die in Fibroblasten transfizierte miRNA während der OSK-Reprogrammierung von MEFs zu iPSCs aktiv?
- Wie wird die OSK-Reprogrammierung von MEFs durch die Transfektion von miR-294 und miR-181d beeinflusst?
- Handelt es sich bei den unter zusätzlicher Einwirkung von miRNAs generierten Zellen tatsächlich um pluripotente Stammzellen?
- Können der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und PI3K/Akt-Signalweg als Kandidaten bei miRNA-unterstützter Reprogrammierung experimentell validiert werden?

Die so gewonnenen Erkenntnisse würden erstmals Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen zulassen, die der miRNA-unterstützten Reprogrammierung von Mausfibroblasten zugrunde liegen und könnten so die klinische Anwendung dieser Technologie verbessern helfen.

# D MATERIAL UND METHODEN

## D 1 Richtlinienkonformes Arbeiten

Die hier beschriebenen Experimente wurden in einem *Biosafety Level 2* Labor durchgeführt. Die Sicherheit des Labors, insbesondere die Arbeit mit Retro- und Lentiviren wurde durch das *UCSF Institutional Biosafety Committee* hinsichtlich der Konformität zu den Richtlinien des amerikanischen Nationalen Gesundheitsinstituts geprüft (NIH Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules). Experimente an Mäusen wurden vom *UCSF Institutional Animal Care and Use Committee* geprüft und freigegeben.

## D 2 Materialien

### D 2.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
3-Achsen Joystick Öl Hydraulik Mikromanipulator MO-202U	Narishige
Airflow	LAS
Bestrahlungsgerät MultiRad 160	Faxitron
BioAssay Reader Bio-Plex 200 Systems	Bio-Rad
Dampfsterilisator	LTE Scientific
Eismaschine	Cole-Parmer Instrument Company
Elektrische Präzisionswaage	Kern
Elektrophoresekammer PROTEAN II XL Cell	Bio-Rad
Elisa-Mikroplattenlesegerät	Bio-Rad
Falkon Roller, Low Profile Roller	Stovall Life Science
Flachbett-Fluoreszenzscanner Odyssey ODY-01085	LI-COR
Flachbett-Gelelektrophorese-Apparatur	Thermo Fisher Scientific
Flow Cytometer BD™ LSR II	BD Biosciences
Gasbrenner	Thermo Fisher Scientific
Gefrierschrank -20°C	Thermo Fisher Scientific
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific
Gefrierschrank Flüssigstickstoff	Thermo Fisher Scientific
Heizblock	AKM Lab
IN Cell Analyzer 2000	GE Healthcare
Inkubationsschüttler	Innova
Invertiertes Stereomikroskop IX71	Olympus
Kühlschrank	Thermo Fisher Scientific
Kühlzentrifuge	Sigma-Aldrich
Luft-gepolsterter Tisch Cleanbench	Technical Manufacturing Corp.
Luminometer SpectraMax L	Molecular Devices
Magnetrührer	VWR
Mikrowellengerät	Thomas Scientific
Mini Trans-Blot Elektrophorese Transferzelle	Bio-Rad
Neubauer-Zählkammer	Celeromics
Piezo-Mikromanipulator mit Fußpedal, PMM-150FU	Prime Tech
Pipette Multikanal, L12 × 10, L12 × 200	Gilson
Pipetten Einzelkanal, P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson
Pneumatische Injektoren CellTram Air/Oil	Eppendorf

Schüttler	VWR
Spektralphotometer NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Stereomikroskop SZX10	Olympus
Stereomikroskop-Wärmeplatte MATS-5	Tokai Hit Co.
Table Top Anästhesiemaschine, V3000PK	Parkland Scientific
Tischzentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Vakuum-Zentrifuge	Eppendorf
Vortex-Genie	VWR
Wärmeplatte MATS-55R30	Tokai Hit Co.
Wasserbad	Cole-Parmer Instrument Company
Zellkultur Brutschrank, CO <sub>2</sub> 5% (v/v), 37°C	Sanyo

**Tabelle 2: Geräte**

## D 2.2 Software

Bezeichnung	Einsatzzweck	Hersteller
IN Cell Developer Suite	High Content Imaging Bildanalyse	GE Healthcare
Photoshop, Illustrator CS3, CS5	Grafikbearbeitung	Adobe
Office Suite 2010, 2013, 2016	Text- und Tabellenverarbeitung	Microsoft
SigmaPlot V12	Diagrammerstellung	Systat Software
Image Studio	Westernblot	LI-COR
SnapGene	Gensequenz-Bearbeitung	GSL Biotech
BD FACSDiva V6.1.3	Durchflusszytometrie	BD Biosciences
FlowJo V10.2	Durchflusszytometrie	FlowJo

**Tabelle 3: Software**

## D 2.3 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
10 mL Spritzen, 1 mL Spritzen, #400 012, # 400 027	Thermo Fisher Scientific
26G Spritzen Nadel	BD
Acryl-Küvetten	Sarstedt
Blotting Filterpapier, Dick	Bio-Rad
Falkonröhrchen	Thermo Fisher Scientific
Hamilton Spritze 5 mL # 81520	Hamilton
Kimwipe Wischtücher	Kimberly-Clark
Kryokonservierungsröhrchen	Thermo Fisher Scientific
96-Well-Mikrotiterplatte, schwarz, Greiner µClear	Greiner
96-Well-Mikrotiterplatte, transparent, Whatman Clear View	Sigma-Aldrich
Mundpipetten-Ansaugschlauch, A5177	Sigma-Aldrich
Mundpipetten-Mikrokapillaren 10cm × 1mm, P0549	Sigma-Aldrich
Petrischale 10cm × 2,1 cm	Corning
Petrischale 3,5cm × 1,2cm	Corning
Petrischale 6cm × 1,5cm	Corning
Piezo Drill Tip ES Pipettenspitze für Piezobohrer	Eppendorf
Pipettenspitzen ohne und mit Filter 0,1 µL – 1000 µL	Gilson
PVDF Membran Immobilon-FL	Millipore
Reaktionsgefäße 1,5 mL	Eppendorf
Safe Lock Gefäße 2 mL	Eppendorf
Serologische Pipetten	Corning
Sterifilter	Merck
UV-Küvetten	Merck
Vacutip, Spitze für Haltepipette	Eppendorf
Watchmaker Pinzette Dumostar #5, Nadelhalter, Mikroschere, Nadel & 8/0 Faden	Fine Science Tools
Wundverschluss: Autoclip-Applikator, 9mm Autoclips, Entfernungszange	Fine Science Tools
Zellkulturflaschen und -platten	Merck, Corning
Zentrifugenbecher	Thermo Fisher Scientific

**Tabelle 4: Verbrauchsmaterial**

## D 2.4 Chemikalien, Färbemittel, Reagenzien, Kits

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol (2ME), 50 mM (1000 ×)	Cell Culture Facility UCSF
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
Acrylamid	Sigma-Aldrich
Alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich
Ammonium-Persulfat	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Aqua destilata (A. dest.)	Sigma-Aldrich
Bacto-Trypton	BD Biosciences
Bio-Rad-Protein-Assay	Bio-Rad
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Deoxycholat	Sigma-Aldrich
DharmaFECT 1 Transfektionsreagenz	Dharmacon
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Cell Culture Facility UCSF
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Auftragspuffer (10 ×)	Thermo Fisher Scientific
DNA-Längenstandard 100 bp-Stufen	Invitrogen
DNA-Längenstandard 250 bp-Stufen	Invitrogen
DNA-Längenstandard 50 bp-Stufen	Invitrogen
Dual-Luciferase-Reporter-Assay Kit	Promega
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) # CCFAA005	Cell Culture Facility UCSF
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) # CCFAL001	Cell Culture Facility UCSF
Essigsäure	Sigma-Aldrich
Ethanol, 100%, 70%	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid ~95%	Thermo Fisher Scientific
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethylenglycolbistetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich
FBS (Fetal Bovine Serum)	Cell Culture Facility UCSF
FuGENE-6 Transfektionsreagenz	Promega
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich
Glycerol	Sigma-Aldrich
Glycin	Sigma-Aldrich
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) # CCFAJ001	Cell Culture Facility UCSF
HCl	Sigma-Aldrich
Hoechst-33342 Solution 20 mM (Hoechst)	Thermo Fisher Scientific
Isofluran	Kent Scientific
Kaliumferricyanid	Sigma-Aldrich
Kaliumferrocyanid	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Sigma-Aldrich
KCl Lösung	Sigma-Aldrich
Knockout Serum Replacement (KSR) # 10828028	Thermo Fisher Scientific
Knockout-DMEM (KO-DMEM) # 10829018	Thermo Fisher Scientific
KSOM-Medium, Lösung zur Embryonenkultur #MR-101-D	Merck
LB Agar # 22700-025	Thermo Fisher Scientific
LB-Medium # 10855-001	Thermo Fisher Scientific
L-Glutamine 200mM, 100 ×, 25ml (L-Glut) # CCFGB002	Cell Culture Facility UCSF
M2-Medium, Lösung zur Embryonenkultur, # MR-051-F	Merck
Meloxicam, 5 mg/mL	Merck
Methanol	Sigma-Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Mineralöl # 23304-04	Nacalai Tesque
N,N'-Methylen-Bisacrylamid (MBA)	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
NaOH	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich

Natriumphosphat	Sigma-Aldrich
Non-Essential Amino Acids 100 × (NEAA) # CCFGA001	Cell Culture Facility UCSF
Nonylphenoxypolyethoxyethanol (NP-40)	Dow Chemicals
Octoxinol 9 (Triton-X 100)	Sigma-Aldrich
Octylphenoxypolyethoxyethanol (Nonidet P-40)	Sigma-Aldrich
Odyssey Blocking Buffer in PBS	LI-COR
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep), 5 mL (100 ×) # CCFGK001	Cell Culture Facility UCSF
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Roche
Polybrene #107689	Sigma-Aldrich
Polysorbat 20 (Tween 20)	Sigma-Aldrich
Polyvinylpyrrolidone (PVP) 12% (w/v) in A. dest.	Merck
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche
Proteingrößenstandard Chameleon Duo 8 – 260 kDa	LI-COR
PureYield Plasmid Maxiprep System #9FB083	Promega
PureYield Plasmid Midiprep System #9FB077	Promega
PureYield Plasmid Miniprep System #9FB093	Promega
Puromycin	Sigma-Aldrich
Quecksilber 2 mol/L	Merck
RNaseZap RNA Dekontaminationslösung #AM9780	Thermo Fisher Scientific
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tris Base	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Trypanblau 0,4%	Merck
Trypsin/EDTA 0,05% # CCFGP001	Cell Culture Facility UCSF
X-Gal Stocklösung	Merck
X-Galactose (X-Gal)	Sigma-Aldrich

**Tabelle 5: Chemikalien, Färbemittel, Reagenzien, Kits**

## D 2.5 Puffer, Medien

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
10 × TAE-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, mit Eisessig auf pH 8,3 eingestellt
20X Tris-Glycin Transfer Puffer	24,2 g Tris Base, 150,1 g Glycin, 1 mL A. dest
4% PFA-PBS für die Immunofixation	800 mL PBS, 40 g PFA, 1 M NaOH tropfenweise bis PFA gelöst, Auffüllen bis 1 L mit PBS. pH Einstellung mit HCl auf 6,9
Blockierungspuffer für die Immunofixation	PBS, 0,1% Triton X-100, 1% Ziegen-Serum, 2% BSA
ES-Medium	50 µM 2ME, 1 × Pen/Strep, 1 × NEAA, 1 × L-Glut, Lif und Alternativ: + 15% FBS (Standard) + 1% FBS (Starvation)
Fixierungslösung Embryo	4 mL 25% Glutaraldehyd, 2,5 mL 100 mM EGTA, pH 7,3, 0,4 mL 1 M MgCl <sub>2</sub> , 173,1 mL A. dest. 20 mL 10 × PBS.
Gesamtproteinen-Extraktionspuffer für die Proteinanalytik	25 mM Tris-HCl, pH 7,9, 150 mM NaCl, 0,1% Nonidet P-40, 0,1 mM EDTA, 10% Glycerol, 1mM DTT
KO-Medium	KO-DMEM mit 50 µM 2ME, 1 × Pen/Strep, 1 × NEAA, 1 × L-Glut, Lif + 15% KSR
Laufpuffer für SDS-PAGE	Tris 3 g Glycin 14,4 g SDS 1 g Auffüllen auf 1L mit A. dest.
MEF-Medium	DMEM mit 50 µM 2ME, 1 × Pen/Strep, 1 × NEAA, 1 × L-Glut und Alternativ: + 10% FBS (Standard) + 1% FBS (Starvation)

Probenpuffer für SDS-PAGE	10% (w/v) SDS 40 µL 5 mL Sammelpuffer 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 1,75 mL Glycerol (87%) 1,5 mL Bromphenolblau 1% 1,25 mL Tropfen 2ME 0,5 mL
Sammegel 5,7% für SDS-PAGE	30% (w/v) Acrylamide 0,76 mL 1% (w/v) MBA 0,52 mL Sammelpuffer 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 1 mL A. dest. 1,71 mL 10% (w/v) SDS 40 µL 10% (w/v) Ammonium-Persulfat 27 µL TEMED 2,7 µL
Trenngel 14% für SDS-PAGE	30% (w/v) Acrylamid 3,73 mL 1% (w/v) MBA 1,15 mL Trenngelpuffer 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 2 mL A. dest. 1,04 mL 10% (w/v) SDS 80 µL 10% (w/v) Ammonium-Persulfat 53 µL TEMED 5,3 µL
Waschpuffer Embryo	0,4 mL 1 M MgCl <sub>2</sub> , 2,0 mL 1% Deoxycholat, 2,0 mL 2% NP-40, 195,6 mL 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,3.
X-Gal Färbelösung	2,0 mL 25 mg/ml X-Gal Stock, 0,106 g Kaliumferricyanid, 0,082g Kaliumferrocyanid, 48,0 mL Waschpuffer Embryo (s.o.)

**Tabelle 6: Puffer, Substanzen, Nährmedien**

## D 2.6 Antikörper, Liganden

Antikörpername und Verdünnung	Herkunft	Hersteller
Primärantikörper Westernblot		
GAPDH 1:5000	Kaninchen	Santa Cruz, sc-25778
Phospho-Akt (Ser473) 1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #4060
Phospho-Akt (Thr308) 1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #2965
Gesamt-Akt (pan) 1:1000	Maus	Cell Signaling, #2920
PTEN 1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #9552
Primärantikörper Immunfluoreszenz		
Nanog 1:50	Kaninchen	Abcam #ab21603
SSEA1 1:100	Maus	Univ. of Iowa #MC-480
β-Catenin 1:100	Kaninchen	Cell Signaling #9587
Sekundärantikörper Westernblot		
IRDye 680RD anti-Kaninchen 1:25 000	Ziege	LI-COR
IRDye 800CW anti-Maus 1:25 000	Ziege	LI-COR
IRDye 680RD anti-Kaninchen 1:25 000	Ziege	LI-COR
IRDye 800CW anti-Maus 1:25 000	Ziege	LI-COR
Sekundärantikörper Immunfluoreszenz		
Alexa Fluor 488 anti-Maus 1:1000	Ziege	Abcam # ab150113
Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen 1:1000	Ziege	Abcam #ab150077
Alexa Fluor 568 anti-Maus 1:1000	Ziege	Abcam #ab175473
Alexa Fluor 568 anti-Kaninchen 1:1000	Ziege	Abcam #ab175471
Liganden		
IGF-1, rekombinant, 2ng/mL	Maus	Thermo Fisher Scientific
Wnt3a, rekombinant, 40 µg/mL	Maus	R&D Systems
Leukemia inhibiting factor (Lif), rekombinant, 1 ng/mL	Maus	Thermo Fisher Scientific

**Tabelle 7: Antikörper, Liganden**

## D 2.7 miRNAs und Plasmide

Plasmidname	Kurzform	Hersteller
Luciferase-Reportersystem		
M50 Super 8x TOPFlash	TOPFlash	Addgene Plasmid #12456
M51 Super 8x FOPFlash	FOPFlash	Addgene Plasmid #12457
pRL-TK-Renilla	TK-Renilla	Promega Pasmid #E2241
Retrovirusherstellung		
pCL-Eco		Addgene Plasmid # 12371
pMXs-Oct4		Addgene Plasmid # 13366
pMXs-Sox2		Addgene Plasmid # 13367
pMXs-Klf4		Addgene Plasmid # 13370
Lentivirusherstellung		
pMDL		Addgene Plasmid # 12251
pRSV		Addgene Plasmid # 12253
pVSVG		Addgene Plasmid # 12259
pSin-EF2-Oct4-IRES-Pur		Addgene Plasmid # 16579
pSin-EF2-GFP-302-Sponge-Pur		In unserer Arbeitsgruppe kloniert
Mimics		
miR-294 Mimic	miR-294	Dharmacon
miR-302b Mimic	miR-302b	Dharmacon
Mutierte miR-302b Mimic	miR-302bMut	Dharmacon
miR-181a-d Mimic	miR-181a-d	Dharmacon
Negativkontroll Mimic	miR-Con	Dharmacon
Negativkontroll siRNA	siR-Con	Dharmacon, On-TargetPlus, siGenome

**Tabelle 8: Plasmide und miRNA**

## D 2.8 Organismen

Name des Organismus	Herkunft
Bakterienstämme	
Stbl2/Stbl3 E.coli	Thermo Fisher
DH5a E.coli	Thermo Fisher
E. coli TOP10 F'	Invitrogen, USA
Eukaryote Zelllinien	
MEF (murin)	Dr. Rudolf Jaenisch, Whitehead Institute (MIT)
mESC V6.5 (murin)	Dr. Rudolf Jaenisch, Whitehead Institute (MIT) von
3T3-Fibroblasten (murin)	ATCC
HEK293 (human)	Sigma-Aldrich
Mauslinien	
<i>Oct4-GFP</i>	Dr. Rudolf Jaenisch, Whitehead Institute (MIT)
<i>Rosa26<sup>+/βgal</sup>, Oct4-GFP</i>	Dr. Rudolf Jaenisch, Whitehead Institute (MIT)
C57BL/6 Weibchen, E2,5 super-ovuliert und befruchtet	Taconic
Swiss-Webster Weibchen, E2,5 pseudoschwanger	Taconic

**Tabelle 9: Verwendete Organismen**

## D 3 Methoden

### D 3.1 Zellkultur

#### D 3.1.1 Arbeitsbedingungen

Sämtliche Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Flow bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% relativer Luftfeuchtigkeit.

#### D 3.1.2 Zellzählung

Vor dem Ausplattieren der Zellen in Kulturgefäße, etwa nach dem Auftauen oder Splitten, mussten diese gezählt werden. Dies erfolgte unter Einsatz einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 5 µL der Zellsuspension mit 5 µL Trypanblau-Lösung versetzt und in die Zählkammer pipettiert. Da vitale Zellen keinen Farbstoff aufnehmen, wurden ausschließlich die nicht blau gefärbten Zellen in 4 Feldern der Zählkammer ausgezählt und über die folgende Formel in Zellzahl pro Milliliter umgerechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{\text{Summe aller Zellen der 4 Großfelder}}{4} \times 20\,000$$

#### D 3.1.3 Kultur von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen sind immortalisierte humane embryonale Nierenzellen. Sie zeichnen sich durch robustes Wachstum unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen sowie eine hohe Teilungsrate aus und wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Produktion von Lenti- und Retroviren eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in MEF-Medium ohne Gelatine-Beschichtung. Bei der Transfektion der Packaging-Plasmide für die Virusherstellung wurde streng auf eine Konfluenz von 50 – 80% geachtet. Eine hohe Passageanzahl wurde vermieden (verminderte Virusproduktion).

#### D 3.1.4 Kultur von 3T3-Fibroblasten

Immortalisierte 3T3-Fibroblasten sind kontakt-inhibierte Zellen, welche ursprünglich von einer Embryonenkultur von NIH Swiss Mäusen abgeleitet wurde. Sie wurden in dieser Arbeit verwendet, um sie stabil mit einem Reporterkonstrukt für exogen eingeschleuste miRNA zu verwenden. Bei der Transduktion der 3T3-Fibroblasten wurde auf Subkonfluenz geachtet, da in dieser Phase die Infektiosität der Virionen und die Rekombinationsrate der eingeschleusten DNA erhöht war. Vom Auftauen bis zur Transduktion waren im Normalfall 7 Tage

mit 3 Splittings vorgesehen. Die Kultivierung erfolgte in MEF-Medium unter täglichem Wechsel des Mediums.

### D 3.1.5 MEF-Kultur

MEFs dienen als Ausgangszellen für die Reprogrammierung und nach Bestrahlung auch als Fütterzellen für iPSC- oder ESC-Kolonien. Sie wurden in MEF-Medium mit 10% FBS kultiviert. Zellkulturgefäße wurden vorher mit 0,1% Gelatine beschichtet (Inkubation 30 min, 37°C vor Ausplattierung).

#### D 3.1.5.1 MEF-Gewinnung

Für Reprogrammierungsversuche wurden doppelt transgene *Rosa26<sup>+βgal</sup>, Oct4-GFP*-Mäuse oder einfach transgene *Oct4-GFP*-Mäuse verwendet. Diese wurden am Tag E13,5 aus dem Uterus isoliert. Hierfür wurde die trächtige und durch zervikale Dislokation getötete Maus zunächst in HBSS und 70% Ethanol getränkt und mit einer sterilen Schere und Pinzette abdominal eröffnet, der Uterus dargestellt und dieser in eine 6-cm-Petrischale in PBS übertragen. Aus dem Uterus wurden die Embryonen herauspräpariert und in eine neue Petrischale mit HBSS gegeben. *Rosa26<sup>+βgal</sup>*-transgene Embryos wurden mit einer X-Gal Färbung identifiziert. Zur Feststellung der Oct4-GFP Ausprägung erfolgte die Begutachtung des Embryos unter einem Fluoreszenzmikroskop. Aufgrund der natürlichen GFP-Expression in den Gonaden konnten auf diese Art transgene Embryos identifiziert werden. Weiterhin konnten über das Fluoreszenzverhalten und die Inspektion der Gonaden weibliche von männlichen Embryos unterschieden werden. Männliche Embryos wurden weiterverwendet, weibliche verworfen. Unter dem Stereomikroskop wurden Kopf, Gonaden und Eingeweide herausgelöst und verworfen. Extremitäten und Körperhöhle wurden in HBSS gewaschen und mit 0,25% Trypsin / 1mM EDTA HBSS in einer 10 mL Spritze aufgezogen und durch eine 18G Nadel in eine neue Petrischale gegeben. Die partiell dissoziierten Embryos wurden erneut mehrfach auf- und abpipettiert und dann für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Gewebe in einem 10 mL Falcon zentrifugiert (5 min, 1 × g). Nach dem Verwerfen des Sediments erfolgte ein zweiter Waschschrift in MEF-Medium. Nach Zentrifugation erfolgte dann die Ausplattierung in einer T175-Zellkulturflasche (1 Flasche pro Embryo). Im Zellinkubator wurde diese Zellkulturflasche für 3 – 4 Tage kultiviert; das Medium wurde dabei alle 2 Tage durch frisches MEF-Medium ersetzt. Die so erhaltenen MEFs waren per definitionem Passage 0. Sie konnten entweder direkt oder bis Passage 3 kryokonserviert werden. Die Kryokonservierung mit  $6 \times 10^6$  Zellen pro Vial wurde wie unter **D3.1.7** beschrieben durchgeführt.

### **D 3.1.5.2 Herstellung inaktivierter MEF-Fütterzellen**

Die Zellteilung von MEFs wird u.a. durch radioaktive Bestrahlung inaktiviert. Die so erhaltenen irMEFs wurden für ESCs und iPSCs als Fütterzellen verwendet. Sie dienten zur Verbesserung der Adhärenz und sorgten für das nötige Mikromilieu. Hierfür wurden die MEFs aus E13,5 Embryos isoliert (s.o.) und vor der ersten Ausplattierung in einem 50 mL Falcon gesammelt und mit 80 Gy bestrahlt. Hiernach erfolgte die Kryokonservierung ( $5 \times 10^6$  Zellen pro Vial). Für eine PSC-Kultur wurden 2 Tage vorher irMEFs aufgetaut und mit einer Dichte von  $0,5 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausplattiert.

### **D 3.1.6 PSC-Kultur**

Erfolgreich reprogrammierte iPSC- und ESC-Linien wurden in Knockout-Medium mit 15% Knockout Serum Replacement (15%-KSR-KO-Medium) auf irMEFs oder nach dem Entwöhnen von Fütterzellen auf 0,1% Gelatine kultiviert. Hohe Konfluenzen induzieren eine Differenzierung und wurden vermieden. Ein Medien-Wechsel erfolgt mindestens alle 2 Tage. iPSCs haben eine Verdopplungsrate von circa 30 h und sollten in unserem Fall aufgrund ihrer Abstammung aus *Oct4-GFP*-MEFs stets GFP-positiv sein. Kolonien hatten eine leicht dreidimensionale Form und keine Ausläufer.

Beim Splitten von ESCs oder iPSCs wurde das neue Zellkulturgefäß vorher mit 0,1% Gelatine beschichtet (5 min Inkubation bei RT): Nach einem Waschschrift in HBSS mit 500  $\mu\text{M}$  EDTA erfolgte eine Trypsinierung (0,05% Trypsin, 5 min, 37°C) welche nachfolgend mit 10%-FBS-ES-Medium gestoppt wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt in einem 15 mL Falcon (5 min, 500  $\times$  g, RT) wurde der Überstand abpipettiert und die Zellen in frischem ES-Medium gelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer erfolgte eine Verdünnung (1:10 Splitting) und die Ausplattierung in 15%-KSR-KO-Medium.

#### **D 3.1.6.1 Entwöhnung von irMEFs**

Um PSCs von den interferierenden Fütterzellen zu entwöhnen wurde die Kultur zunächst trypsiniert (0,05% Trypsin, 5 min, 37°C) und in 10 mL Medium in einer 10-cm-Petrischale mit Gelatinebeschichtung (0,1% Gelatine, Inkubation 30 min, 37°C) resuspendiert. Während 30 min wurde alle 5 – 10 min überprüft, wie viele Zellen sich bereits am Untergrund festgesetzt hatten. irMEFs waren 3 – 4-fach größer als PSCs und adhärten zuerst. Auf diese Weise ließen sich die aus dem Überstand abpipettieren und isolieren. Da bei diesem Prozess einige PSCs apoptotisch wurden, wurde hier ein geringeres Splitting-Verhältnis gewählt (1,5:1 oder 2:1 anstatt 3:1 oder 4:1). Dieser Vorgang wurde nach einer weiteren Passage wiederholt, um restliche Fütterzellen zu entfernen. Nach zwei Passagen erhielt man auf diese Art eine nahezu Fütterzell-freie PSC-Kultur.

### **D 3.1.7 Kryokonservierung**

Zur Kryokonservierung von Zellen wurde zunächst ein Medium bestehend aus 20% DMSO, 20% FBS und 60% DMEM vorbereitet und über einen Filter mit 0,45 µm Porengröße sterilfiltriert. Die einzufrierenden Zellen (500 000 – 800 000 Zellen/mL) wurden nach Trypsinierung und Zentrifugation in 0,5 mL MEF-Medium resuspendiert und mit 0,5 mL des Kryokonservierungsmediums vermischt. Die Vials wurden in einen Styropor-Behälter überführt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Am Folgetag wurden sie in den Flüssigstickstofftank bei -196°C übertragen.

Zum Auftauen wurden die Vials mit den kryokonservierten Zellen aus dem Stickstofftank genommen, kurz unter der Laminar-Flow geöffnet, um Stickstoffreste entweichen zu lassen und 2 min im Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. Die Zellsuspension wurde in einem 15 mL-Falkonröhrchen mit 5 mL Kulturmedium verdünnt und durch Zentrifugation (5 min; 600 × g; 20°C) von DMSO-Resten befreit. Zur Kultivierung erfolgten die Resuspension und Aussaat unter o. g. Bedingungen.

### **D 3.2 Mikroskopie und *High Content Imaging***

In dieser Arbeit wird neben der klassischen Hellfeldmikroskopie auch die Dunkelfeldmikroskopie verwendet. Hierbei werden nur die Streustrahlen, welche ein Objekt erzeugt, im Objektiv übertragen und führen zu einer Bildwahrnehmung mit einem dunklen Hintergrund.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden hingegen Fluorochrome verwendet, welche bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge in einen angeregten Zustand überführt werden und nachfolgend Photonen einer anderen Wellenlänge emittieren.

Der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis bestimmter Antigene in einer Schicht kultivierter Zellen wird Immunzytochemie genannt.

In dieser Arbeit wurden Zellen untersucht, welche das grün fluoreszierende Protein GFP als Transgen exprimieren. Dieses Protein hat ein Exzitationsmaximum bei 395nm und Emissionsmaximum bei 509nm. Es reichert sich im Zellplasma an. Zur Messung der Fluoreszenzintensität wurde als Sperrfilter der sog. GFP Filter verwendet (Emissionsmaximum bei 514nm).

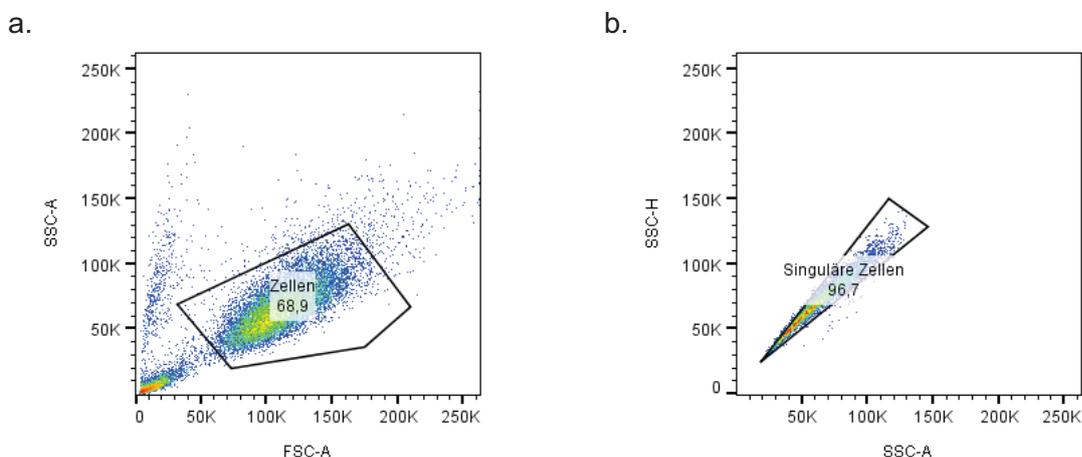
Zur nukleären Gegenfärbung kam in dieser Arbeit der Farbstoff Hoechst zum Einsatz. Dieser wird im letzten Schritt vor der Auswertung dem Medium in einer Verdünnung von 1:10 000 zugegeben. Der Farbstoff diffundiert durch die Zellmembran und bindet an doppelsträngige DNA. Das Exzitationsmaximum liegt bei 361 nm, das Emissionsmaximum bei Bindung an dsDNA bei 461 nm. Hoechst weist dieselben Absorptions- und Emissionsmaxima wie DAPI auf, sodass der DAPI-Kanal auch für die Hoechst-Färbung benutzt werden konnte.

Für die manuelle Mikroskopie wurden die Zellen unter einem Gerät der Firma Olympus analysiert. Dieses ist ein klassisches Aufricht-Fluoreszenzmikroskop, bei dem das Anregungslicht über das Objektiv in das Präparat einstrahlt. Vorher wurde durch einen Anregungsfilter die benötigte Wellenlänge eingestellt. Die automatisierte, mikroskopische Analyse im Hochdurchsatz, das sog. *High Content Imaging* (HCI) wurde mit dem IN Cell Analyzer 2000 durchgeführt. Dies ist ein automatisiertes Mikroskop, mit dem größere Datenmengen beispielsweise auf Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten (96-Well-Platten) eingelesen werden können. Diese große Anzahl an Einzelbildern wird dann über die zugehörige Software nach benutzerdefinierten Parametern ausgewertet.

### D 3.3 Durchflusszytometrie

#### Prinzip

Bei dieser Technik werden die Eigenschaften von Zellen in Suspension auf physikalische und immunologische Weise qualitativ und quantitativ erfasst. Dabei werden Zellen aus einer Messküvette angesogen. Es werden das Vorwärtsstreulicht (Lichtbeugung, Forward Scatter, FSC), als Maß für das Zellvolumen und das Seitwärtsstreulicht (Lichtbrechung, Side Scatter, SSC), als Maß für die Granularität und Vesikelmenge in der Zelle sowie Größe und Struktur des Zellkernes bestimmt. Zudem kommen Fluorochrome zum Einsatz, mit denen die Zellen gefärbt werden oder die durch die Zellen selbst produziert werden. Diese werden durch dichroitische (teildurchlässige) Spiegel, Anregungslaser und Absorptionsfilter analysiert. In dieser Arbeit wird im GFP-Kanal die Eigenfluoreszenz des Transgens GFP analysiert. Eine Antikörperinkubation kommt nicht zum Einsatz. Die Maßeinheit der gemessenen Lichtintensität, ob nun durch Forward Scatter, Side Scatter oder GFP-Fluoreszenz wird innerhalb des Zytometers normiert und in a.u. (arbitrary units) angegeben. Auf die Angabe dieser Einheit wird im Folgenden verzichtet.



**Abb. 8: Gating von Zellen in der Durchflusszytometrie**

a. Auswahl lebendiger Zellen mit linearen FSC und SSC-Eigenschaften. b. Auswahl singulärer Zellen über eine Gerade mit Steigung  $x=1$  zwischen der Fläche (SSC-A) und Höhe (SSC-H) des SSC-Signals (Details siehe Text).

## Durchführung

Nach der Trypsinierung von in 6-Well-Platten kultivierten Fibroblasten wurde die Reaktion mit 10%-FBS-MEF-Medium gestoppt und die Zellen kurz abzentrifugiert. Danach erfolgt die Resuspension in 2mL DMEM ohne Zusätze und die Zählung in der Neubauer-Zählkammer mit nachfolgender Verdünnung der Zellen auf  $10^5$  Zellen/mL.

Diese Suspension wurde jeweils in eine Messküvette pipettiert. Die Messküvetten wurden auf Eis gelagert.

Nach Messung von ca. 20 000 Events, also einzelnen aufgezeichneten Signalen, erfolgte zunächst das sog. Gating, bei dem über die o.g. Lichtbrechungs- und Lichtbeugungswerte lebende Zellen selektiert werden und im zweiten Schritt singuläre Zellen von Zellklumpen getrennt werden (**Abb. 8**).

Wie oben beschrieben erfolgt für jede Probe das Gating, um lebende Zellen von Debris und Zellklumpen zu unterscheiden. Danach wurde die Anzahl singulärer lebender Zellen, die Anzahl GFP-positiver Zellen, die GFP-Intensität pro Zelle und die mediane GFP-Intensität und dessen Standardabweichung bestimmt.

## D 3.4 Plasmidpräparation

### Bakterienkultur und Transformation

Die folgenden Schritte waren notwendig, um Plasmide für weitere Transfektionsschritte zu vervielfältigen. Hier wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* (E. coli) verwendet. Die Anzucht erfolgte auf Agarplatten oder in einer Flüssigkultur. Die Einschleusung von Fremd-DNA in ein Bakterium wird dabei als Transformation bezeichnet. Die zu vermehrenden Plasmide kodieren u.a. üblicherweise für eine Ampicillin/Kanamycin Resistenz, die für erfolgreich transformierte E. coli Bakterien eine Selektion erlaubt. Damit Bakterien effektiv Fremd-DNA aufnehmen, müssen sie kompetent gemacht werden. Die uns verfügbaren Bakterienstämme wurden bereits kompetent erworben.

Nährmedien wurden für 20 min bei  $121^\circ\text{C}$  bei einem Druck von  $1,2 \times 10^5$  Pa autoklaviert. Hitzeinstabile Lösungen wurden durch Filtration ( $0,2 \mu\text{m}$  Porengröße) sterilisiert und den auf  $< 50^\circ\text{C}$  abgekühlten Nährmedien nach dem Autoklavieren zugesetzt. Zur Herstellung fester Nährmedien (Agarplatten) wurde den Medien vor dem Autoklavieren 15 g/l Bacto-Agar zugesetzt. Die beiden Antibiotika Ampicillin (200 mg/mL in 70% Ethanol) und Kanamycin (50 mg/mL in A. dest.) wurden als Stammlösungen aliquotiert bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Zugabe zu den Nährmedien erfolgte bei einer Temperatur  $< 50^\circ\text{C}$ . Hierbei betrug die Endkonzentration des Ampicillins  $200 \mu\text{g/mL}$ , die des Kanamycins  $50 \mu\text{g/mL}$ .

Eine Konservierung einer Bakterienkultur für länger als 4 Wochen erfolgte über eine Glycerinstammkultur bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Hierfür wurde eine Flüssigkultur mit Glycerin versetzt (in der Regel  $850\ \mu\text{L}$  Bakterienkultur und  $150\ \mu\text{L}$  Glycerin,  $c = 15\% \text{ v/v}$ ).

Für die Präparation der Plasmide aus den Bakterien wurden zuerst Ampicillin/Kanamycin-Agarplatten auf  $37^{\circ}$  erwärmt. Zur Transformation wurde dann 1 Vial ( $100\ \mu\text{L}$ ) kompetenter Bakterien von  $-80^{\circ}\text{C}$  auf Eis aufgetaut. Davon wurden  $20\ \mu\text{L}$  in ein neues Vial pipettiert und mit  $0,5$  bis  $1\ \mu\text{L}$  der Plasmidpräparation vermengt (gewünschte Konzentration ca.  $200\ \text{ng/mL}$ ). Nach vorsichtigem Rühren erfolgte die Inkubation dieses Ansatzes auf Eis für  $30\ \text{min}$ . Nach einem Hitzeschock von  $45\ \text{s}$  bei  $42^{\circ}\text{C}$  wurden  $100\ \mu\text{L}$  LB-Medium ohne Ampicillin/Kanamycin pro  $10\ \mu\text{L}$  Bakteriensuspension zugesetzt und  $1\ \text{h}$  bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf dem Schüttelinkubator inkubiert ( $250\ \text{U/min}$ ). Danach erfolgte die gleichmäßige Ausplattierung von  $50 - 100\ \mu\text{L}$  des Ansatzes mit Glaskugeln auf Agarplatten mit anschließender Anzucht (über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$ ). Am Folgetag wurde eine einzelne Kolonie mit einer zuvor abgeflammeten Impföse aufgenommen und hiermit  $3\ \text{mL}$  LB-Medium (mit Ampicillin/Kanamycin) angeimpft. Diese Kultur wurde für  $8\ \text{h}$  bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert ( $250\ \text{U/min}$ ). Gleichzeitig wurde die ausgewählte Kolonie auch auf eine neue Agarplatte übertragen, um bei korrektem Enzymverdau eine Maxi-Präparation vereinfacht ansetzen zu können.

### **Minipräparation**

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Transformation erfolgte eine Verifizierung des Plasmids nach dem Prinzip der analytischen Minipräparation. Diese beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse [102]. Es wurden mehrere Kolonien ausgewählt und jeweils eine  $3\ \text{mL}$  Flüssigkultur angesetzt, woraus sich etwa  $5 - 10\ \mu\text{g}$  DNA isolieren ließ.

Die Durchführung der Minipräparation erfolgte streng nach Herstellerangaben. Zum Ende des Protokolls wurde die DNA in einem  $1,5\ \text{mL}$  Vial in Nuclease-freiem Wasser aufgelöst. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde mithilfe des NanoDrop-Photometers bestimmt. Ein Absorptionswert von  $1$  gemessen bei einer Wellenlänge von  $260\ \text{nm}$ , dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren ( $A_{260\text{nm}}$ ), entspricht bei einer Schichtdicke der Küvette von  $1\ \text{cm}$  einer Konzentration von  $50\ \mu\text{g/mL}$  doppelsträngiger (ds)DNA,  $40\ \mu\text{g/mL}$  RNA oder  $37\ \mu\text{g/mL}$  einzelsträngiger (ss)DNA. Es wurde darauf geachtet, dass die Nukleinsäurelösungen möglichst wenig Protein ( $A_{280\text{nm}}$ ) enthielten, was bei einem Verhältnis  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  von  $1,7 - 2,0$  bei DNA bzw. von  $1,8 - 2,2$  bei RNA gegeben war. Die so erhaltene Plasmid-Lösung wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  kryokonserviert.

### **DNA-Verdau und Gelelektrophorese**

Zur Verifizierung korrekt vorliegender Plasmide wurden diese mit bekannten Restriktionsenzymen verdaut. Restriktionsenzyme erkennen  $6$  bis  $12\ \text{bp}$  lange palindromische dsDNA

Sequenzen und spalten an dieser Stelle Phosphodiesterbrücken. Eine Einheit eines Restriktionsenzym ist dabei definiert als die Menge, welche 1 µg DNA des Phagen Lambda in 1 h bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 50 µL verdaut. Restriktionsenzyme wurden gemäß Herstellerangaben verwendet. Für analytische Zwecke erfolgte stets ein 1 – 2 stündiger Verdau von 1 µg DNA.

Die Analyse der DNA-Fragmente erfolgte durch Auftrennung nach der Größe in einem Agarosegel mittels Elektrophorese. Die Agarosekonzentration in den Gelen lag indirekt proportional zur Fragmentgröße zwischen 0,5 und 3%. Die Agarose wurde in 1 × TAE-Puffer suspendiert, durch Kochen solubilisiert und zur Gelierung in einen Gelschlitten gegossen, in dem ein Kamm für die Auftragstaschen gesteckt war. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren im UV-Licht wurde der Agarose-Lösung 1 µg/mL Ethidiumbromid beigegeben. Die benutzen Gelvolumina betragen je nach Probenvolumen und Probenzahl 60, 80 oder 120 mL. Nach Erstarren wurde das Gel in eine Horizontalgelapparatur gestellt und mit 1 × TAE-Puffer bedeckt. Vor Auftrag wurden die Proben mit 1/10 Volumen 10 × Auftragspuffer versetzt. Dabei wurden 90% des angesetzten Verdauens (18 µL) in eine Kavität und 10% (2 µL) in eine andere Kavität pipettiert, um hochmolekulare von niedermolekularen Banden besser unterscheiden zu können. Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleotide erfolgt bei einer Feldstärke von 5 bis 7 V/cm über eine Dauer von 1 – 3 h. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (302 nm) betrachtet und photographisch bzw. digital dokumentiert.

### **Midi- und Maxipräparation**

Zur Aufreinigung größerer DNA-Mengen wurden wahlweise Midi- oder Maxipräparationen unter Verwendung der PureYield Plasmid Midiprep/Maxiprep Systeme gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

Das Prinzip beruht darauf, dass genomische DNA sowie Zellwandbestandteile durch einen Zentrifugationsschritt sedimentiert und die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA an eine Anionen-Austausch-Säule gebunden wird. Die Zugabe eines Puffers, welcher Isopropanol und Polyethylen-Glykol-Oktylphenyl-Ether enthält, verhindert, dass im Lysat vorhandene Endotoxine an den Anionen-Austauscher in der Säule binden können. Durch Waschen werden Verunreinigungen wie RNA, Proteine und andere niedermolekulare Moleküle entfernt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgt unter Hochsalzbedingungen mit anschließender Präzipitation durch Isopropanol. Das in der gefällten DNA enthaltene Salz wird durch Waschen mit 70%igem Ethanol entfernt. Für die Midipräparation werden 50 mL LB-Medium angeimpft, für eine Maxipräparation ca. 250 mL LB-Medium. Die Menge an erhaltener DNA wird im Nano-Drop-Photometer quantifiziert.

## **D 3.5 Protein- und Enzym-Analytik**

### **D 3.5.1 Proteinquantifizierung mittels Westernblot**

#### **Herstellung von Zelllysaten und Proteinquantifizierung**

Das zelluläre Gesamtprotein wurde nach entsprechender Anzucht und Behandlung der Zellen in einer 6-Well-Platte durch Lyse mit dem Gesamtprotein-Extraktionspuffer (100 µL pro Kavität) gewonnen. Diesem war Protease-Inhibitor-Cocktail und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail gemäß Herstellerangaben zugesetzt. Das Lysat wurde bei 4°C für 10 min auf einem Schwenker geschüttelt, verbliebene Zellen vom Boden abgeschabt und die Suspension vollständig abpipettiert. Nach drei Schockgefrier-Auftau Zyklen wurde das Lysat abzentrifugiert (4°C, 20 min, 16 000 U/min) und der Überstand zur Quantifizierung des enthaltenen Proteins auf Eis gelagert.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in den so gewonnenen Zelllysaten wurde eine kleine Lysatmenge mit dem Bio-Rad-Protein-Assay nach Herstellerangaben untersucht. Dieser Assay arbeitet nach dem Prinzip des Bradford-Testes, einer photometrischen Methode, bei der Coomassie-Brillant-Blau G-250 in saurer Lösung mit unpolaren und kationischen Proteinseitenketten Komplexe bildet [103]. Die so entstehende, stabile anionische Form des Farbstoffes lässt sich durch Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm auf 595 nm nachweisen. Durch Erstellen einer Eichkurve, die durch verschiedene Verdünnung einer mitgelieferten Albuminstandardlösung erstellt wurde, konnte in den entsprechend verdünnten Proben nach Zugabe des Färbereagens und Messung bei 595 nm die in der Probe enthaltene Proteinkonzentration in einem ELISA-Mikroplattenlesegerät bestimmt werden.

#### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot**

Durch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und den nachfolgenden Westernblot können Proteine unter Einsatz spezifischer Antikörper qualitativ und quantitativ analysiert werden.

Bei der SDS-PAGE werden Proteine nach Beladung mit SDS im elektrischen Feld in einem Polyacrylamidgel mit definierter Porengröße entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt [104]. SDS ist ein anionisches Tensid. Es bindet an Proteine, überdeckt deren Eigenladung durch einen Überschuss an negativen Ladungen und führt so auch zur Streckung der Proteine, sodass diese beim Anlegen einer Spannung zum Plus-Pol wandern.

Für die Elektrophorese wurden 5 µg Protein pro Kavität aufgetragen. Die Bestimmung der Molekülmassen wurde über das Mitaufragen von Markerbanden (8 – 250 kDa) erreicht. Das Polyacrylamidgel wurde dabei in zwei Phasen gegossen. Im Sammelgel wird das Proteinlysate in Auftragstaschen pipettiert. Zum Probenauftrag wurden 10 µL Probenpuffer mit 10 µL

Probe vermischt und auf 95°C erhitzt (5 min). Nach Befüllen der Auftragstaschen mit den Proben wurde eine konstante Spannung von 200 V angelegt. Das Ende der Elektrophorese war erreicht, sobald die blaue Lauffront (Bromphenolblau aus Probenpuffer) kurz vor dem Ende des Gels angekommen war. Danach erfolgte der Elektrotransfer der zuvor aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF Membran. Die geschah nach Herstellerangaben für 1h bei einer konstanten Spannung von 100 V. Nachfolgend wurde die Membran für 1h getrocknet, kurz mit Methanol und A. dest. gespült und in 1 × PBS gelegt. Zur Absättigung potenzieller unspezifischer Bindungsstellen auf den Membranen erfolgte eine Inkubation in Blockierlösung (10 mL Odyssey Blocking Buffer) für 1 h bei RT. Diese Blockierlösung enthält Proteine von Nicht-Säugetieren, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Die für den Westernblot verwendeten Primärantikörper wurden in 10 mL Odyssey Blocking Buffer mit 0,2% Tween 20 gelöst, zur Membran gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran mit 1 × PBS-T (0,1% Tween 20) 3-mal bei RT für 5 min gewaschen und anschließend mit 10 mL Odyssey Blocking Buffer mit 0,2% Tween 20, 0,01% SDS und Spezies-spezifischen Nah-Infrarot-Fluorochrom-markierten Sekundärantikörpern unter Lichtschutz für 60 min bei RT inkubiert. Nach weiteren drei Waschgängen mit PBS-T (0,1% Tween 20) wurde die Membran schließlich feucht mit einem digitalen Flachbett-Fluoreszenzscanner eingelesen und unter Verwendung der Image Studio Software der Firma LI-COR ausgewertet.

### **D 3.5.2 Immunzytochemie**

Die Fixierung von Fibroblasten bzw. PSC erfolgte in der Kavität durch Zugabe einer 4% PFA-PBS-Lösung direkt in der 96-Well-Mikrotiterplatte für 15 min bei RT mit anschließendem Waschen in PBS mit 0,1% Triton X-100. Es schloss sich eine Inkubation von 1 h mit Blockierungspuffer an. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C in Primärantikörper (gelöst in Blockierungs-Puffer zur Spezifitätserhöhung).

Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Zellen erneut in PBS mit 0,1% Triton X-100 gewaschen und 1 h bei RT in Sekundärantikörperlösung mit Blockierungspuffer inkubiert. Hiernach schloss sich ein weiterer Waschschrift mit nukleärer Gegenfärbung in PBS mit 0,1% Triton X-100 und Hoechst an. Die Versetzung des letzten Waschpuffers mit 1:10 000 Hoechst färbt die Zellkerne selektiv an.

### **D 3.5.3 Luciferase-basierender Reporterassay**

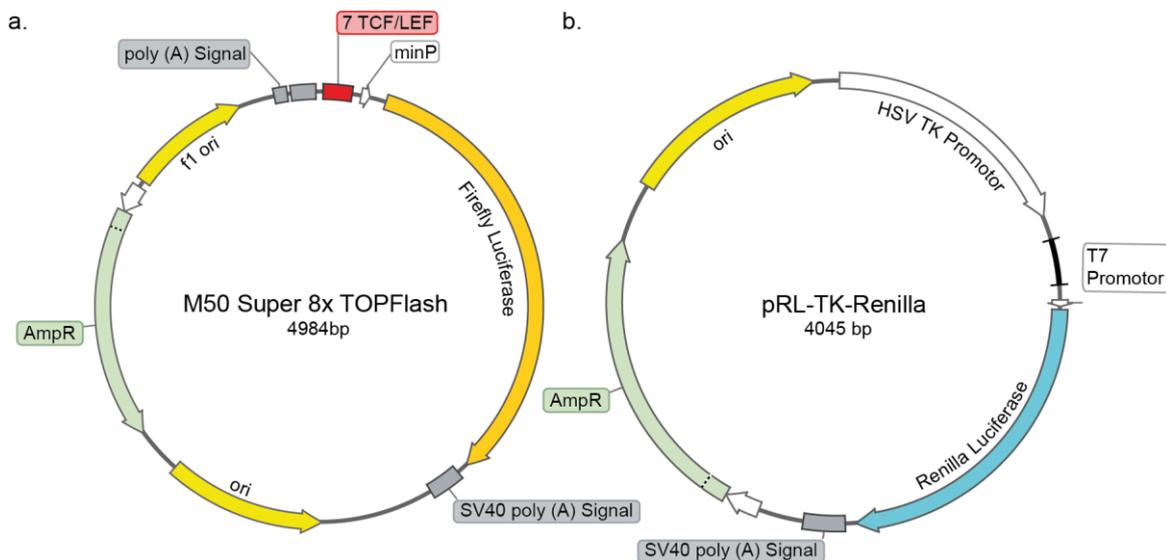
#### **Prinzip**

In dem hier verwendeten Reporterassay für  $\beta$ -Catenin wird das Plasmid M50 Super8xTOPFlas [105] verwendet. Dieses Plasmid kodiert eine Firefly-Luciferase aus dem

Leuchtkäfer *Phontius pyralis*. Als Promotor der Firefly-Luciferase dient ein viraler minimaler TA-Promotor. Upstream dieses Promotors wurden durch die Erstbeschreiber sieben TCF/LEF-Bindungsmotive kloniert. An diesen Motiven wirkt  $\beta$ -Catenin bei Bindung transaktivierend (7 Kopien der Sequenz: **AGATCAAAGGgggta**, das TCF/LEF Motiv in Großbuchstaben und eine Spacer Sequenz in Kleinbuchstaben). Nach Transfektion des Reporterplasmids wird bei erhöhter nukleärer  $\beta$ -Catenin Konzentration (also aktiviertem kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg) das Protein Firefly-Luciferase im Zellplasma translatiert. Nach Lyse der Zellen kann die Luciferase quantifiziert werden. Hierdurch lassen sich indirekt Rückschlüsse auf die Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges ziehen. Die Luciferase katalysiert folgende Reaktionen unter grün-gelber Lichtemission:



Nach Zugabe von Reagenzien kann die Reaktion kontrolliert ausgelöst werden und die Lichtintensität in einem Luminometer quantifiziert werden. Eine interne Kontrollnormierung erfolgt mittels Kotransfektion des Plasmids pRL-TK-Renilla, welches die Renilla-Luciferase (aus der Oktokorallenart *Renilla reniformis*) kodiert. Diese Luciferase setzt beim Umsatz von Coelenterazin zu Coelenteramid ebenfalls Licht (480 nm) frei und wird in diesem Plasmid über einen HSV-TK-Promotor gesteuert, welcher eine geringe, aber konstitutive Produktion des Enzyms. Sie dient als Kontrolle der Gesamtsyntheseleistung der Zellen (**Abb. 9**).



**Abb. 9: Luciferase-Reporterplasmide für den kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg**

a. Das Reporterplasmid M50 Super 8x TOPFlash enthält 7 TCF/LEF Bindungsmotive für  $\beta$ -Catenin. Die mRNA für das Protein Firefly-Luciferase wird in Abhängigkeit der Bindung von  $\beta$ -Catenin und TCF/LEF transkribiert. Diese Luciferase reichert sich nach Proteinsynthese im Zytoplasma an. b. Das Kontrollplasmid pRL-TK-Renilla enthält das Gen, welches für die Renilla-Luciferase kodiert. Das Gen steht unter Kontrolle eines schwachen aber konstitutiv aktiven HSV-TK-Promotors. Durch die hierdurch bedingte niedrige, aber konstitutive Transkription der mRNA für Renilla-Luciferase dient dieses Plasmid bei Kotransfektion als interne Kontrolle für die Gesamtsyntheseleistung der Zelle. Die Renilla-Luciferase reichert sich ebenfalls im Zytoplasma an.

## Durchführung

Für die Messung der Luciferase-Aktivität fand das Kit *Dual-Luciferase-Reporter-Assay* von Promega nach Herstellerangaben Anwendung. Die Einzelschritte des Assays erfolgten automatisiert mit dem doppelt-injizierenden SpectraMax L Luminometer der Firma Molecular Devices nach Herstellerprotokoll:

Nach einem Waschschrift erfolgte pro Kavität die Zugabe von 30 µL 1 × Passivem Lysepuffer (Teil des Kits) und die Inkubation auf einem Schüttler für 15 min bei RT. Danach wurden der Luciferase-Assay Buffer II (LARII, in dem vorher lyophilisiertes Luciferase-Assay Substrat gelöst wurde) sowie die sog. *Stop & Glo*-Reagenz auf RT erwärmt. Diese beiden Lösungen wurden in die entsprechenden Ansaugvorrichtungen des Luminometers platziert. Die Messung der Luciferasen erfolgte sequenziell in derselben Kavität. Zuerst wurden durch einen Injektor 100 µL LARII pro Kavität injiziert und die Firefly Luciferaseaktivität quantifiziert. Nach 10 s Messdauer und 2 s Verzögerung wurden 100 µL *Stop & Glo*-Reagenz hinzugegeben und die Renilla-Aktivität gemessen. Nach der Messung wurde die Platte verworfen.

## D 3.6 Transfer genetischen Materials in Zellen

### D 3.6.1 DNA-Transfektion

Die Transfektion von Plasmiden in Fibroblasten und HEK293-Zellen wird im Abschnitt **D3.6.3.1** bzw. **D3.6.3.2** beschrieben. Die Transfektion von MEFs mit Luciferase-Reporterplasmiden ist in **D.3.5.3** beschrieben.

### D 3.6.2 RNA-Transfektion

Die Transfektion der Zellen erfolgte nach Herstellerangaben (DharmaFECT Protokoll). Dabei wurde 1 µM RNA in DMEM und DharmaFECT 1 Transfektionsreagenz 6:1000 (v/v) in DMEM präinkubiert (5 min, RT) und dann im Verhältnis 1:1 vermengt. Nach einem weiteren Inkubationsschritt (20 min, RT) wurde der o.g. Ansatz zu frischem Zellmedium auf die Zellschicht gegeben, sodass eine finale RNA-Konzentration von 100 nM erreicht wurde. In dieser Arbeit wurden stets miRNA-Mimics verwendet, sodass nomenklatorisch der Einfachheit und Übersichtlichkeit halber als Abkürzung lediglich der Name der verwendeten ursprünglichen microRNA eingesetzt wird. Im Falle von miR-294 Mimic wäre das beispielsweise miR-294. Im Falle von einer Negativkontroll-Mimic mit einer unspezifischen Seed-Sequenz wäre dies miR-Con. Eine Übersicht über die verwendeten Abkürzungen der Mimics gibt **Tabelle 8**. Darüber hinaus wird auf den expliziten Hinweis der Verwendung von Mimics weitestgehend verzichtet.

### D 3.6.3 Transduktion

Transduktion beschreibt die Infektion von eukaryoten Zellen mit viralen Vektoren, wie beispielsweise Retroviren oder Lentiviren. Diese hat das Ziel, fremdes genetisches Material in Zellen exogen überzuexprimieren.

#### D 3.6.3.1 Retrovirusherstellung

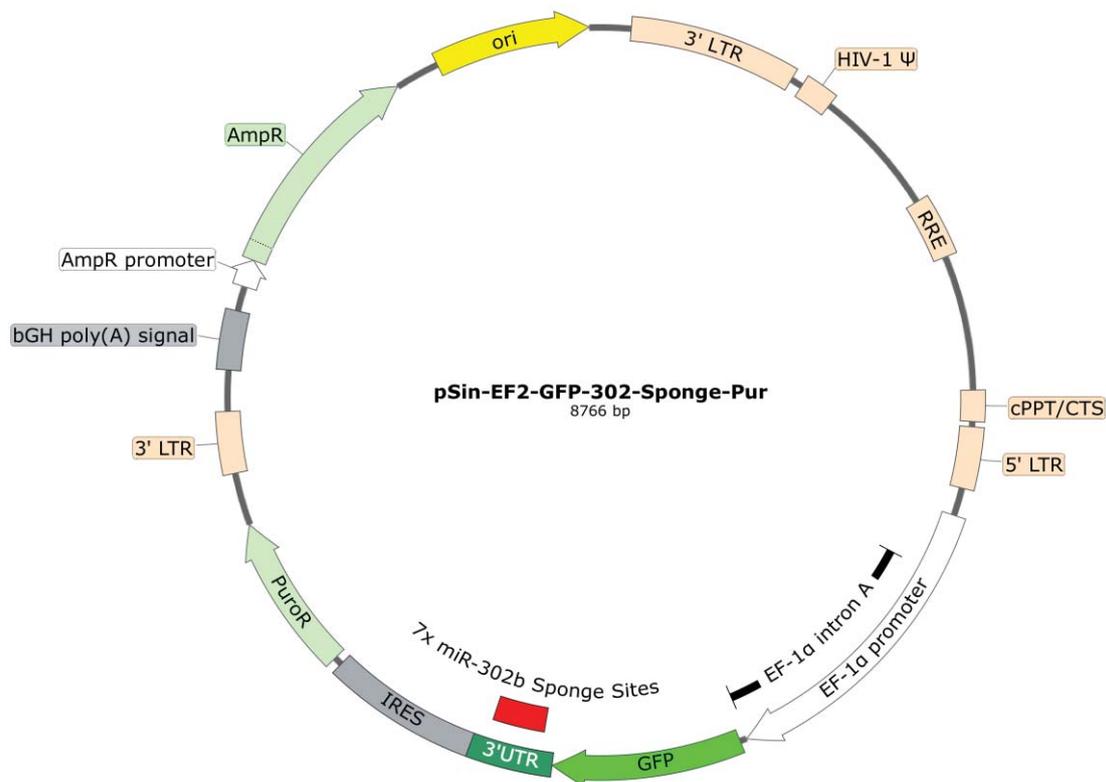
Zur Retrovirusherstellung wurde das pCL-Eco Packaging System verwendet. Dieses Plasmid wurde zuerst 1996 beschrieben und erlaubt die Herstellung von Retroviren in HEK293-Zellen [106]. Als Transferplasmid kommen die Vektoren pMXs-Oct4, pMXs-Sox2 und pMXs-Klf4 zum Einsatz [42].

Ein Vial mit HEK293-Zellen wurde aus flüssigem Stickstoff aufgetaut und in MEF-Medium suspendiert. Die Zellen wurden dann in einer 10-cm-Petrischale ohne vorherige Gelatine-Beschichtung in MEF-Medium ausplattiert (Tag 0). Am Tag 1 erfolgte ein Medienwechsel. Am Tag 2 wurden die HEK293-Zellen im Verhältnis von 1:3 und 1:6 gesplittet. Am Tag 3 wurden Zellkulturschalen mit 50 – 80% Konfluenz ausgewählt. Es erfolgt die Transfektion mit dem Verpackungsvektor pCL-Eco und dem jeweiligen Expressionsvektoren pMXs-Oct4, pMXs-Sox2 oder pMXs-Klf4 in einem Verhältnis von 1:2 (letztere enthalten die Sequenzen der Pluripotenzfaktoren Oct4, Sox2, Klf4). Die Transfektion erfolgte gemäß Angaben im Herstellermanual (Promega). Pro Zellkulturschale wurden jeweils 13,2 µg pCL-Eco Vektor und 26,8 µg pMXs-Vektor verwendet. Diese wurden in 2185 µL DMEM gelöst und mit 120 µL FuGENE-6 Transfektionsreagenz präinkubiert (30 min, RT). Dann wurde das Gemisch mit 6 mL MEF-Medium vermengt und nach Absaugung des Mediums auf die HEK293-Zellen gegeben. Nach 24 h im Zellkulturschrank wurde das Medium durch 8,5 mL frisches MEF-Medium ersetzt. Nach 48 h wurde der nun virushaltige Überstand abpipettiert und langsam durch einen 0,45 µm Filter gegeben. Anschließend erfolgte die Aliquotierung: In gleichem Verhältnis wurden jeweils 4 mL Überstand des Oct4-Retrovirus, Sox2-Retrovirus und Klf4-Retrovirus gemeinsam in ein 15 mL Falcon gegeben und bei -80°C eingefroren. Dies geschah unter der Annahme, dass das Mischen der Präparationen im gleichen Volumenverhältnis auch in einem ausgeglichenen Verhältnis der Anzahl an Virionen führte (1:1:1). Viruspräparationen wurden dann lediglich kurz vor Benutzung aufgetaut. Nach einmaligem Auftauen wurden Überschüsse verworfen. Nach der Retrovirusherstellung wurden alle verwendeten Materialien in NaOH-Lösung gereinigt.

Aufgrund der zentralen Bedeutung der Reprogrammierung in dieser Dissertationsarbeit erfolgt eine detaillierte Beschreibung der Transduktion mit den so hergestellten Retroviren in einem gesonderten Kapitel (D3.7).

### D 3.6.3.2 Lentivirusherstellung

Zur Lentivirusherstellung wurde die 3. Generation des lentiviralen Packaging Systems verwendet. Dieses enthält die Vektoren pMDL, pRSV, pVSVG sowie das Transferplasmid mit dem inklonierten Zielgen. Die Vektoren pMDSL und pRSV kodieren die viralen Proteine Gag, Pol und Rev. Gag enthält Matrix- und Kernproteine. Pol kodiert Enzyme (Reverse Transkriptase, Integrase, Protease), Rev kodiert ein regulatorisches Protein. Der Vektor pVSVG kodiert Oberflächen- und Membranproteine der Env-Gruppe [107,108]. In dieser Arbeit wurde als Transferplasmid pSin-EF2-Oct4-IRES-Pur verwendet. In dieses Transferplasmid wurde bereits in einem früheren Arbeitsschritt unserer Arbeitsgruppe die GFP-302-Sponge Sequenz über die Restriktionsstellen MluI und NsiI in den Vektor kloniert. Die Oct4-Sequenz wird dabei herausgeschnitten. Es resultiert pSin-EF2-GFP-302-Sponge-Pur. Dieser Schritt wurde nicht durch den Promovierenden ausgeführt und wird daher an dieser Stelle nicht weiter beschrieben (**Abb. 10**).



**Abb. 10: Das Transferplasmid pSin-EF2-GFP-302-Sponge-Pur**

Das Transferplasmid enthält die Transgenesequenz von GFP unter Kontrolle des EF-1 $\alpha$ -Promotors, in deren 3'-UTR-Region 7 identische Sponge-Sequenzen lokalisiert sind, die nach Transkription der korrespondierenden mRNA miR-302 binden. Über die im Plasmid nachfolgende IRES-Site wird unabhängig vom Promoter EF-1 $\alpha$  die Puromycin-Resistenz vermittelt, welche für die stabile Transfektion des Plasmids benötigt wird. Die Transgene GFP und Puromycin werden von zwei LTRs flankiert, welche die Integration in das Zielgenom erleichtern.

Zur Herstellung von GFP-302-Sponge Virionen wurden HEK293-Zellen wie beschrieben in einer T25-Zellkulturflasche subkultiviert. Danach erfolgt die Transfektion mit den o.g. Expressionsplasmiden pMDL, pRSV, pVSVG und pSIN in einem Verhältnis von 1:1:1:3. Die

Plasmide wurden in 600  $\mu\text{L}$  DMEM gelöst (insgesamt 10  $\mu\text{g}$  DNA, d.h. jeweils 1,6  $\mu\text{g}$  pMDL, pRSV, pVSVG und 5  $\mu\text{g}$  pSIN). Der Ansatz wurde mit 30  $\mu\text{L}$  FuGENE-6 Transfektionsreagenz präinkubiert (30 min, RT), nachfolgend mit 6 mL MEF-Medium vermischt und auf die HEK293-Zellen gegeben. Nach 48 bis 60 h Inkubation bei 37°C wurde der virushaltige Überstand abpipettiert und langsam durch einen 0,45  $\mu\text{m}$  Filter in ein 15 mL Falcon sterilfiltriert. Anschließend erfolgt die Aliquotierung und die Kryokonservierung bei -80°C. Das benutzte Material wurde für 10 min mit NaOH sterilisiert und danach verworfen. Die Viruspräparationen wurden lediglich kurz vor Benutzung aufgetaut. Nach einmaligem Auftauen wurden etwaige Überschüsse verworfen.

### **D 3.6.3.3 Stabile Genexpression in Fibroblasten durch lentivirale Transduktion**

3T3-Fibroblasten wurden in einer T25-Zellkulturflasche ausplattiert und gesplittet. Am Tag 7 nach Ausplattierung (Konfluenz 50 – 80%) erfolgte die Transduktion durch Zugabe von 4,5 mL frisch aufgetauten Lentivirus-enthaltenden Überstandes in 8 mL frischem MEF-Medium. Der Lösung wurden 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Polybrene zugesetzt. Hierbei handelt es sich um ein kationisches Polymer welches die Transduktionseffizienz bis zu 1000-fach erhöht, indem es die Ladungsabstoßung zwischen Virionen und den N-Acetylneuraminsäuren auf der Zelloberfläche verringert [109]. Nach 24 h erfolgte ein Medienwechsel. Nach 48 h wurden die Zellen auf 40% Konfluenz gesplittet und die Selektion durch Zusatz des Antibiotikums Puromycin (0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) begonnen. Beim täglichen Medienwechsel wurde stets Puromycin (0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) zugegeben. Nach weiteren 48 h zeigte sich zunächst kein Zelltod in den Zellkulturflaschen, sodass die Zellen im Verhältnis 1:4 in neue T25-Zellkulturflaschen gesplittet wurden und andere Puromycin-Konzentrationen angewandt wurden. Bei 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Puromycin waren nach weiteren 24 h nahezu alle Zellen apoptotisch, wohin gegen bei 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Puromycin der gewünschte Selektionseffekt sichtbar wurde. Nach 12 Tagen bildeten sich die ersten Kolonien Puromycin-resistenter Fibroblasten. Die T25-Zellkulturflaschen wurden dann in je zwei 10-cm-Zellkulturschalen überführt, eine ohne und die andere mit Puromycin-Zusatz. Es zeigte sich in der Fluoreszenzmikroskopie am Tag 14, dass die Zellen auch in Abwesenheit von Puromycin stabil GFP exprimierten.

Diese stabil GFP-302-*Sponge*-exprimierenden Zellen wurden bis zu hoher Konfluenz kultiviert und für weitere Experimente kryokonserviert.

## **D 3.7 OSK-Reprogrammierung mit miRNA-Mimics**

Die Reprogrammierung erfolgte in schwarz gewandeten mit Gelatine beschichteten (0,1% Gelatine, 5 min, 37°C) 96-Well-Mikrotiterplatten. Währenddessen erfolgte das Auftauen von *Oct4-GFP*-MEFs der Passage 2 bis maximal 5 und das Ausplattieren in MEF-Medium mit 900 Zellen pro Kavität. Nach einer 24-stündigen Inkubation erfolgte die Transduktion. Hierfür

wurde je ein Falcon mit 12 mL OSK aufgetaut und (je 4 mL Oct4-, Sox2- und Klf4-Retrovirus) mit 3 mL MEF-Medium sowie 7,5 µL Polybrene (1:2000) versetzt. Hiervon wurden je Kavität 150 µL aufpipettiert (Tag 0, Transduktion). An Tag 1 nach Transduktion wurde der Überstand durch frisches MEF-Medium ersetzt. Von Tag 2 bis Tag 6 nach Transduktion wurde das Medium alle zwei Tage durch 150 µL 15%-FBS-ES-Medium ersetzt. Von Tag 6 bis 16 wurde das Medium alle 2 Tage durch 150 µL 15%-KSR-KO-Medium ersetzt. Die Expression von Oct4-GFP und die Formation von Zellkolonien wurde zwischen Tag 10 und Tag 16 nach Transduktion untersucht.

Die Berechnung der Reprogrammierungsrate, also der Anzahl GFP-positiver Kolonien pro Kavität und eingesetzter Zellzahl, erfolgte am Tag 16 nach Beginn der OSK-Reprogrammierung mittels HCl-Fluoreszenzmikroskopie ohne nukleäre Gegenfärbung der Zellen. Hierfür wurde über den GFP-Kanal die Anzahl räumlich voneinander getrennter Oct4-GFP-positiver Kolonien erfasst. Für jede Bedingung (OSK + miR-294, OSK + miR-181d) erfolgte die Reprogrammierung von Zellen in 3 Kavitäten (experimentelles Triplikat) sowie die Versuchswiederholungen mit unabhängigen Chargen von MEFs und Viruspräparationen.

Zur weiteren Verwendung der generierten iPSCs, sowie insbesondere zur Validierung ihrer Pluripotenz erfolgte die Aufnahme und Vereinzelnung GFP-positiver Kolonien. Hierfür wurde 1 h vor der Aufnahme einzelner Kolonien das Medium ausgetauscht. Dies verringerte die Apoptoserate bei der Vereinzelnung von Kolonien. Unter dem Stereomikroskop wurden einzelne Kolonien mit einer 20 µL Pipette durch vorsichtiges Kratzen der Pipettenspitze auf der Zellkultur aufgesammelt. Jede eingesammelte Kolonie wurde in ein Falcon-Röhrchen mit 50 µL 0,025% Trypsin transferiert und durch mehrfaches Pipettieren dissoziiert. Nach Inkubation im Wasserbad (5 min, 37°C) erfolgte schließlich die Hinzugabe von 5 mL ES-Medium und eine weitere Dissoziation der Zellen durch Pipettieren. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 200 × g) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 mL ES-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun in eine 24-Well-Platte, welche mit 0,1% Gelatine und irMEFs beschichtet war, übertragen. Unter täglichem Wechsel des Nährmediums erfolgte die Subkultivierung der Zellen bis zur Konfluenz und die anschließende Übertragung in eine 6-Well-Platte (Passage 1).

### **D 3.7.1 Verifikation von Stammzeleigenschaften**

#### **D 3.7.1.1 Chimärenbildung und Keimbahnkontribution**

Eine zentrale Eigenschaft von PSCs ist ihre Fähigkeit, nach Injektion in Blastozysten zur Ausbildung eines vollständigen Organismus, in diesem Fall dann einer Chimäre, beizutragen. Um aus den entstandenen Jungtieren in weiteren Generationen reine iPSC-Individuen zu erhalten, müssen die eingeschleusten iPSCs auch zur Entwicklung der Keimbahn, also

den Gonaden, beitragen. Der Chimärismus wurde über eine X-Gal Färbung und die Keimbahnkontribution über die Expression von Oct4-GFP in den Gonaden fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

### **Tag -1 bis 0. Vorbereitung:**

Vorbereitend wurden 1,2 g PVP in 10 mL A. dest. in einem Falcon-Röhrchen unter Rollern bei RT gelöst. Nach 1 h wurde die so hergestellte 12%ige Lösung durch einen 0,45 µm Filter in 1 mL Aliquote sterilfiltriert und bei -20°C kryokonserviert. Am Tag der Blastozysteninjektion wurde diese Lösung durch Zugabe von A. dest. auf 1% verdünnt.

3 Tage vor der Blastozysteninjektion (Tag -1) wurden irMEFs in 0,1% Gelatine beschichteten 3,5-cm-Petrischalen ausplattiert. Am Folgetag (Tag 0) wurden die zu untersuchenden iPSCs gesplittet und auf den irMEF-Rasen ausplattiert, sodass die iPSCs am Tag 2 eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten.

### **Tag 1. Blastozystengewinnung:**

Am Tag 1 wurden morgens die M2- und KSOM-Medien auf RT erwärmt. Drei leere 3,5-cm-Petrischalen wurden in eine leere 10-cm-Petrischale gesetzt, jeweils 5 × 30 µL Tropfen KSOM-Medium aufgetragen und mit Mineralöl überdeckt. Die Petrischalen wurden im Zellinkubator bei 37°C inkubiert, sodass sich die CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Partialdrücke der Medien-Tropfen unter dem Mineralöl über mehrere Stunden an die Partialdrücke des Zellinkubators angleichen konnte.

Am Nachmittag wurden von der Firma Taconic E2,5 super-ovulierte und befruchtete C57BL/6 Weibchen sowie E2,5 pseudoschwangere Swiss-Webster Weibchen geliefert. Durch die Pseudoschwangerschaft (Paarung mit vasktomiertem Swiss-Webster Männchen) bereitet sich die Schleimhaut des Uterus bereits auf die Implantation von Blastozysten am Tag 2 des Protokolls vor.

Die C57BL/6 Weibchen wurden wie unter **D3.1.5.1** beschrieben gewaschen und der Uterus herauspräpariert. Dieser wurde in HBSS gewaschen und in M2-Medium eröffnet. Die Blastozysten wurden schließlich unter dem Stereomikroskop herauspräpariert und mit der Mundpipette in 4 Waschschritten in einzelnen Tropfen KSOM-Medium sequenziell gewaschen. Danach wurden sie wiederum in KSOM-Medium für 16 h bei 37°C inkubiert.

### **Tag 2. Blastozysteninjektion:**

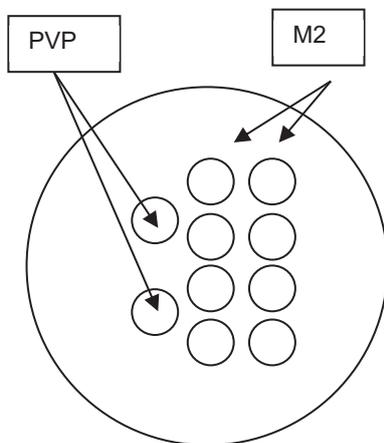
Am Folgetag wurde den nun E3,5 pseudoschwangeren Swiss-Webster Weibchen als OP-Vorbereitung zunächst Meloxicam zur perioperativen Analgesie dem Trinkwasser beigemischt (Trinkmenge Maus 6 mL/Tag, Durchschnittsgewicht 30 g, Dosierung Meloxicam 5 – 10 mg/kg KG, 6 mL Wasser enthalten also 227 µg Meloxicam).

Dann wurde eine zu überprüfende Kultur putativer iPSCs (maximal Passage 5 nach Picking

Oct4-positiver Kolonien) mit 200  $\mu$ L 0,05% Trypsin pro Kavität der 6-Well-Platte trypsiniert, die Reaktion mit ES-Medium angehalten, die Zellen zentrifugiert (5 min, 500  $\times$  g) und in 2 mL ES-Medium resuspendiert. Hiervon wurden 500  $\mu$ L in 15 mL ES-Medium in einem Falcon verdünnt und bis zur Blastozysteninjektion auf Eis gelagert.

Für die Arbeit am Injektionsmikroskop wurden neben dem invertierten Stereomikroskop auch der Luftpolster-Tisch, die Mikromanipulatoren, der Piezo-Drill mit Fußpedal, die pneumatischen Injektoren und die Wärmeplatte angeschaltet. Die beiden Pipettenhalterungssysteme mit den Injektoren mussten stets auf ihre Dichtigkeit geprüft werden, gegebenenfalls wurde hier Mineralöl nachgefüllt. Es erfolgte ein Austausch der Halte- und Piezo-Pipette. Eine benutzte Piezo-Pipette enthält stets Quecksilber und musste daher speziell entsorgt werden.

Der Deckel einer 10-cm-Petrischale wurde durch Zugabe von 2 Tropfen à 50  $\mu$ L 1% PVP und 8 Tropfen à 50  $\mu$ L M2-Medium, überdeckt mit Mineralöl, vorbereitet (**Abb. 11**).



**Abb. 11: Petrischalen-Beladung mit verschiedenen Medien bei der Blastozysteninjektion**

Beladung der Petrischale mit 2 Tropfen PVP und 8 Tropfen M2-Medium. Die Überlagerung von Mineralöl ist hier nicht dargestellt. Die Piezo-Pipette wird vor Aufnahme von iPSC von Innen mit PVP beschichtet, um die Zelladhäsion zu verringern. In den Tropfen mit M2-Medium werden die zu injizierenden iPSCs vor Blastozysteninjektion gelagert, die Blastozysteninjektion durchgeführt und die behandelten Blastozysten bis zum Transfer in den Inkubator abgelegt.

16 h nach Gewinnung der Blastozysten wurden diese wieder in M2-Medium gewaschen und mit der Mundpipette in einen frischen Tropfen M2-Medium übertagen. In einen weiteren Tropfen M2-Medium wurde eine geringe Anzahl iPSCs pipettiert und mitsamt Petrischale unter dem Mikroskop platziert.

Die Haltepipette wurde nun zunächst mit M2-Medium befüllt und herausgeschwenkt. In die Piezo-Pipette wurde mit der Hamilton-Spritze neues Quecksilber (2 mol/L) injiziert. Nach Adjustierung beider Pipettenspitzen mit der beidseitigen Joystick-Vorrichtung wurde die Piezo-Pipette zunächst mit dem Injektor bis zur Spitze mit Quecksilber gespült. Dann wurde 1% PVP aus dem vorgelegten Tropfen 6-mal ein und ausgesaugt, um so das Innere der Pipettenspitze mit PVP zu beschichten. Dies verringerte die Adhäsion der iPSCs in der Pipette.

Dann erfolgte mit der Piezo-Pipette die Aufnahme von 10 – 15 iPSCs und das Ausschwenken der Piezo-Pipette. Die iPSCs unterscheiden sich lichtmikroskopisch deutlich von den irMEFs (größere asymmetrische Zellen). Es wurde die erste Blastozyste vorsichtig mit der Haltepipette von links mit dem Injektor angesaugt, indem durch Drehen des Injektors ein Unterdruck erzeugt wurde. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Embryoblast sich an der Seite der Haltepipette befindet, damit die Piezo-Pipette beim Bohrvorgang diesen nicht beschädigt. Die Piezo-Pipettenspitze wurde auf die Oberfläche der Blastozyste orthogonal positioniert und die Bohrfunktion auf niedriger Energiestufe unter vorsichtigem Druck in Richtung Blastozyste ausgelöst. Nach circa 3 – 5 Piezo-Clicks war die Zona pellucida und der Trophoblast durchstoßen und die Pipette gleitete in das Innere der Blastozyste. Nun wurden mit dem pneumatischen Injektor vorsichtig 10 – 15 iPSCs aus der Piezo-Microdrill Pipette in die Blastozyste injiziert. Danach wurde die Pipette vorsichtig zurückgezogen. Die Blastozyste verschloss sich aufgrund des nur kleinen Defekts selbständig. Die injizierte Blastozyste wurde an einem definierten Rand des M2-Tropfens positioniert und von der Haltepipette gelöst.

Dieser Vorgang wurde je nach gewünschter Anzahl an Blastozysten entsprechend wiederholt. Um eine effiziente *in vitro* Fertilisation zu gewährleisten waren pro Maus etwa 8 – 12 Blastozysten vorzubereiten.

Nachdem alle benötigten Blastozysten mit iPSCs injiziert waren, wurden diese mit der Mundpipette in eine neue Petrischale (M2-Medium mit Mineralöl) übertragen und für mindestens 2 h im Zellinkubator bei 37°C aufbewahrt, um einen Verschluss der Zona pellucida sicherzustellen.

## **Tag 2. Intrauteriner Blastozystentransfer:**

Die pseudoschwangeren Swiss-Webster Weibchen (E3,5) wurden im nächsten Schritt mit Isofluran narkotisiert. Dies geschah zunächst in einem Glasbehälter und dann über eine Nasenmarke bei einer Flussgeschwindigkeit für Isofluran von 4 mL/h und für Sauerstoff von 2 L/min. Das Stereomikroskop und eine Lichtquelle wurden eingerichtet, die Instrumente bereitgelegt. Dann wurde eine Petrischale mit 4 Tropfen à 50 µL M2-Medium, bedeckt mit Mineralöl, vorbereitet und die Blastozysten mit der Mundpipette dorthin übertragen.

Nach Desinfektion des Mausrückens mit 70% Ethanol erfolgt dann unter dem Stereomikroskop eine orthogonale Inzision im Bereich der Lumbalwirbelsäule. Es wurde die Rückenmuskulatur durchtrennt und der Retroperitonealraum eröffnet. Nach Mobilisation des retroperitonealen Fettes stößt man auf jeder Seite auf eine Hälfte des Uterus bicornis. Die nach cranial zeigende Spitze des Uterus wurde aus dem Tier mit einer Watchmaker Pinzette herausmobilisiert. Es erfolgt eine Stichinzision am kranialen Pol des Uterus mit einer 26G Nadel. Dann wurden pro Seite 6 Blastozysten in die Mundpipette aufgenommen und über die Stich-

inzision in den Uterus injiziert. Der Uterus wurde jeweils beidseits zurück in den Situs geschoben und die Muskulatur mit einem Stich genäht. Der Hautschnitt wurde mit einem Acuclip System geschlossen, das Tier auf ein Wärmekissen gelegt und anschließend zurück in seinen Käfig platziert. Dieser Vorgang wurde für alle benötigten Blastozysten bzw. Tiere wiederholt.

Auf dem Käfig wurde der Geburtstermin vermerkt: Am Tag 1 des Protokolls (bei Lieferung) waren die Mäuse bei E2,5. Etwa die Hälfte der Swiss Webster Weibchen gebären am 20. Tag nach Feststellung eines vaginalen Pfropfes, d.h. bei E19,5 bis E20,5.

### **Auswertung:**

Für die Gewebeanalyse wurden die Swiss-Webster Weibchen an E13 getötet und die Embryos wie oben beschrieben isoliert. Das extraembryonale Gewebe wurde entfernt und die Embryos in HBSS gewaschen. Dann wurden zwei Nachweis-Methoden angewandt:

Für den Nachweis eines Chimärismus wurde die unter dem *Rosa26<sup>+/βgal</sup>*-Lokus konstitutiv exprimierte β-Galactosidase verwendet. Sie katalysiert bei der Färbung mit dem Indoxylglykosid X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) eine Hydrolysereaktion bei der am Ende 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo entsteht, welches unlöslich ist und den gesamten Embryo intensiv blau färbt. Die Embryos wurden hierzu zuerst ausgiebig bei RT in PBS gewaschen. Dann erfolgte die Fixierung der Embryos bei RT für 15 – 30 min (Fixierungslösung Embryo) und im Anschluss drei Waschgänge à 15 min (Waschpuffer Embryo). Danach wurde der Embryo 4 h gefärbt (X-Gal Lösung, RT) und bis zur Dunkelfeld- und Fluoreszenzmikroskopischen Auswertung in PBS gelagert (4°C).

Für den Nachweis einer Keimbahn-Kontribution wurden die Gonaden der E13 Embryos isoliert und unter einem Fluoreszenzmikroskop ohne zusätzliche Färbung in HBSS analysiert. Die Gonaden der *Rosa26<sup>+/βgal</sup>, Oct4-GFP*-Chimären fluoreszieren bei korrekter Keimbahnkontribution im GFP-Kanal grün.

### **D 3.7.1.2 Immunzytochemischer Nachweis von Pluripotenzfaktoren**

Die Immunzytochemie erfolgt in einer 96-Well-Platte wie unter **D3.5.2** beschrieben. Als Primärantikörper fungierten ein Antikörper gegen Nanog und ein SSEA1 Antikörper (**Tabelle 7**).

### **D 3.7.1.3 Karyotypisierung**

Für die Karyotypisierung wurden iPSC-Linien unter Passage 10 verwendet, welche zuvor von den irMEFs entwöhnt worden waren. Die Zellen wurden in einem hohen Proliferationsstatus in 0,1% Gelatine beschichteten 10-cm-Petrischalen kultiviert. Colcemid unterbricht die Mitose in der Metaphase. Es wurde dem ES-Medium mit einer Konzentration von 0,2 µg/mL

zugesezt, sobald die Zellen eine Konfluenz von 50% erreicht hatten. Nach 3-stündiger Inkubation wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 0,5 mL 10%-FBS-ES-Medium resuspendiert. 10 mL einer 75 mM KCl Lösung wurden tropfenweise hinzugegeben und die Suspension für 10 min bei RT präinkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 200 × g) wurde das Pellet in 15 mL Fixierungslösung aus drei Teilen Methanol und einem Teil Essigsäure resuspendiert. Nach einer zweiten Zentrifugation (10 min, 200 × g) wurde das Pellet in 3 mL Fixierungslösung resuspendiert. 20 µL der Suspension wurden auf einem zuvor mit A. dest. benetzten Objektträger platziert. Durch die Fixierung wurden die Zellmembranen aufgebrochen. Nach 24 h Trocknungszeit bei RT wurden die Objektträger für 1 h bei RT mit DAPI Lösung gefärbt (0,2 µg/mL DAPI in PBS). Nach dem Abwaschen mit Leitungswasser wurden die Objektträger erneut getrocknet und die Zellen anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 100-facher Vergrößerung analysiert. Die Chromosomen-Zahl von 30 Metaphasen wurde jeweils ausgewertet und gemittelt.

## D 4 Statistik

Jeder in dieser Arbeit beschriebene Versuch wurde als experimentelles und biologisches Triplikat durchgeführt. Dabei besteht das experimentelle Triplet aus dem Ansatz desselben Schrittes in 3 Kavitäten und der nachfolgenden internen Mittelwertbildung der Ergebnisse. Das biologische Triplikat besteht aus einer 3-fachen Wiederholung des gesamten Versuchs zu verschiedenen Zeitpunkten und mit Reagenzien und Organismen verschiedener Chargen.

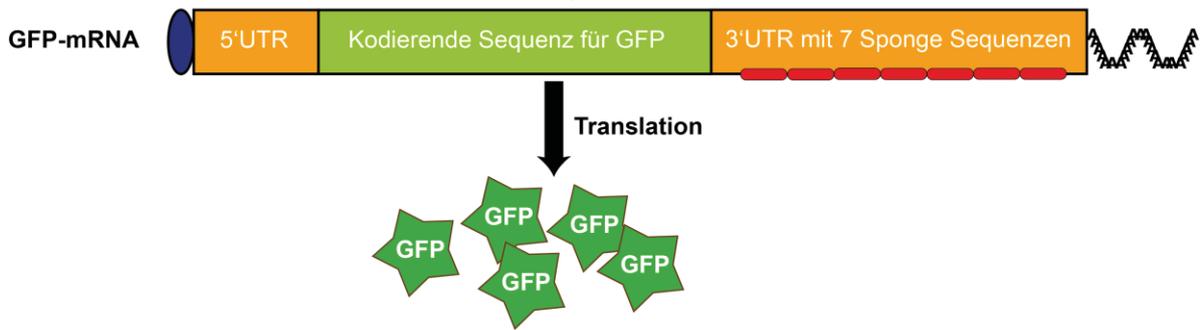
Die Ergebnisse werden als Mittelwerte mit Standardabweichung präsentiert, sofern nicht anders vermerkt. Die statistische Auswertung erfolgte mit den unter **D2.2** aufgeführten Programmen.

Zur Prüfung der Signifikanz von Mittelwertdifferenzen wurde mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test zunächst auf Normalverteilung überprüft. Bei bestätigter Normalverteilung fand der t-Test nach Student Anwendung. Bei nicht vorliegender Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

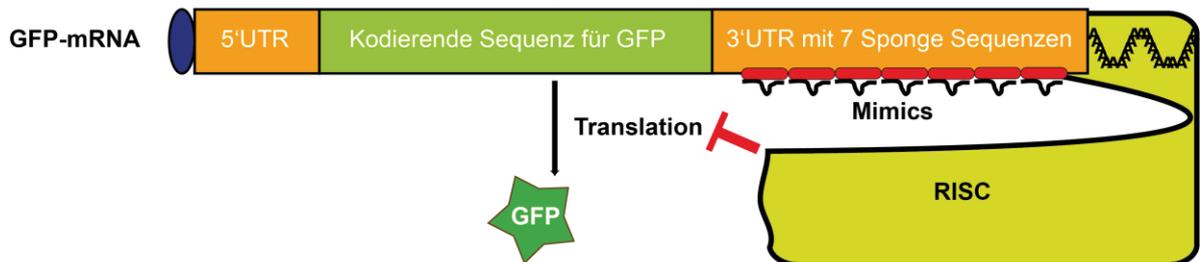
Ein Wert von  $P < 0,05$  galt als statistisch signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit  $< 5\%$ ),  $P < 0,01$  wurde als sehr signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit  $< 1\%$ ) und  $P < 0,001$  als höchst signifikant betrachtet (Irrtumswahrscheinlichkeit  $< 0,1\%$ ).



In Abwesenheit von miR-302b Mimics: Volle GFP-Expression



Nach Transfektion von miR-302b Mimics: Hemmung der GFP-Expression



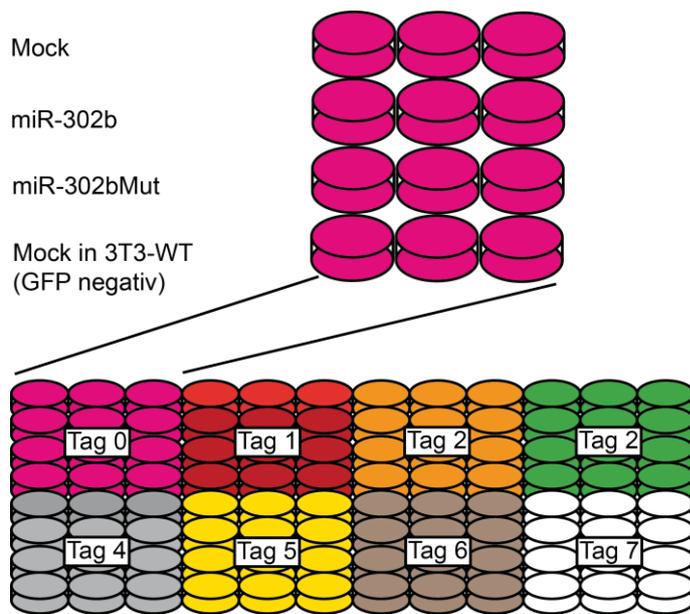
**Abb. 12: Wirkungsweise des GFP-302-Sponge-Konstruktes**

Die GFP-mRNA enthält in ihrer 3'-UTR Bindungsmotive für miR-302b, die sog. Sponge-Sequenzen. Bei Bindung der Mimic (unterer Teil der Abbildung) wird die Translation der GFP-mRNA durch RISC inhibiert und es wird weniger GFP gebildet. Die Quantifizierung der GFP-Fluoreszenzintensität dient somit als negativ korrelierter Surrogatparameter für die Mimic-Aktivität.

## E 1.1 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Mimic-Aktivität

Zunächst erfolgte die Ausplattierung stabil GFP-302-Sponge-mRNA exprimierender 3T3-Fibroblasten (im Folgenden Reporterfibroblasten genannt) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit einer Konzentration von circa 900 Zellen pro Kavität. Am Folgetag erfolgte die Transfektion mit miR-302 Mimic. Als Kontrolle dienten eine Mimic mit einer mutierten *Seed*-Sequenz (miR-302bMut) sowie eine Mock-Kontrolle mit Transfektionsreagenz ohne RNA-Zusatz. Als Negativkontrolle dienten Wildtyp 3T3-Fibroblasten ohne Expression des *Sponge*-Reporters (3T3-WT).

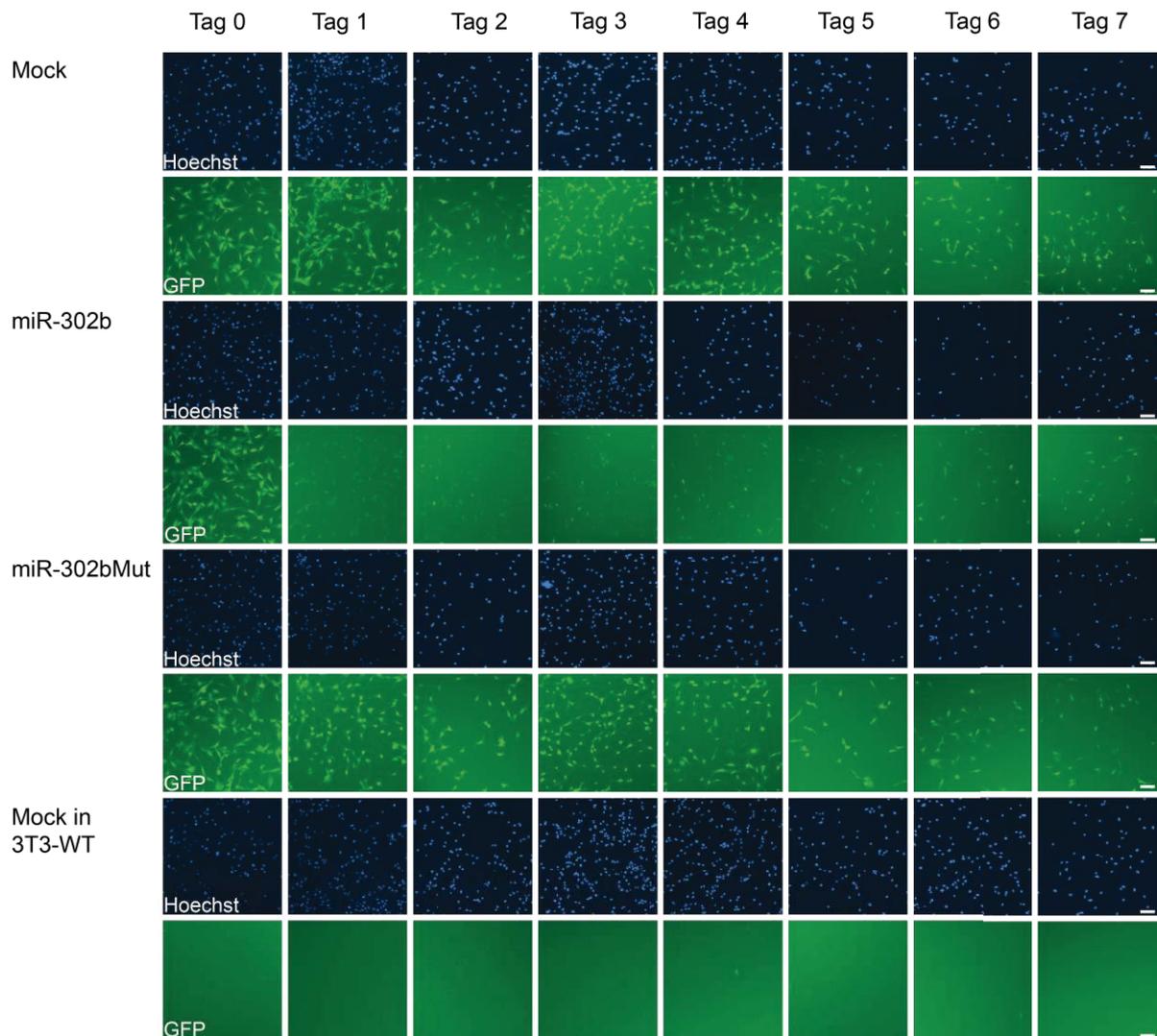
Von Tag 0 bis 7 post-transfectionem erfolgte jeweils die Untersuchung von 12 Kavitäten (3 × Mock, 3 × miR-302b, 3 × miR-302bMut, 3 × siR-Con). In der Auswertung wurde die gesamte GFP-Intensität auf die Anzahl der Zellen normiert. Letztere Kennzahl wurden über die nukleäre Gegenfärbung und Auszählung der Zellkerne gewonnen (**Abb. 13**).



**Abb. 13: Mikrotiterplatten-Schema für den HCI-fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Mimic-Aktivität**

96-Well-Platte für die Transfektion von stabil GFP-302-Sponge exprimierenden Reporterfibroblasten mit Mock, miR-302b, mutierter miR-302bMut und einer Negativkontrolle mit Mock-transfizierten 3T3-WT. Es wurden jeweils 3 Kavitäten pro Tag und Mimic HCI-fluoreszenzmikroskopisch untersucht und die GFP-Fluoreszenz so im Zeitverlauf quantitativ ausgewertet. Farblich getrennt sind die Kavitäten pro Versuchstag (Tag 0 bis 7).

Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer Versuchswiederholung ist in **Abb. 14** dargestellt. Es war zu erkennen, dass die GFP-Fluoreszenz der Reporterfibroblasten der Mock-Kontrolle und der mit miR-302bMut transfizierten Zellen zwischen Tag 0 und 7 stabil blieb. Im Gegensatz hierzu war in den mit miR-302b transfizierten Reporterfibroblasten bereits ab Tag 1 *post transfectionem* eine deutliche Abnahme der GFP-Fluoreszenz zu erkennen, welche mindestens bis Tag 5 anhielt. Ab Tag 6 stieg die Fluoreszenz wieder an. Die 3T3-WT Kontrolle zeigt wie zu erwarten keine GFP-Fluoreszenz.

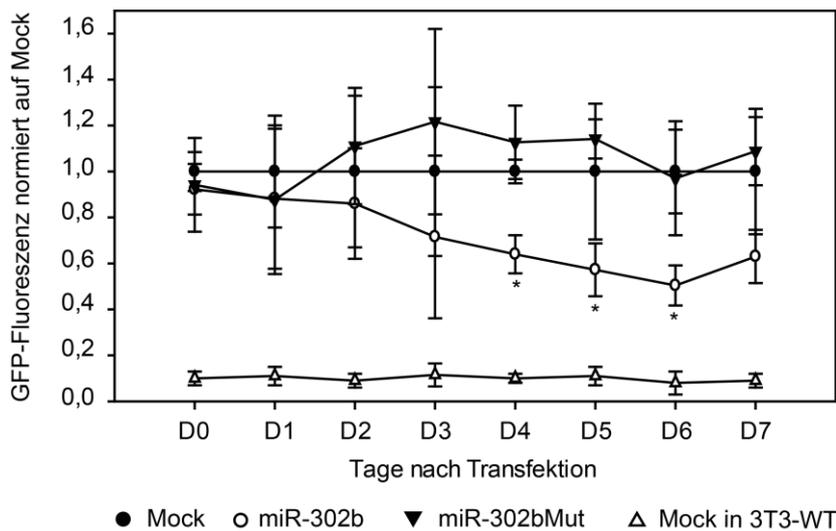


**Abb. 14: HCI-Fluoreszenzmikroskopie während des Sponge-Experimentes**

Repräsentative Bilder einer HCI-Fluoreszenzmikroskopie an den Tagen 0 – 7 nach Transfektion von Mock, miR-302b und miR-302bMut in stabil GFP-302-Sponge exprimierende Reporterfibroblasten. Darunter Negativkontrolle mit Mock transfizierten 3T3-WT. Die erste Zeile pro Ansatz repräsentiert jeweils die nukleäre Gegenfärbung mit Hoechst. In der zweiten Zeile ist die GFP-Fluoreszenz dargestellt. Größenreferenz in rechter Spalte entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Die fluoreszenzmikroskopischen Daten wurden nach der qualitativen Begutachtung der Fluoreszenzintensität auch quantitativ ausgewertet. Hierfür wurde die GFP-Fluoreszenzintensität pro Kavität auf die Anzahl der Zellen sowie auf die Mock-Fluoreszenz normiert.

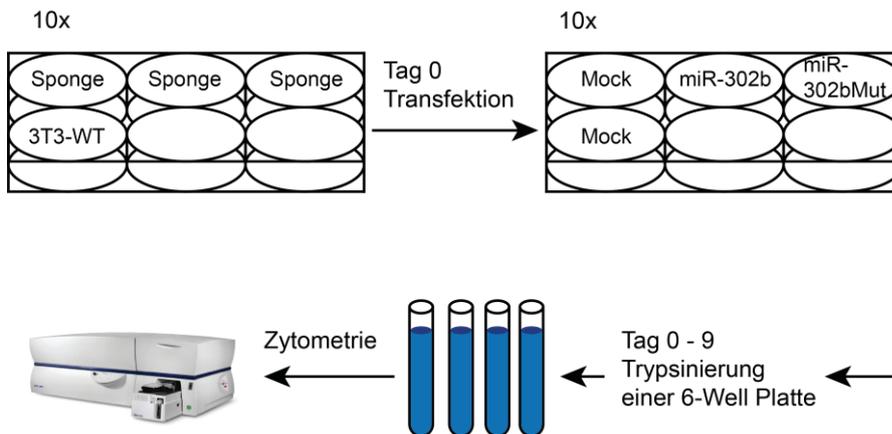
Die zusammenfassende Auswertung für 3 unabhängige Versuchswiederholungen ist in **Abb. 15** dargestellt: Für miR-302bMut zeigte sich zu keinem Zeitpunkt des Experimentes eine von Mock signifikant unterschiedliche GFP-Fluoreszenz, wohingegen bei miR-302b eine Tendenz zu einer abnehmenden GFP-Fluoreszenz ab Tag 1 *post transfectionem* zu verzeichnen war. Von Tag 4 (62% im Vergleich zu Mock) bis Tag 6 (Nadir, 50% im Vergleich zu Mock) ist die GFP-Fluoreszenz gegenüber Mock signifikant reduziert. Am letzten Tag der Messung (Tag 7 nach Transfektion) war wieder eine Zunahme der Fluoreszenz zu verzeichnen (62%). Diese Resultate weisen darauf hin, dass die maximale Wirksamkeit von transfizierten Mimics nach 7 Tagen wieder abnimmt.



**Abb. 15: Quantitative Analyse der fluoreszenzmikroskopisch erfassten Reporteraktivität**  
 Zeitverlauf der Fluoreszenz von GFP-302-Sponge-Reporterfibroblasten nach Transfektion von Mock, miR-302b, miR-302bMut sowie GFP-Negativkontrolle mit 3T3-WT. Werte sind auf Mock normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines biologischen Triplikats. \*  $P < 0,05$ .

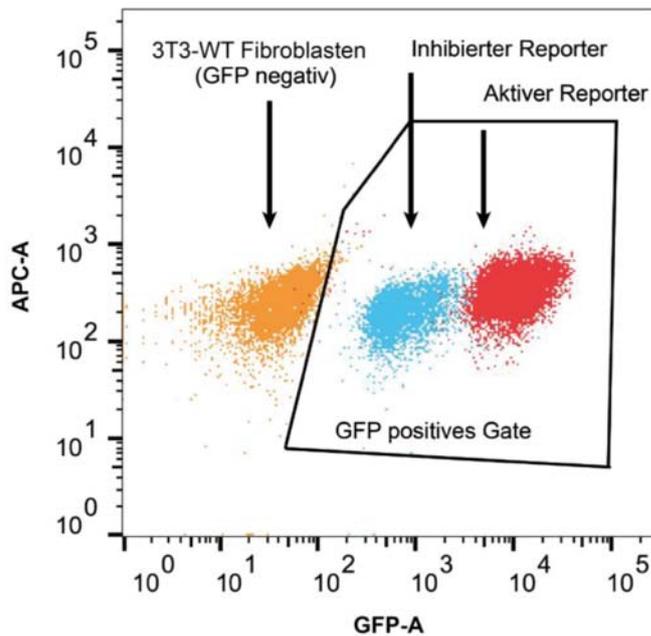
## E 1.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Mimic-Aktivität

Die durchgeführten, fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse sollten mittels Durchflusszytometrie validiert werden. Hierfür wurde in analogen Experimenten täglich die GFP-Fluoreszenz über einen Zeitraum von 10 Tagen gemessen. Der Versuchsaufbau ist in **Abb. 16** beschrieben. Um die für die Durchflusszytometrie notwendige, höhere Zellzahl zu erhalten, wurde der Versuch in 6-Well-Platten angesetzt. Die ausplatierte Zelldichte und Konzentration transfizierter Mimics war dabei analog zu **E1.1**.



**Abb. 16: Versuchsaufbau zur durchflusszytometrischen Fluoreszenzmessung**  
 Ausplattierung der Reporterfibroblasten bzw. 3T3-WT (ca. 25 000/Kavität) an Tag -1. Transfektion am Tag 0: Mock, miR-302b, miR-302bMut in Reporterfibroblasten und Mock in 3T3-WT. Von Tag 0 bis 9 wurden täglich die Zellen einer Kavität pro Gruppe vereinzelt und durchflusszytometrisch untersucht. Quelle der Grafik: BD LSR II [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com) mit Modifikationen.

Nach entsprechendem Gating der Rohdaten wurden lediglich singuläre, lebende Zellen weiteranalysiert. Dann wurden über die Fluoreszenzintensität GFP-positive und GFP-negative Objekte definiert, wie in **Abb. 17** verdeutlicht.

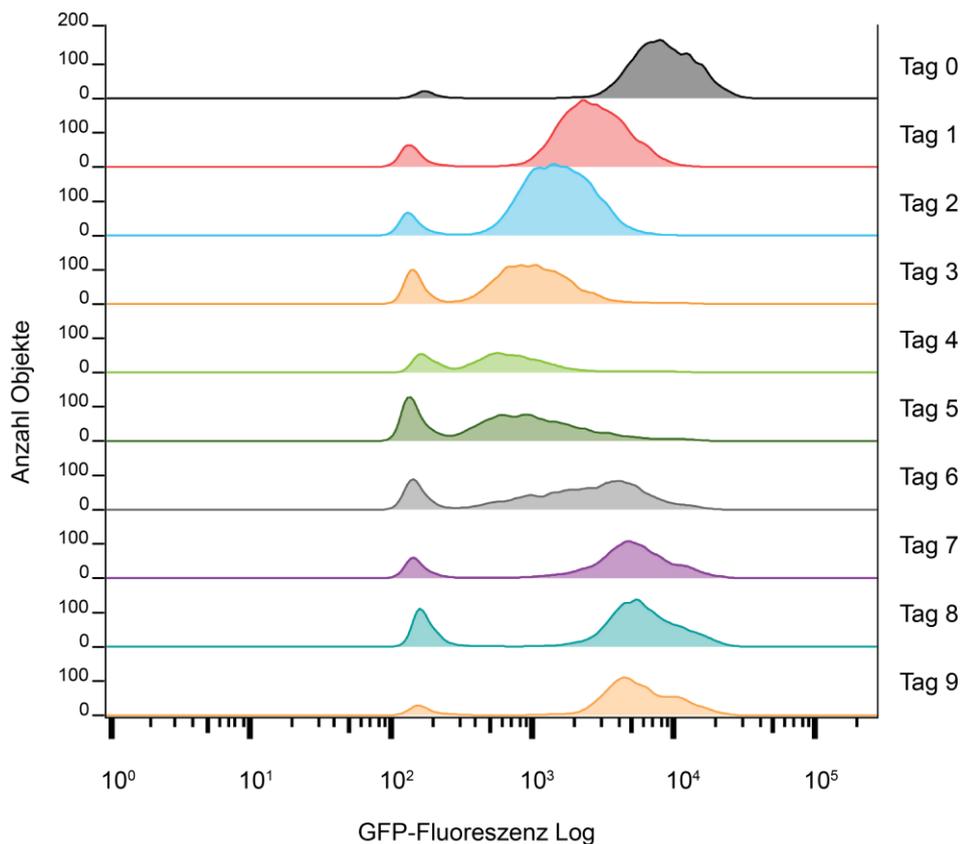


**Abb. 17: Durchflusszytometrisches Zell-Gating über die GFP-Fluoreszenzintensität**  
 In dieser exemplarischen Darstellung ist die GFP-Fluoreszenzintensität gegenüber der APC-A Intensität aufgetragen. Die APC-Intensität dient der besseren Darstellbarkeit der Punktwolke. Die rote und blaue Population entspricht mit miR-302b transfizierten GFP-302-Sponge-Reporterfibroblasten. Diese werden als GFP-positiv gegatet. Rot = Population vor Transfektion. Blau = Tag 3 nach Transfektion. Die orange Zellpopulation entspricht der Negativkontrolle (Mock transfizierte 3T3-WT-Fibroblasten am Tag 3).

Im GFP-positiven Gate befinden sich Reporterfibroblasten, sowohl zum Zeitpunkt der vollen GFP-Expression als auch der maximalen Repression am Tag 4 nach Mimic-Transfektion (**Abb. 17**). Im GFP-negativen Gate befinden sich lediglich die Wildtyp 3T3-Fibroblasten ohne GFP-Reporter. Die bei letzteren Zellen gemessene GFP-Fluoreszenzintensität entspricht der Hintergrundaktivität des Kanals und ist um den Faktor 200 – 2000 geringer als die der Reporterzellen.

In **Abb. 18** ist die GFP-Fluoreszenz für die mit miR-302b transfizierten Reporterfibroblasten im Zeitverlauf als Histogramm dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Hauptpopulation der Reporterfibroblasten eine GFP-Fluoreszenz von 10 000 arbitrary units (a.u.) aufweist. Am Tag 4 nach Transfektion ist die Fluoreszenzintensität der Reporterfibroblasten um den Faktor 10 geringer.

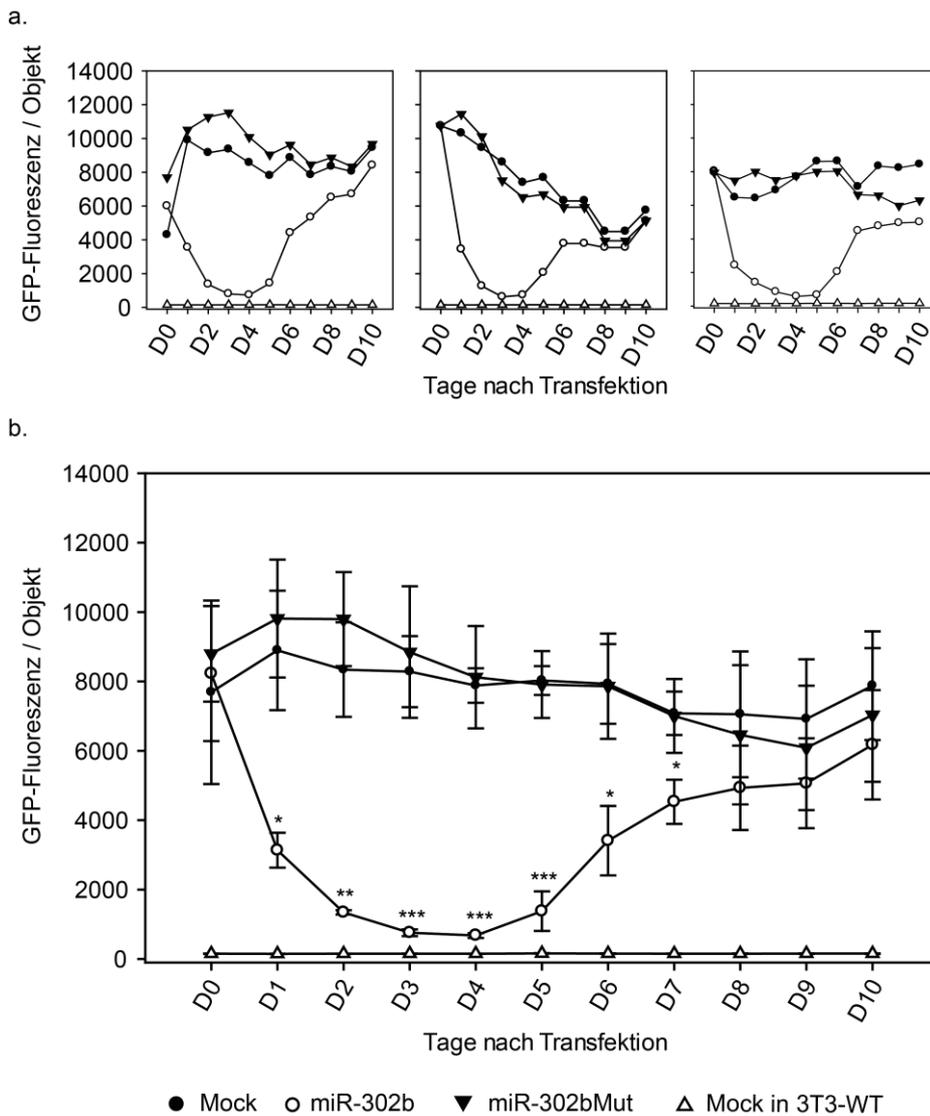
Eine Subpopulation der Reporterfibroblasten weist eine Fluoreszenz von nur 100 a.u. auf, sie ist also um den Faktor 100 geringer als zum Zeitpunkt der maximalen Repression. Die Ursache für die Entstehung dieser Subpopulation ist unklar.



**Abb. 18: GFP-Fluoreszenz miR-302b-transfizierter Reporterfibroblasten (Histogramm)**  
 Durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl von Einzelzellen aufgeschlüsselt nach ihrer GFP-Fluoreszenzintensität am Tag 0 bis 9 nach Transfektion von miR-302b in GFP-302-Sponge-Reporterfibroblasten. Exemplarisches Histogramm der 3. Versuchswiederholung.

In der quantitativen Auswertung aller Versuchswiederholungen zeigt sich ab Tag 1 *post transfectionem* eine Abnahme der GFP-Fluoreszenz. Das Maximum der Repression des Reporters ist am Tag 4 erreicht, hier ist die GFP-Fluoreszenz um den Faktor 10 geringer als am Tag 0. Danach kommt es zu einer raschen Zunahme der Fluoreszenzintensität, welche sich bereits am Tag 7 wieder nahezu auf Ausgangsniveau befindet (**Abb. 19a**).

Auch nach Mittelung der 3 Einzelversuche zeigte sich eine deutliche Reduktion der GFP-Fluoreszenz für die mit miR-302 transfizierten Reporterfibroblasten ab Tag 1 *post transfectionem*. Nach maximaler Repression an Tag 4 (8-fache Verringerung) stieg die Fluoreszenzintensität wieder deutlich an. Die maximale Repression der GFP-Fluoreszenz war zwischen Tag 2 und Tag 5 zu beobachten (**Abb. 19b**).



**Abb. 19: Zeitverlauf der GFP-Fluoreszenz nach Transfektion von miR-302b in MEFs**  
 Durchflusszytometrische Bestimmung der medianen GFP-Fluoreszenzintensität pro Objekt / Einzelzelle auf der Y-Achse über den jeweiligen Tag nach Transfektion (X-Achse). a. Ergebnisse der drei unabhängigen Einzelversuche des Sponge-Experimentes. b. Mittelwerte der drei unabhängigen Einzelversuche. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

Diese Ergebnisse machen erneut deutlich, dass die Wirkung von Mimics transient ist. Gemäß durchflusszytometrischer Messungen liegt der Aktivitätszeitraum zwischen Tag 1 und Tag 7 nach Transfektion, mit maximaler Wirkung zwischen Tag 2 und Tag 5. Diese Resultate stimmen mit den fluoreszenzmikroskopischen Ergebnissen aus Kapitel **E1.1** weitgehend überein. Es ist also davon auszugehen, dass die Wirkdauer der eingesetzten Mimics bei etwa 7 Tagen liegt und somit kürzer ist als die Dauer der nachfolgend geplanten Reprogrammierungsexperimente.

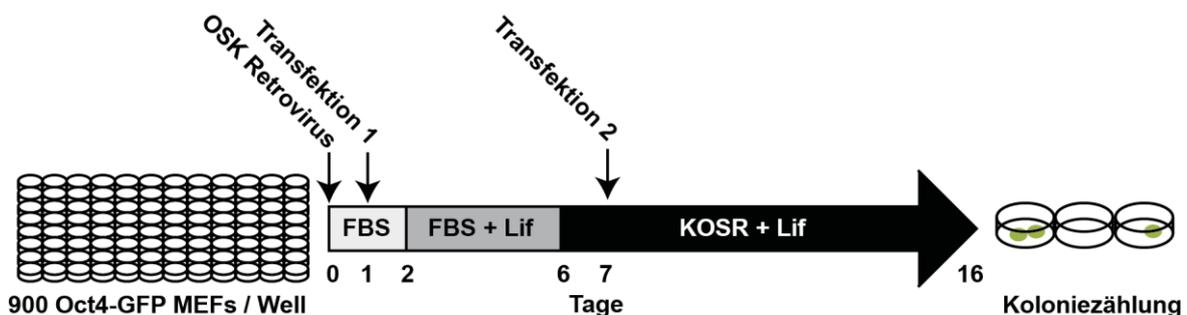
## E 2 OSK-Reprogrammierung mit miRNA-Mimics

Die Reprogrammierungstechnik von Takahashi und Yamanaka zur Generierung von iPSCs sollte im eigenen Labor reproduziert und mit der Transfektion von miRNAs ergänzt werden, um deren Einfluss auf diesen Prozess zu untersuchen. Wir verwendeten hierfür MEFs und das modifizierte Reprogrammierungsprotokoll ohne MYC, da dieses wegen der langsameren, aber konsistenteren Kinetik besonders geeignet ist, um mögliche *Enhancer* zu identifizieren.

Zu Beginn der Arbeiten war bekannt, dass Mitglieder der ESCC-Familie, wie miR-294 und miR-302, den Reprogrammierungsvorgang in Zellen verstärken können. In silico Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe ergaben Hinweise, dass auch Mitglieder der miR-181-Familie ähnliche Effekte aufweisen könnten.

### E 2.1 OSK-Reprogrammierung mit ESCC- und 181-miRNAs

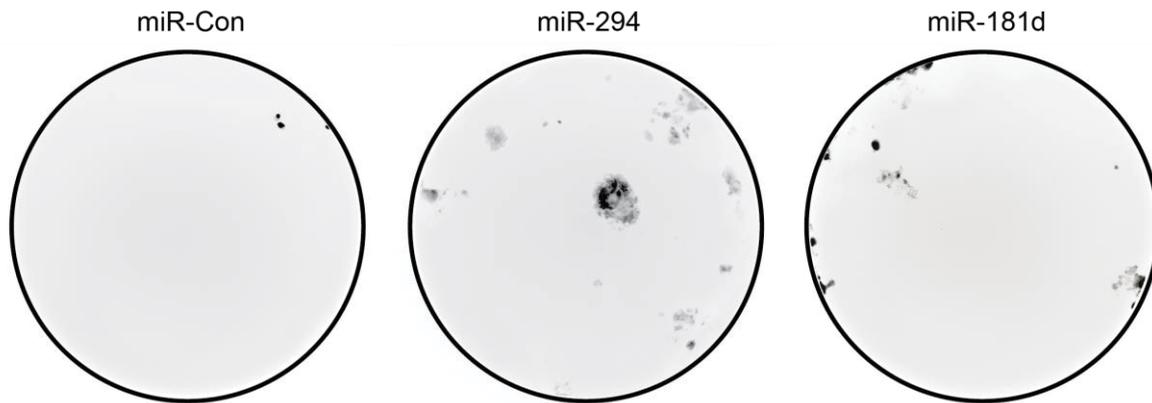
Die ersten Experimente erfolgten mit miR-294, miR-302b und miR-181a/c/b/d sowie Kontroll-Mimics mit einer unspezifischen *Seed*-Sequenz (miR-Con). Für die Reprogrammierung wurden die MEFs in einer 96-Well-Platte ausplattiert und gemäß dem Schema in **Abb. 20** behandelt.



**Abb. 20: Schema der Reprogrammierung von MEFs zu iPSCs**

MEFs wurden in 96-Well-Platten ausplattiert und am Tag 0 mit retrovirushaltiger Lösung transduziert. Am Tag 1 und Tag 7 erfolgte die Transfektion von Mimics. Je Mimic wurde ein Kavitäten-Triplet transfiziert. Die Zusammensetzung der Medien wurde wie gezeigt verändert, das Medium täglich erneuert. Am Tag 16 wurden die erhaltenen Kolonien fluoreszenzmikroskopisch auf GFP-positive Kolonien untersucht. Bildmaterial Judson et al., 2013 mit Modifikationen [2].

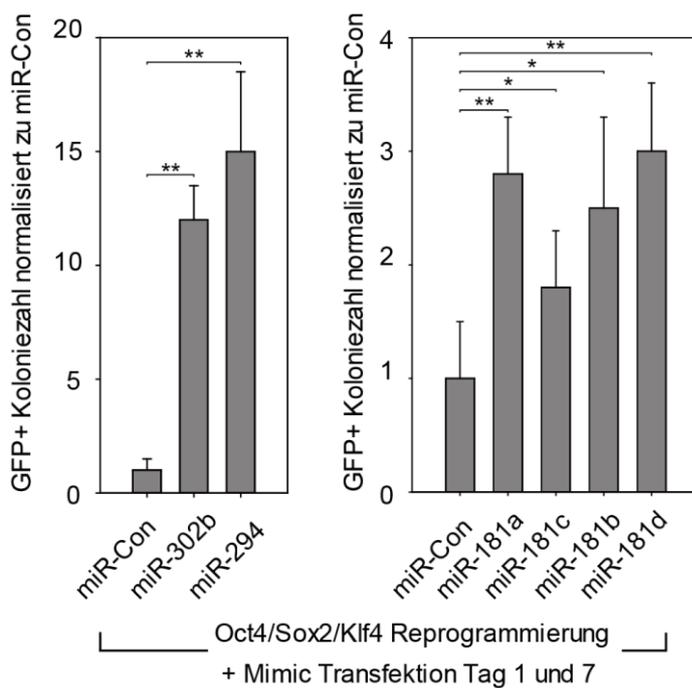
Für den ersten Teil des Experimentes wurden die Mimics an Tag 1 nach Beginn der Reprogrammierung transfiziert. Entsprechend der Vorergebnisse zur Wirkdauer der Mimics wurde die Transfektion am Tag 7 wiederholt. Am Tag 16 wurde die 96-Well-Platte mittels HCl-Fluoreszenzmikroskopie untersucht (**Abb. 21**).



**Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung potenzieller iPSC-Kolonien**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von 3 exemplarisch ausgewählten Kavitäten einer 96-Well-Platte am Tag 16 nach Beginn der OSK-Reprogrammierung und Transfektion der genannten Mimics. Dunkle Bereiche entsprechen entstandenen Kolonien putativer iPSCs mit hoher GFP-Fluoreszenz (schwarz) nach Reaktivierung des endogenen Oct4-GFP-Lokus. Rohaufnahmen im GFP-Filter (514nm).

Bei der nachfolgenden quantitativen Analyse wurde die Anzahl GFP-positiver Kolonien pro Kavität bestimmt und auf die Anzahl GFP-positiver Kolonien in der Kontrollgruppe (miR-Con) normiert (**Abb. 22**).



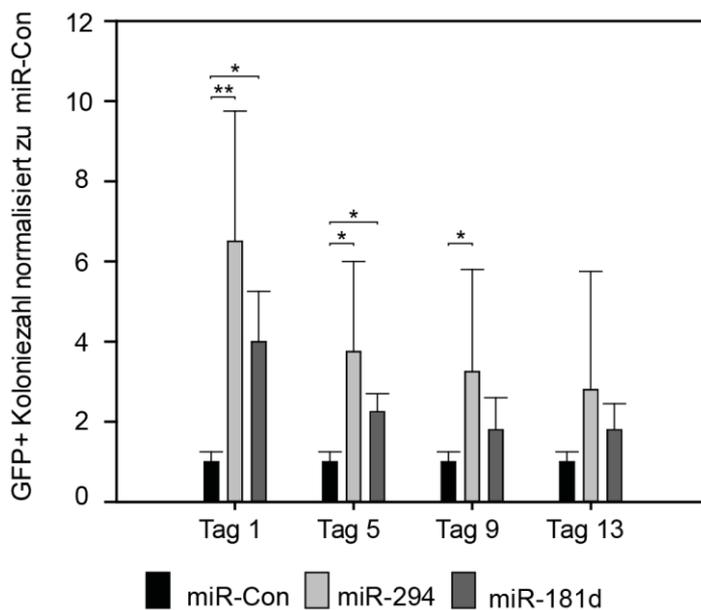
**Abb. 22: Reprogrammierungs-Effizienz bei Mimic-Transfektion an Tag 1 und 7**

Nach Einleitung der OSK-Reprogrammierung in MEFs am Tag 0 wurden Mimics am Tag 1 und 7 transfiziert und die Kavitäten am Tag 16 HCl-fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines biologischen Triplikats. Die Zahl GFP-positiver (GFP+) Kolonien ist auf die Kontroll-Mimic (miR-Con) normalisiert. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

Die Transfektion von miR-294, miR-302b wie auch miR-181a, miR-181c, miR-181b und miR-181d führte im Vergleich zu miR-Con zu einer signifikant höheren Anzahl GFP-positiver Kolonien. Dabei war der verstärkende Effekt auf die Reprogrammierung mit ESCC-Mimics (11 – 15-fach) höher als mit miR-181-Mimics (1,8 – 3-fach). Die jeweils deutlichsten Zunahmen waren pro Familie mit miR-294 bzw. miR-181d zu verzeichnen (**Abb. 22**). Daher wurden diese miRNAs für weitere, eingehende Studien ausgewählt.

## E 2.2 Mimic-Transfektion in früher und später Phase der Reprogrammierung

Um zu überprüfen, in welcher Phase der Reprogrammierung die miRNAs den größten Effekt ausüben, wurde ein Zeitverlaufs-Experiment durchgeführt. Hierfür wurden Mimics während der OSK-Reprogrammierung entweder am Tag 1, 5, 9 oder 13 transfiziert und wiederum an Tag 16 mittels HCI-Fluoreszenzmikroskopie die Anzahl GFP-positiver Kolonien bestimmt. Dabei hatten miR-294 und miR-181d den jeweils größten Effekt auf die Reprogrammierungsrate im Vergleich zur Kontrolle, wenn sie am Tag 1 transfiziert wurden (6,5-fach bzw. 4-fach). Bei Transfektion am Tag 5 nahm der Effekt ab (3,75-fach bzw. 2,25-fach). Am Tag 9 zeigte sich für miR-294 weiterhin eine signifikante Steigerung der Reprogrammierungsrate (3,25-fach), nicht jedoch für miR-181d (1,8-fach). Bei Transfektion am Tag 13 zeigte sich für beide miRNAs keine signifikant erhöhte Reprogrammierungsrate mehr (2,8-fach, 1,8-fach) (Abb. 23).



**Abb. 23: Reprogrammierungseffizienz bei Mimic-Transfektion an Tag 1, 5, 9 oder 13**

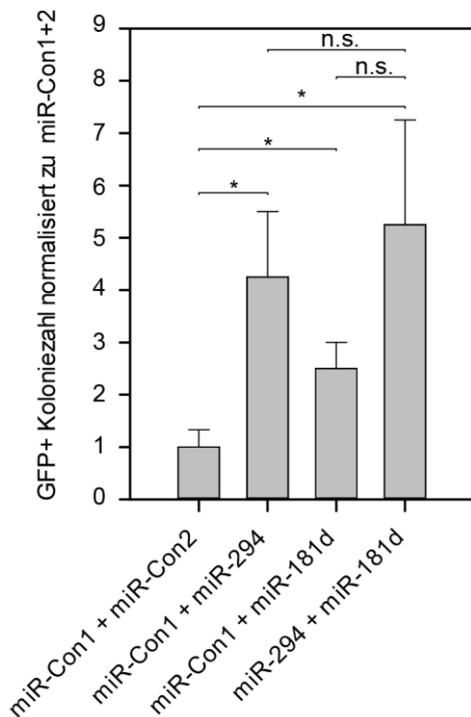
Nach Einleitung der OSK-Reprogrammierung in MEFs am Tag 0 wurden die Mimics entweder am Tag 1, 5, 9 oder 13 transfiziert und am Tag 16 HCI-fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die Anzahl GFP-positiver (GFP+) Kolonien ist auf die Kontroll-Mimic (miR-Con) normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines biologischen Triplikats. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass miR-294 und miR-181d in der Initialphase der Reprogrammierung wirksamer sind als in der Maturationsphase.

## E 2.3 Kombinierte Transfektion von miR-294 und miR-181d

Um potenziell additive oder synergistische Effekte von miR-294 und miR-181d zu untersuchen, wurden immer zwei Mimics in äquimolarer Menge am Tag 1 nach Beginn der OSK-Reprogrammierung in MEFs transfiziert. Hierbei wurden entweder zwei Kontroll-Mimics (miR-Con1 und miR-Con2) oder jeweils miR-Con1 mit miR-294 oder miR-181d bzw. miR-294 mit miR-181d kombiniert. Die Resultate zeigten zwar die Tendenz zu einer höheren

Reprogrammierungsrate für die kombinierte Transfektion von miR-294 und miR-181d ( $5,25 \pm 2$ -fach) gegenüber der Transfektion von miR-Con1 und miR-294 ( $4,25 \pm 1,25$ -fach) bzw. miR-Con1 und miR-181d ( $2,5 \pm 0,5$ -fach). Allerdings war der Unterschied nicht statistisch signifikant (**Abb. 24**).



**Abb. 24: Reprogrammierungs-Effizienz bei kombinierter Mimic-Transfektion**

Nach Einleitung der OSK-Reprogrammierung in MEFs am Tag 0 wurden am Tag 1 entweder zwei Mimic-Kombinationen kotransfiziert: (a) 2 Mimics mit unspezifischen Seed-Sequenzen (miR-Con1 + miR-Con2) (b) miR-Con1 mit miR-294 (c) miR-Con1 mit miR-181d und (d) miR-294 mit miR-181d. Die Normierung erfolgte auf die Kotransfektion von miR-Con1 & miR-Con2. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines biologischen Triplikats. \*  $P < 0,05$ ; n.s. nicht signifikant.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Kotransfektion von miR-294 und miR-181d in MEFs keine eindeutigen additiven oder synergistischen Effekte auf die OSK-Reprogrammierungseffizienz zur Folge hat.

## E 2.4 Verifikation der Pluripotenz erhaltener iPSC-Linien

Die erfolgreiche, experimentelle Reprogrammierung der MEFs wurde grundsätzlich anhand der Aktivierung des endogenen *Oct4-GFP*-Lokus in den Zellen analysiert. Dennoch sollten zur Verifizierung der Pluripotenz der so erzeugten putativen iPSCs weitere Tests erfolgen.

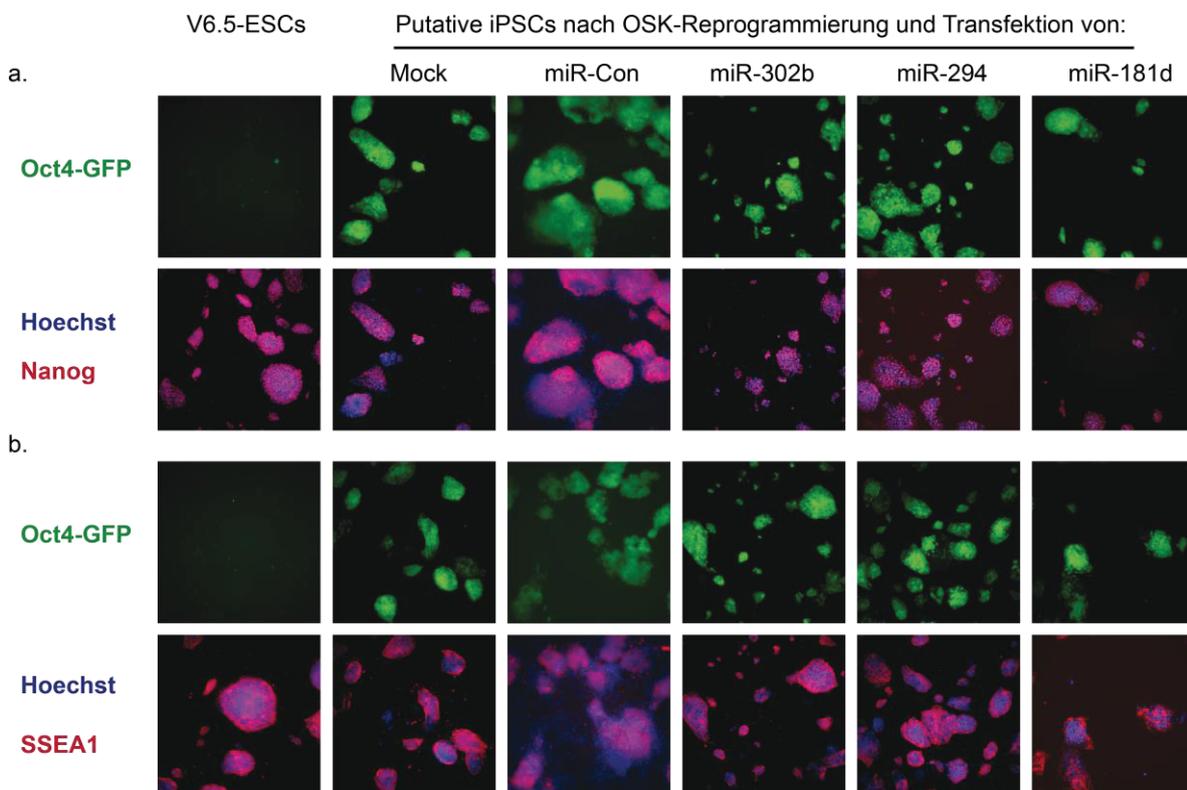
### E 2.4.1 Expression der Pluripotenzfaktoren Nanog und SSEA1

Es wurden zunächst immunhistochemische Färbungen von Oct4-positiven Kolonien nach OSK-Reprogrammierung mit den Mimics miR-Con, miR-302b, miR-294 und miR-181d in Passage 3 nach Koloniepicking angefertigt. Als Negativkontrolle diente eine ESC-Linie ohne endogenen *Oct4-GFP*-Lokus (V6.5-ESC).

Für den Nachweis der Pluripotenzmarker Nanog und SSEA1 wurden die zu untersuchenden Zellen am Tag 16 nach Beginn der OSK-Reprogrammierung in der 96-Well-Mikrotiterplatte

fixiert. Für den Nanog-Primärantikörper wurden die Zellen neben der ersten Fixation und vor der Blockierung in Methanol bei -20°C für 5 min refixiert. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, die nukleäre Gegenfärbung und die manuelle qualitative fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgten wie im Methodenteil beschrieben

In der Mikroskopie wiesen die Kolonien der ESCs und iPSC-Linien eine für sie jeweils typische Morphologie auf. Der immunzytochemische Nachweis zeigte, dass alle untersuchten iPSC-Linien eine Expression von GFP vom endogenen *Oct4-GFP*-Lokus sowie von Nanog und SSEA1 aufwiesen, wie es bei pluripotenten Stammzellen zu erwarten war. Die Kontroll-ESCs zeigten erwartungsgemäß keine GFP-Expression auf, wohl aber eine von Nanog und SSEA1. Die Expressionsmuster für Nanog und SSEA1 stimmten bei Wildtyp ESC-Linie und iPSCs überein (**Abb. 25**).



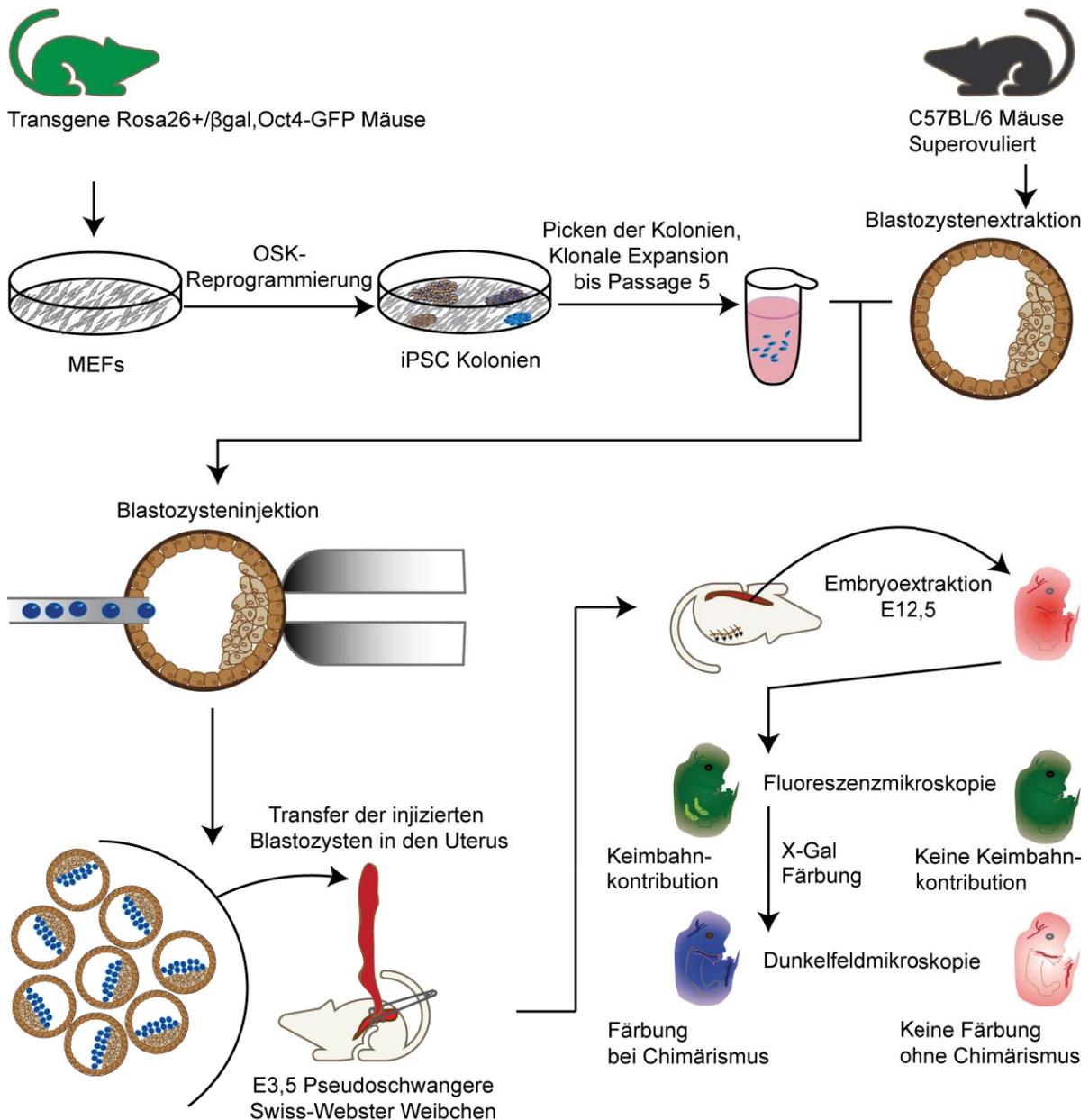
**Abb. 25: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Pluripotenzmarker-Expression**

Untersucht worden sind putative iPSCs aus *Oct4-GFP*-MEFs nach OSK-Reprogrammierung und Mimic-Transfektion sowie nicht-behandelte Kontroll-ESCs (V6.5-ESCs) ohne endogenen *Oct4-GFP*-Lokus. a. GFP-Fluoreszenz vom endogenen Locus. Darunter immunzytochemische Färbung mit Nanog-Primärantikörper und nukleäre Gegenfärbung mit Hoechst b. GFP-Fluoreszenz vom endogenen Locus. Darunter immunzytochemische Färbung mit SSEA1-Primärantikörper und nukleäre Gegenfärbung. Bildmaterial Judson et al., 2013 mit Modifikationen [2].

Diese Resultate lassen vermuten, dass sich die unter Mimic-Transfektion generierten iPSCs und native ESCs was die Expression typischer Pluripotenzfaktoren betrifft nicht wesentlich voneinander unterscheiden.

## E 2.4.2 Chimärismus und Keimbahnkontribution

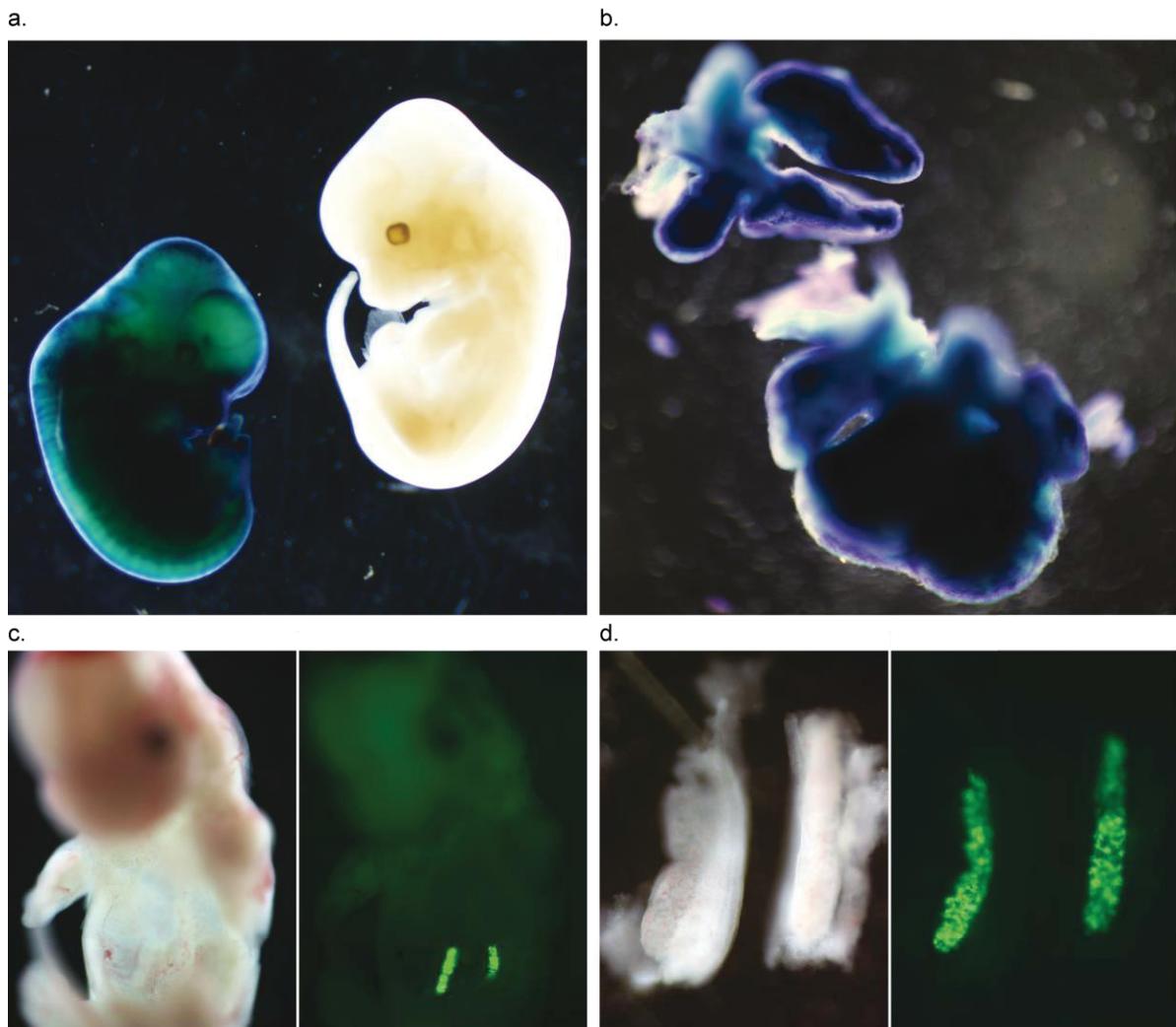
Im nächsten Schritt wurde verifiziert, ob die unter Mimic-Transfektion reprogrammierten Stammzellen tatsächlich auch fähig sind, keimbahnfähige, chimäre Nachkommen zu produzieren, wenn sie künstlich in die Blastozyste injiziert werden. Dies gilt als einer der stringentesten Verifikationstests für die Pluripotenz. Hierfür wurden je eine mit miR-302b und miR-294 reprogrammierte Zelllinie sowie 3 mit miR-181d reprogrammierte Zelllinien in E3,5 Blastozyten von C57BL/6 Mäusen injiziert. Nach intrauterinen Blastozystentransfer wurden die E12,5-Embryos fluoreszenzmikroskopisch hinsichtlich der Oct4-GFP-Expression der Genitalleiste (Test auf Keimbahnkontribution) untersucht. Anschließend erfolgte die X-Gal Färbung und der dunkelfeldmikroskopische Nachweis der Beteiligung der iPSC-Linien an der Entstehung aller 3 Keimblätter (Chimärismus) (**Abb. 26**).



**Abb. 26: Schema der Blastozysteninjektion und der Prüfung auf Chimärismus**

MEFs aus Rosa26<sup>+/βgal</sup>, Oct4-GFP-Mäusen wurden mittels OSK-Reprogrammierung unter Transfektion von miR-302, miR-294 oder miR-181d in zu verifizierende putative iPSCs überführt. Nach Kolonie-Picking und klonaler Expansion bis Passage 5 erfolgte die Vereinzelung durch Trypsinierung. Aus superovulierten C57BL/6 wurden Blastozysten entnommen und je Blastozyste 10 – 15 iPSCs injiziert. Hiernach erfolgte der intrauterine Transfer von 8 Blastozysten in ein E3,5 pseudoschwangeres Swiss-Webster Weibchen. An E12,5 erfolgte die Embryoextraktion und Fluoreszenzmikroskopie. Im Falle einer Keimbahnbeitrügung zeigen die Gonaden eine kräftige Fluoreszenzintensität bei gonadal aktiviertem Oct4-GFP-Lokus. Über den Rosa26<sup>+/βgal</sup>-Lokus wird β-Galaktosidase exprimiert, wodurch sich die Chimären bei der nachfolgenden X-Gal Färbung kräftig blau färben.

Die Resultate dieser Untersuchungen belegten für alle getesteten iPSC-Linien die Fähigkeit zur Ausbildung chimärer Organismen (**Abb. 27a**). Dies bestätigten auch Analysen des Darmtraktes der untersuchten Embryos (**Abb. 27b**). Ebenso zeigten alle iPSC-Linien eine Beteiligung der Keimbahn, was sich in Form der fluoreszierenden Gonaden erkennen ließ (**Abb. 27c,d**).



**Abb. 27: Mikroskopische Analyse des Chimärismus in E12,5-Embryos**

a. Dunkelfeldmikroskopische Darstellung zweier X-Gal gefärbter E12,5-Embryos aus C57BL/6-Blastozysten. Links nach Blastozysteninjektion mit OSK+miR-181d-generierten iPSCs welche aus MEFs von Rosa26<sup>+βgal</sup>, Oct4-GFP-transgenen Mäusen gewonnen wurden. Rechter Embryo aus nicht injizierter Blastozyste. b. Dunkelfeldmikroskopische Darstellung von X-Gal-gefärbtem Herz und Lunge der in a. gezeigten E12,5 Chimäre. c. Dunkelfeldmikroskopische (links) und GFP-fluoreszenzmikroskopische (rechts) Aufnahme einer ungefärbten E12,5-Chimäre. Deutliche Fluoreszenz der Genitalleiste durch aktive Oct4-GFP Produktion. d. Vergrößerung von c. Bildmaterial Judson et al., 2013 mit Modifikationen [2].

Der Nachweis, dass iPSCs, die unter Transfektion von Mimics generiert wurden, chimäre Nachkommen hervorbringen und an der Ausbildung der Keimbahn beteiligt sind, ist der funktionell stringenteste Beweis für die Pluripotenz dieser Zellen.

### E 2.4.3 Chromosomenanalyse

In Stammzellen ist das Vorliegen eines korrekten Chromosomensatzes ein weiteres Kriterium für Pluripotenz. Die unter Transfektion von miR-294 und miR-181d reprogrammierten Zellen wurden hierfür karyotypisiert. Wie in Tabelle 10 gezeigt, wurde für 4 unabhängige iPSC-Linien die Anzahl an Chromosomen gezählt. Aufgelistet sind die prozentualen Anteile der Zellen, die einen korrekten Satz von 40 Chromosomen aufwiesen und solche mit einer davon abweichenden Anzahl. Es zeigte sich, dass über 80% der Zellen jeder Linie die

korrekte Anzahl an Chromosomen enthielten.

Zelllinie	Reprogrammierung mit	Passage	% Zellen 40 Chromosomen	% Zellen > 40 Chromosomen	% Zellen < 40 Chromosomen
iPSC 23-1	OSK + miR-294	5	84	0	16
iPSC 2-2	OSK + miR-181d	7	87	0	13
iPSC 76-14	OSK + miR-181d	8	83	5	12
iPSC 77-4	OSK + miR-181d	9	83	0	17

**Tabelle 10: Karyotypisierung der durch OSK-Reprogrammierung und miR-181d erzeugten iPSCs**

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse aus Untersuchungen mit drei verschiedenen experimentellen Ansätzen übereinstimmend, dass sich die unter Mimic-Transfektion reprogrammierten Fibroblasten hinsichtlich Pluripotenz funktionell nicht von ESCs unterscheiden.

### **E 3 Signalwegsanalyse in der Reprogrammierung mit miR-294 und miR-181d**

Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, inwiefern die für die Reprogrammierung eingesetzten Mimics, miR-294 und miR-181d, in den Zellen Einfluss auf den PI3K/Akt-Signalweg und den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg nehmen. Diese waren zuvor als potenzielle Targets identifiziert worden [2].

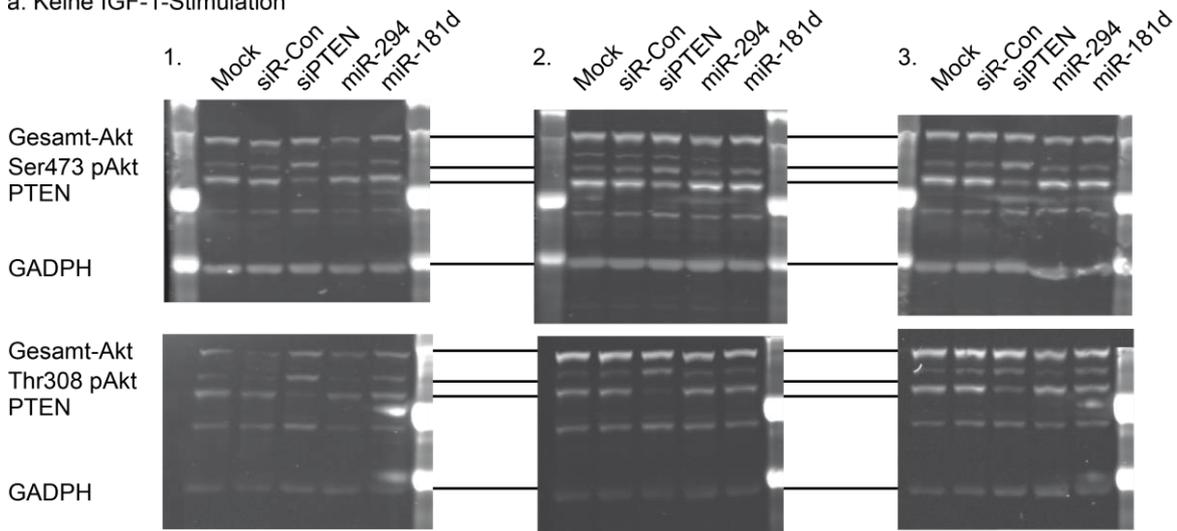
#### **E 3.1 Einfluss auf den PI3K/Akt-Signalweg**

Eine potenzielle Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges durch die Transfektion von miR-294 bzw. miR-181d während der OSK-Reprogrammierung wurde per Westernblot untersucht. Dabei wurden MEFs an Tag 0 mit OSK transduziert und am Tag 1 mit miR-294 bzw. miR-181d transfiziert. Als Kontrolle diente die Transfektion mit Mock (Transfektionsreagenz ohne Mimic) sowie siR-Con (einer Kontroll-siRNA mit einer abberanten *Seed*-Sequenz) und siPTEN (eine siRNA die spezifisch PTEN inhibiert). Am Tag 2 nach Beginn der OSK-Reprogrammierung wurde das Medium durch MEF-Medium ohne FBS ausgetauscht, um darin enthaltene Aktivoren des PI3K/Akt-Signalweges zu entfernen. Die Lyse der Zellen erfolgte 72 – 86 h nach retroviraler Transduktion (Tag 3). 5 min vor der Lyse erfolgte in einem Versuchsarm eine Stimulation mit 6 nM IGF-1 für 5 min in FBS-freiem Medium.

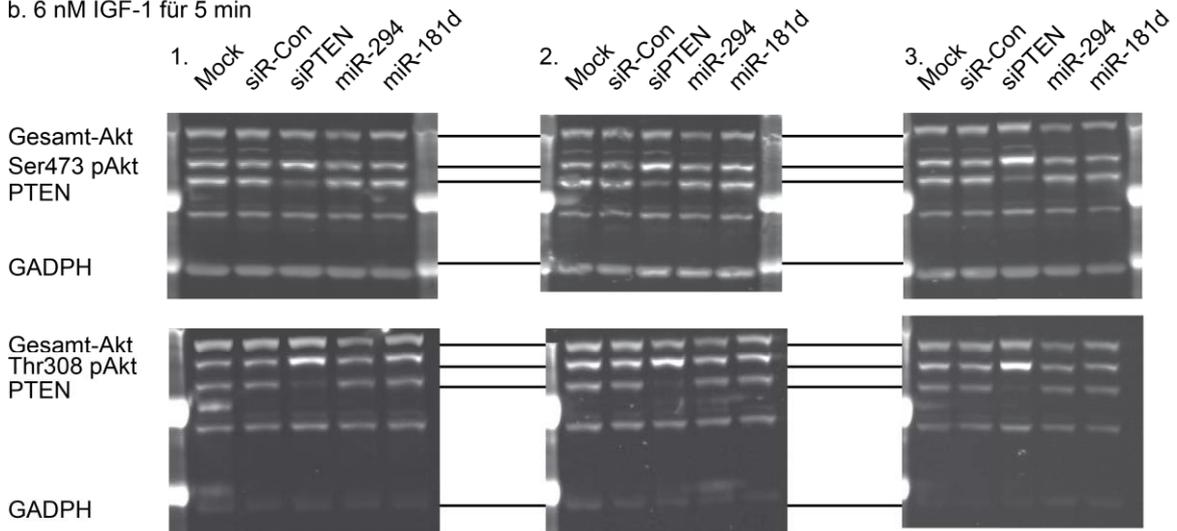
Für den Westernblot wurde zur Darstellung der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges das gesamte PI3K/Akt-Protein (Gesamt-Akt) sowie zwei Varianten einer aktivierten Form von Akt bestimmt, dem an Serin (473) und Threonin (308) phosphorylierten Akt (Ser437- und Thr308-phospho-Akt). Daneben wurde ein Antikörper gegen PTEN sowie zur Normierung ein GAPDH-Antikörper verwendet.

Die Intensitätswerte der erhaltenen Banden wurden für jede Kavität auf GAPDH abgeglichen. Weiterhin wurden die einzelnen Kavitäten auf siR-Con normiert. Ein experimentelles Triplet ist in **Abb. 28** dargestellt. Zu sehen sind hier akquirierte Bilder des Flachbett-Fluoreszenzscanners, welcher die Intensität der im Nahinfrarotspektrum fluoreszierenden Sekundärantikörper ausliest.

a. Keine IGF-1-Stimulation



b. 6 nM IGF-1 für 5 min



**Abb. 28: Westernblot-Analyse des PI3K/Akt-Signalweges**

a. Westernblot von Zelllysaten aus MEFs nach Beginn der OSK-Reprogrammierung unter Transfektion von Mock, siR-Con, siPTEN, miR-294 und miR-181d. Aushungern der Zellen durch Kultivierung in FBS-freiem Medium ab Tag 2. Lyse der partiell reprogrammierten MEFs am Tag 3. Bestimmung von Gesamt-Akt, Ser473 pAkt, Thr308 pAkt, PTEN und GAPDH. b. Westernblot-Ansatz wie in a. mit IGF-1-Stimulation für 5 min vor Lyse der Zellen. Gezeigt sind experimentelle Triplets.

Die Blots aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen wurden über die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität semiquantitativ ausgewertet (**Abb. 29**). Dabei wurde die Blotintensität der phosphorylierten Akt-Formen ins Verhältnis zu der von Gesamt-Akt gesetzt.

Der Anteil des aktivierten, an Ser473 phosphorylierten Akt war unter Transfektion von siPTEN mit (2,26-fach;  $P < 0,001$ ) und ohne (2,68-fach;  $P = 0,02$ ) IGF-1-Stimulation

signifikant erhöht gegenüber siR-Con. Unter Transfektion von miR-294 war der Unterschied der Menge an Ser473 phospho-Akt nur unter IGF-1-Stimulation signifikant gegenüber siR-Con erhöht (1,79-fach; P = 0,002) (**Abb. 29a,b**).

Der Anteil des über Phosphorylierung an Thr308 aktivierten Akt war unter Transfektion von siPTEN nur unter IGF-1-Stimulation signifikant erhöht gegenüber siR-Con (2,24-fach; P = 0,007). Dies traf auch auf miR-294 zu, wo sich ein Unterschied ebenfalls nur unter IGF-1-Stimulation zeigte (1,56-fach; P = 0,002) (**Abb. 29c,d**).

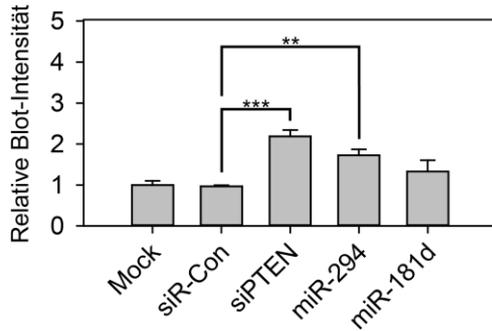
Die Menge des Gesamt-Akt Proteins war unter miR-294 Transfektion verringert. Dies war aber nur ohne IGF-1-Stimulation signifikant (0,54-fach; P = 0,017) (**Abb. 29e,f**).

Die Menge des Akt-Inhibitors PTEN war unter OSK-Reprogrammierung und Transfektion mit siRNA gegen PTEN (siPTEN) deutlich vermindert im Vergleich zu siR-Con – und dies sowohl mit IGF-1-Stimulation (0,29-fach; P = 0,039) als auch ohne (0,15-fach; P = 0,003). PTEN war unter Transfektion von miR-294 unter IGF-1-Stimulation um den Faktor 0,67 reduziert im Vergleich zu siR-Con. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (**Abb. 29g,h**).

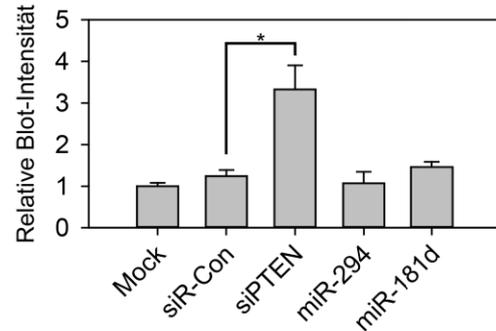
Die OSK-Reprogrammierung mit miR-181d führte weder mit noch ohne IGF-1-Stimulation zu einer signifikanten Änderung des PTEN-Levels, des Gesamt-Akt Levels oder der prozentualen Anteile von Thr308 phospho-Akt und Ser473 phospho-Akt zu Gesamt-Akt (**Abb. 29**).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass im Kontext der OSK-Reprogrammierung durch Transfektion von miR-294 der PI3K/Akt-Signalweg zwar keine signifikant erhöhte Grundaktivität aufweist, jedoch unter Stimulation des Signalweges ein höheres Aktivitätsniveau resultiert, was sich in einer erhöhten Ratio zwischen phosphoryliertem Akt und Gesamt-Akt ausdrückt. Diese verstärkte Aktivierung unter Stimulationsbedingungen ist nicht ausschließlich PTEN-vermittelt, da die Expression dieses Akt-Inhibitors durch miR-294 nicht signifikant verändert wird.

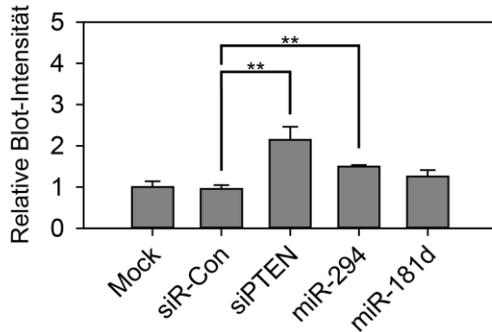
a. Ser473 phospho-Akt / IGF-1-Stimulation



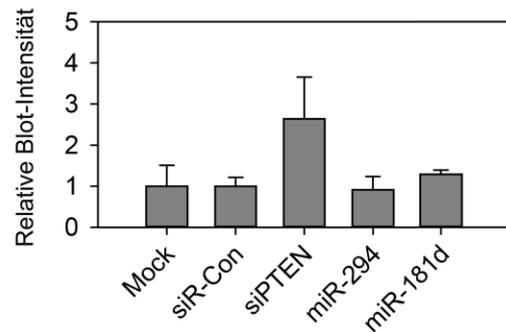
b. Ser473 phospho-Akt / Keine IGF-1-Stimulation



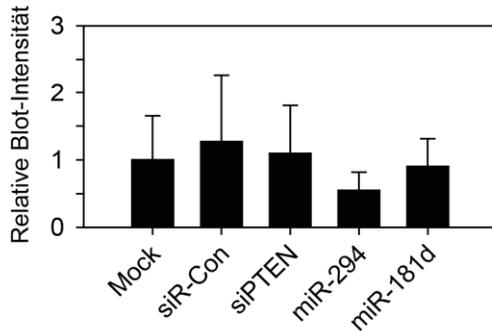
c. Thr308 phospho-Akt / IGF-1-Stimulation



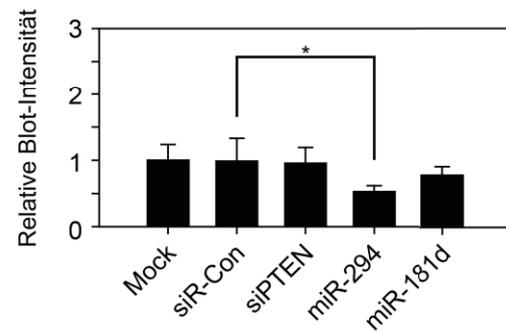
d. Thr308 phospho-Akt / Keine IGF-1-Stimulation



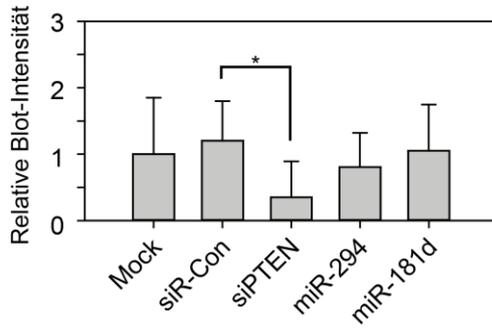
e. Gesamt-Akt / IGF-1-Stimulation



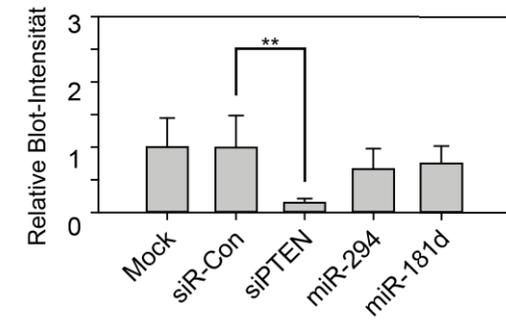
f. Gesamt-Akt / Keine IGF-1-Stimulation



g. PTEN / IGF-1-Stimulation



h. PTEN / Keine IGF-1-Stimulation



**Abb. 29: Quantitative Auswertung der Westernblots des PI3K/Akt-Signalwegs**

Gemessen wurde die Westernblot-Fluoreszenz der Komponenten des PI3K/Akt-Signalweges von drei unabhängigen Versuchsansätzen. Lyse der Zellen am 3. Tag nach Einleitung der OSK-Reprogrammierung und am 2. Tag nach Transfektion von Mock, siR-Con, siPTEN, miR-294 oder miR-181d (X-Achse). Die Kavitäten wurden einen Tag vor Lyse durch Zugabe neuen FBS-freien Mediums ausgehungert. Die Ansätze in der linken Spalte wurden 5 Minuten vor Lyse mit 6 nM IGF-1-haltiger Lösung stimuliert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Blot-Intensität ist normalisiert zu GAPDH und Mock. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

### E 3.2 Einfluss auf den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg

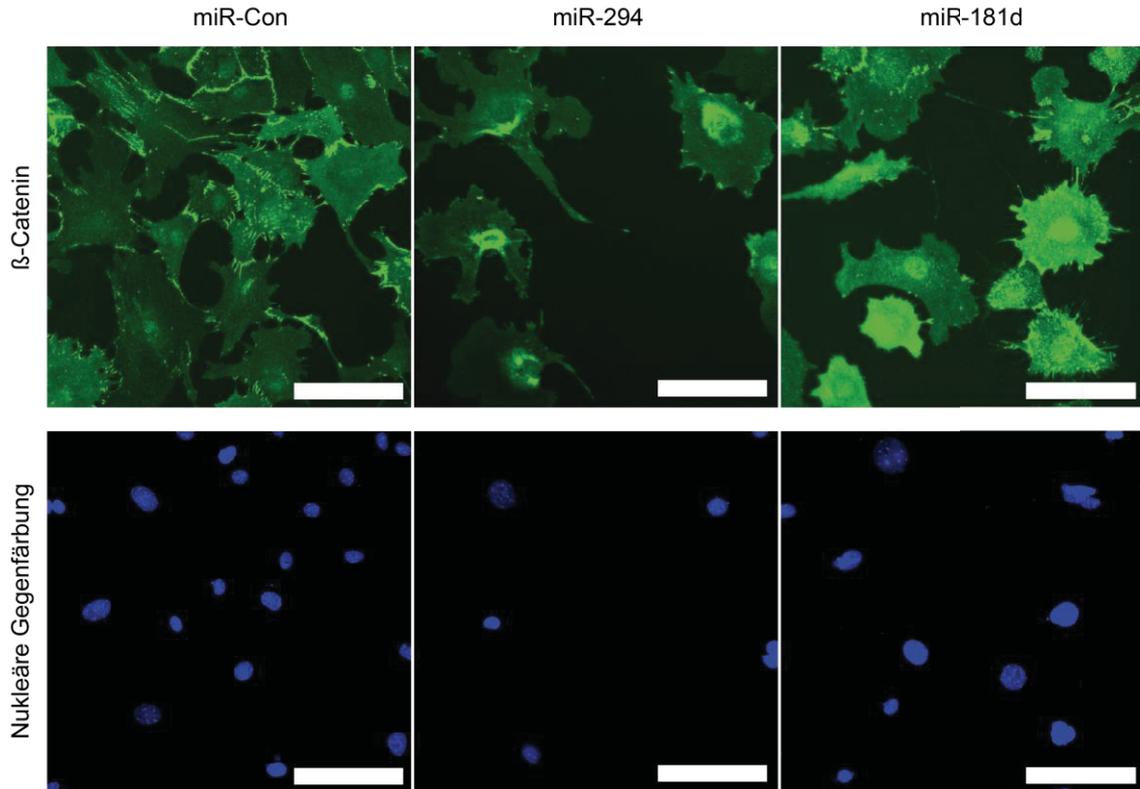
Im nächsten Experiment wurde ein möglicher Einfluss von miRNA-294 und miR-181d während der OSK-Reprogrammierung auf das Wnt/ $\beta$ -Catenin-*Signaling* untersucht. Hierfür wurden MEFs einer OSK-Reprogrammierung mit Transfektion von miR-294 oder miR-181d unterzogen. Als Kontrollen diente miR-Con sowie eine Mock-Transfektion.

Der Nachweis der zellulären Lokalisation von  $\beta$ -Catenin mittels HCl-Immunzytochemie erfolgte in einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte. Für jede untersuchte miRNA wurden die Zellen in 6 Kavitäten transfiziert, bei drei davon wurden dem Transfektionsansatz 50 ng/mL von rekombinantem Wnt3a zugegeben. 48 h nach der Transfektion (Tag 3 der OSK-Reprogrammierung) erfolgte die Fixierung und immunzytochemische Färbung mit einem  $\beta$ -Catenin-Primärantikörper und fluoreszierenden (488nm) Sekundärantikörper. Die nukleäre Gegenfärbung erfolgte mit Hoechst.

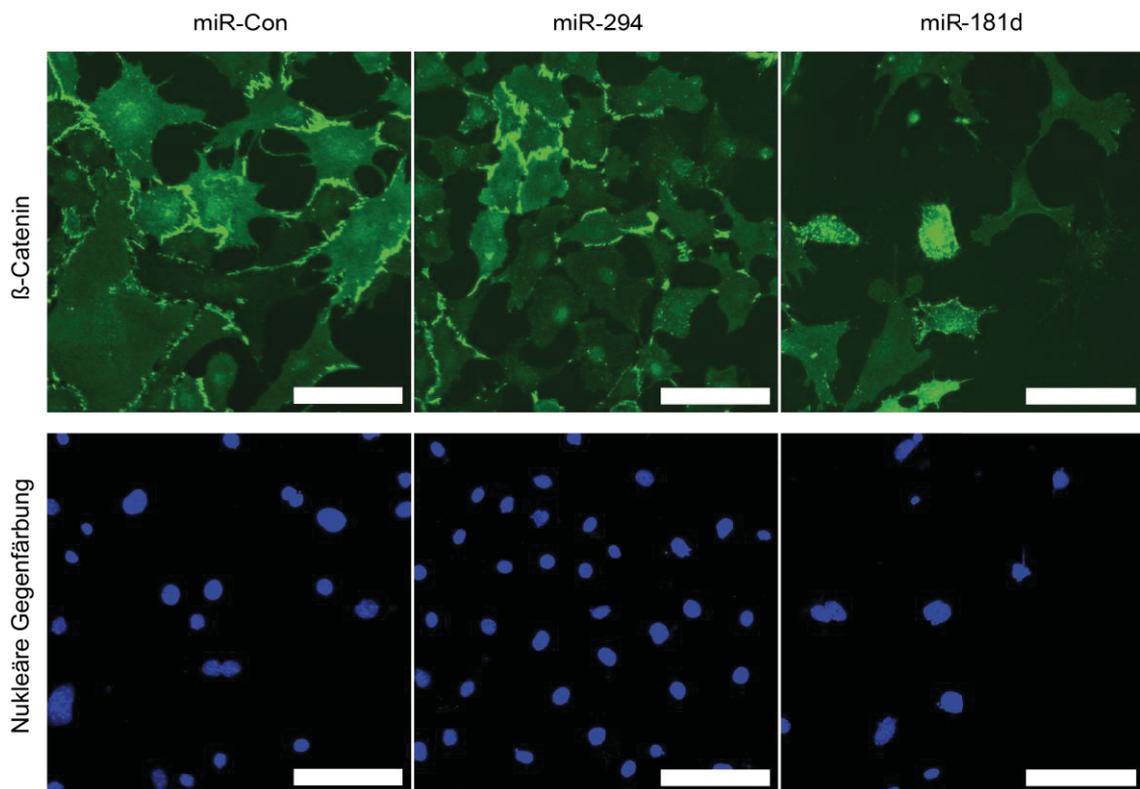
Zur quantitativen Auswertung wurde die 96-*Well*-Platte mittels HCl-Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Gesamtzellzahl wurde über die Anzahl positiver Objekte im DAPI-Kanal (nach nukleärer Gegenfärbung) erfasst. Weiterhin erfolgte die getrennte Erfassung der GFP-Intensität des gesamten Zellkörpers als auch der unmittelbar nukleär bzw. perinukleär lokalisierten Intensität. Hierüber wurden die Gesamtintensität von  $\beta$ -Catenin pro Zelle sowie der nukleäre und perinukleäre Anteil bestimmt.

Auffällig war, dass sich während der OSK-Reprogrammierung mit miR-294 oder miR-181d unter Wnt3a-Stimulationsbedingungen eine gesteigerte nukleäre und perinukleäre Lokalisierung von  $\beta$ -Catenin im Vergleich zur Transfektion mit miR-Con zeigte. Dieser Effekt trat ohne Wnt3a-Stimulation nicht auf (**Abb. 30**).

a. OSK-Reprogrammierung mit miRNA-Mimic und Wnt3a-Stimulation

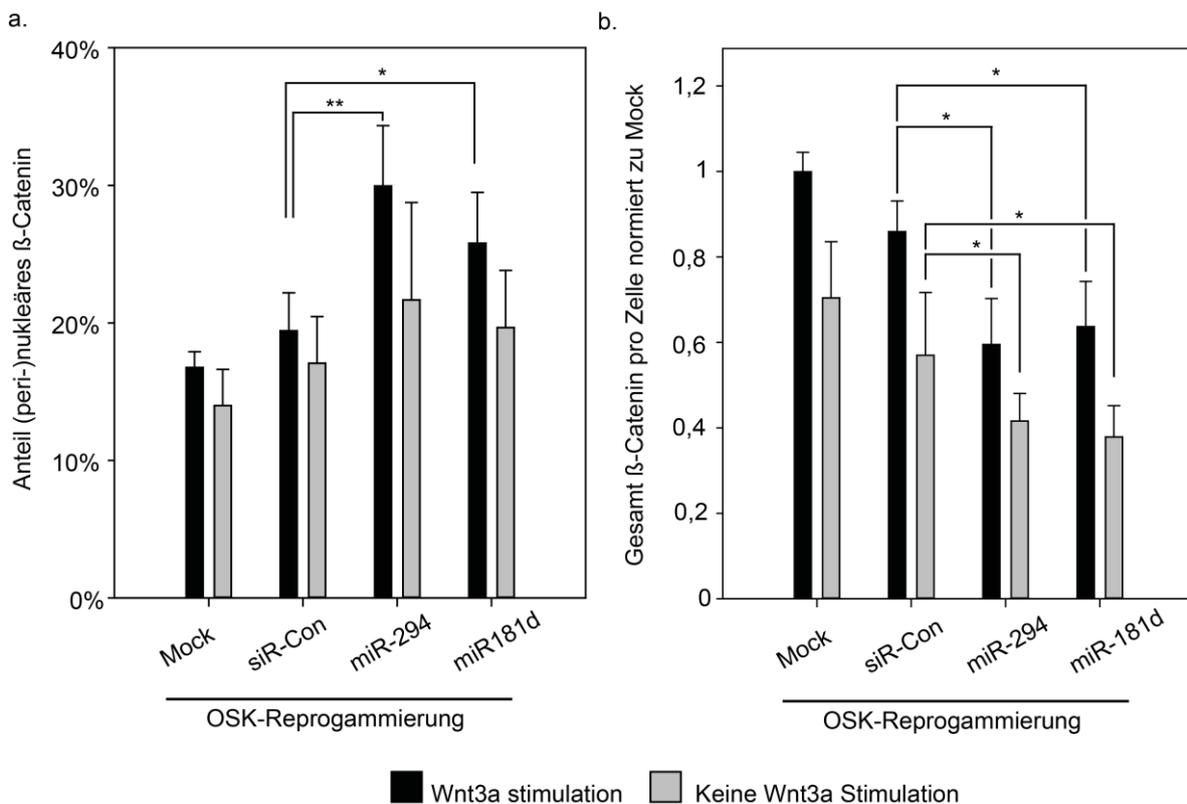


b. OSK-Reprogrammierung mit miRNA-Mimic ohne Wnt3a-Stimulation



**Abb. 30: Immunzytochemischer Nachweis der subzellulären Lokalisation von  $\beta$ -Catenin**  
 Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Einleitung der OSK-Reprogrammierung in MEFs unter Transfektion von miR-Con, miR-294 oder miR-181. Nach Fixierung der Zellen in der 96-Well-Platte am Tag 3 erfolgte die Färbung mit  $\beta$ -Catenin Primärantikörper sowie fluoreszierendem Sekundärantikörper (jeweils obere Zeile). Die nukleäre Gegenfärbung erfolgte mit Hoechst (jeweils untere Zeile). a. Ansätze mit 24-stündiger Wnt3a-Stimulation (50 ng/ml). b. Ansätze ohne Wnt3a-Stimulation. Der weisse Balken repräsentiert 50  $\mu$ m. Bildmaterial Judson et al., 2013 mit Modifikationen [2].

Diese Beobachtungen wurden durch die quantitative Auswertung der HCI-Fluoreszenzmikroskopie ergänzt: Zur Berechnung der nukleären und perinukleären Lokalisation von  $\beta$ -Catenin wurden zunächst die gefärbten Nuklei erfasst. Es erfolgte dann die Erfassung der Fluoreszenzintensität für den nukleären sowie unmittelbar angrenzenden perinukleären Bereich. Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung der Gesamt-Fluoreszenzintensität pro Zelle. Hierüber wurde der prozentuale Anteil des nukleären und perinukleären  $\beta$ -Catenins berechnet. Ergebnisse von 3 unabhängigen Versuchswiederholungen (biologisches Triplikat) wurden gemittelt und sind im Folgenden dargestellt. Unter Wnt3a-Stimulation war im Vergleich zu siR-Con während der OSK-Reprogrammierung mit miR-294 (1,5-fach) und miR-181d (1,33-fach) eine signifikant erhöhte  $\beta$ -Catenin-Translokation in bzw. an den Nukleus zu verzeichnen, was für eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges spricht (**Abb. 31a**). Der Effekt war zwar auch ohne Wnt3a-Stimulation zu beobachten, zeigte sich hier aber deutlich geringer ausgeprägt und erreichte keine statistische Signifikanz. Die Gesamtmenge zellulären  $\beta$ -Catenins zeigte sich wie zu erwarten nach 48-stündiger Wnt3a-Stimulation um ca. 20 – 30% erhöht, und zwar in jedem Ansatz. Es zeigte sich sowohl mit als auch ohne Wnt3a-Stimulation eine Abnahme des gesamten zellulären  $\beta$ -Catenins auf ca. 67% für miR-294 und auf ca. 75% für miR-181d im Vergleich zu siR-Con ( $P < 0,05$ ) (**Abb. 31b**).

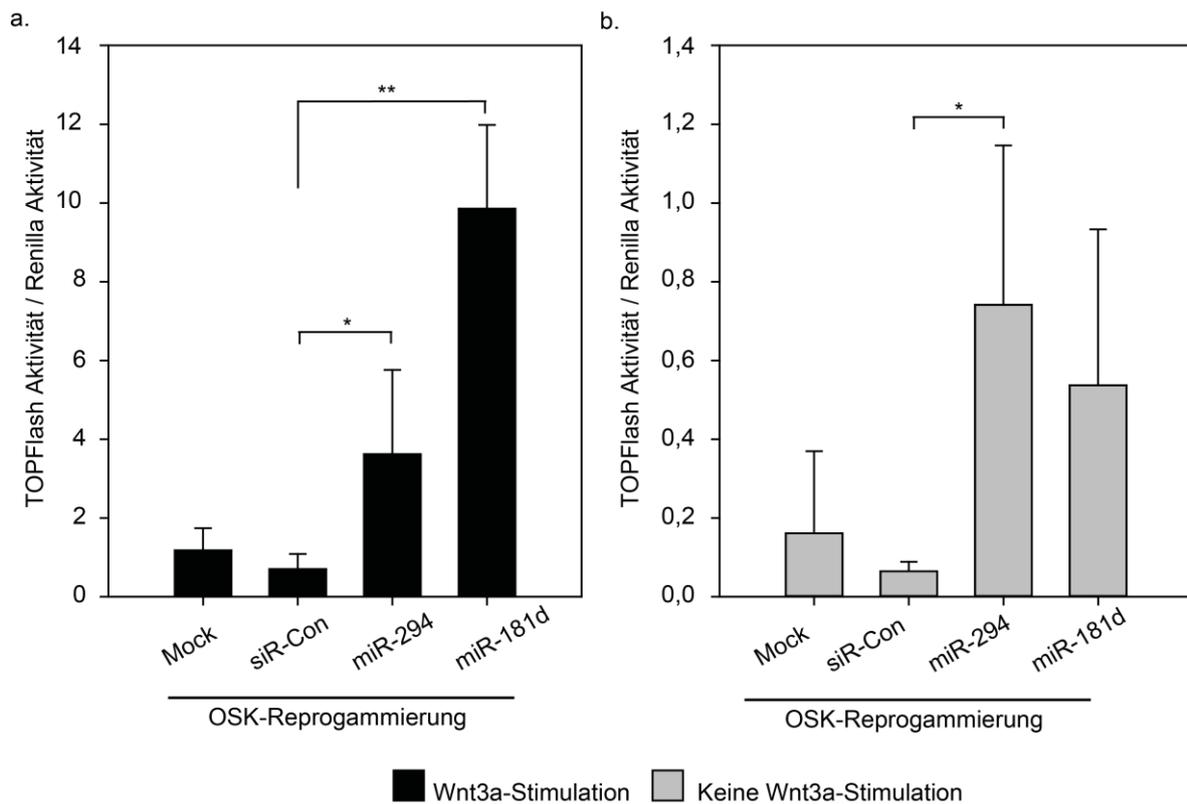


**Abb. 31: Quantitative Auswertung der subzellulären Lokalisation von  $\beta$ -Catenin**

Immunzytochemische Färbung von  $\beta$ -Catenin in MEFs, Tag 3 nach Einleitung der OSK-Reprogrammierung und Tag 2 nach Mimic-Transfektion, folgend HCI-fluoreszenzmikroskopische Auswertung. a. Anteil des (peri-)nukleären  $\beta$ -Catenins im Verhältnis zum gesamten zellulären  $\beta$ -Catenin. b. Gesamtes  $\beta$ -Catenin pro Zelle. Schwarze Balken repräsentieren Ansätze mit Wnt3a-Stimulation. Gesamt  $\beta$ -Catenin pro Zelle ist normalisiert zu Mock. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines biologischen Triplikats. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

Nachfolgend sollten die Resultate zur Beteiligung von  $\beta$ -Catenin unter Verwendung des Luciferase-TOPFlash-Reporterassays bestätigt werden, der auf Wnt/ $\beta$ -Catenin abhängiger, promotorspezifischer Luciferaseaktivität beruht. Die OSK-Reprogrammierung wurde in einer 96-Well-Platte mit 900 MEFs pro Kavität eingeleitet. Nach Mimic-Transfektion am 1. Folgetag erfolgte am 2. Folgetag die Transfektion der Reporterplasmide. Hierfür wurden pro Kavität 8  $\mu$ L DMEM und 1  $\mu$ L FuGENE-6 Transfektionsreagenz präinkubiert (5 min, RT), wonach 80 ng (1  $\mu$ L) Reporterplasmid und 12 ng (0,06  $\mu$ L) TK-Renilla zugegeben wurde. Nach weiterer 15-minütiger Inkubation (RT) wurden 90  $\mu$ L MEF-Medium hinzugegeben. Der Versuch wurde in Abwesenheit und Gegenwart von Wnt3a als Stimulus durchgeführt. Hierfür wurden 0,125  $\mu$ L Wnt3a (40  $\mu$ g/mL) dem Transfektionsgemisch zugesetzt. 24 h nach Transfektion der Reporterplasmide erfolgte die Auswertung des Luciferase-Assays gemäß Herstellerangaben.

Durch Transfektion der Zellen mit miR-294 oder miR-181d bei der OSK-Reprogrammierung war im Vergleich zu Kontrollzellen eine deutliche Steigerung der Luciferaseaktivität als Indiz für erhöhte Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegsaktivität zu verzeichnen. Dieser Effekt war sowohl in Abwesenheit als auch Gegenwart von Wnt3a zu beobachten. Ohne Wnt3a-Stimulation war die Reporteraktivität unter miR-294-Transfektion im Vergleich zu siR-Con 12-fach, für miR-181d 9-fach erhöht. Wie zu erwarten war bei Zugabe von Wnt3a die basale Luciferaseaktivität in allen Transfektionsbedingungen inklusive siR-Con und Mock um den Faktor 10 höher als ohne Zusatz des Liganden. In Kombination der Inkubation der Zellen mit Wnt3a und der Transfektion von miR-294 und miR-181d kam es zu einer Steigerung der Luciferaseaktivität um den Faktor 5 bzw. 14 (**Abb. 32**).



**Abb. 32: Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegsaktivität im Luciferase-Assay**

Einen Tag nach Beginn der OSK-Reprogrammierung wurden die Zellen mit Mock oder Mimics (siR-Con, miR-294, miR-181d) transfiziert. Nach 3 Tagen wurden sie mit dem Reporterplasmid und dem Transfektionskontrollplasmid transfiziert und nach einem weiteren Tag für die Auswertung lysiert. Die Fluoreszenzintensität der Firefly Luciferase (TOPFlash Aktivität) wurde auf die Fluoreszenzintensität der Kontroll-Luciferase (Renilla Aktivität) normiert (Y-Achse). Die Versuchsreihen wurden auf die Mock-Transfektion normiert. a. Luciferaseaktivität nach 24-stündiger Stimulation mit rekombinantem Wnt3a (25 ng/mL), welches dem Transfektionsgemisch zugesetzt wurde. b. Luciferaseaktivität ohne Stimulation mit Wnt3a. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines biologischen Triplikats. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl miR-294 als auch miR-181d während der OSK-Reprogrammierung die Aktivität des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges erhöhen. Es zeigt sich eine ausgeprägte Aktivierung dieses Signalweges für beide miRNAs sowohl im Grundzustand als auch unter Wnt3a-Stimulationsbedingungen.

# F DISKUSSION

## F 1 Wirkdauer von miRNA-Mimics nach Transfektion

Die Ergebnisse der Vorexperimente zur Mimic-Stabilität waren essenziell für die Planung der nachfolgenden Reprogrammierungsstudien, da sich letztere über einen Zeitraum vollziehen, der die bekannte, durchschnittliche Wirkdauer von miRNA-Mimics in Zellen überschreitet. Unsere Untersuchungen bestätigten einen transienten Effekt der von uns ausgewählten Mimics mit einem Aktivitätszeitraum zwischen Tag 1 – 7 nach Transfektion und einem Maximum zwischen Tag 3 – 5.

Ziel war es, durch Einsatz exogener miRNA-Mimics den Effekt endogener miRNAs zu rekapitulieren. Die in der vorliegenden Studie verwendeten Mimics der Firma Dharmacon basierten auf der miR-67 des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* und wiesen eine minimale Sequenzübereinstimmung mit humanen und murinen miRNAs auf. Sie wurden chemisch modifiziert, sodass nur der aktive Strang mit RISC interagiert und die Mimics darüber hinaus eine höhere mRNA-Suppression erzielten als vergleichbar transfizierte, native Doppelstrang-miRNA. Laut Herstellerangaben liegt mit einem Luciferase-basierten Reporterassay die Suppression des Zielgens nach 24 h und 48 h bei ca. 90% des Ausgangsniveaus, bei Verwendung nicht modifizierter miRNA hingegen nur bei 60%. Diese verstärkte Mimic-Wirkung sollte insbesondere im Hinblick auf die Interpretation der durchgeführten Signalweganalysen kritisch evaluiert werden.

Beim methodischen Vergleich zum Nachweis intrazellulären GFPs im Rahmen der durchgeführten Reporterassays war zu beobachten, dass das unspezifische Hintergrundsignal in der Fluoreszenzmikroskopie höher war als bei der Durchflusszytometrie. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die unterschiedliche Empfindlichkeit der Nachweissysteme zurückzuführen, zumal die Kinetik der Mimic-Wirkung in beiden Verfahren sehr ähnlich war.

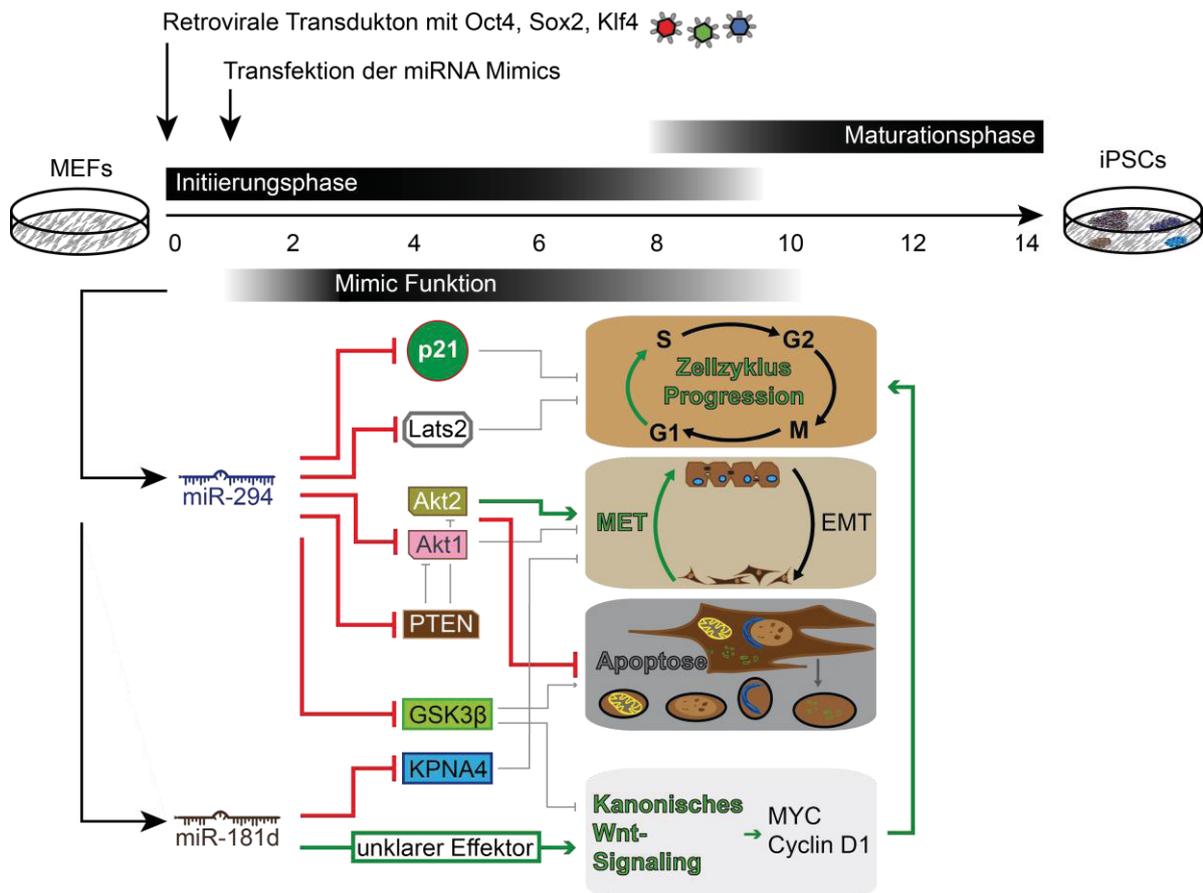
Die Anzahl spezifischer miRNA-Transkripte in der Zelle ist grundsätzlich von der für jedes Molekül individuellen Transkriptions- sowie Prozessierungs- und Abbaurate abhängig. Während über Transkription und Prozessierung bereits grundlegende Arbeiten erschienen sind [110,111], gibt es noch wenig Informationen zur Regulierung des Fließgleichgewichtsniveaus (*steady state level*) bei miRNAs. In einer Studie von Gantier et al. konnte gezeigt werden, dass native miRNAs eine sehr heterogene Halbwertszeit aufweisen, mit einem Median bei etwa 5 Tagen [112]. Sie resultiert wahrscheinlich aus einer Kombination aus Abbau und Verdünnungseffekt durch Zellteilung. Folglich müsste die miRNA-Aktivität unmittelbar nach Transfektion am höchsten sein und hiernach stetig abnehmen.

Im Gegensatz hierzu zeigte sich in unserem Experiment jedoch eine lineare, langsam

abfallende GFP-Reporterfluoreszenz bis hin zum Maximum der GFP-Repression als Indiz einer effizienten Hemmung durch die miRNA, gefolgt von einer langsamen Zunahme der GFP-Reporterfluoreszenz als Hinweis auf eine nachlassende Inhibition. Der initiale, langsame Abfall der GFP-Reporterfluoreszenz lässt sich am ehesten auf die relativ lange Halbwertszeit von GFP zurückführen, die beispielsweise in murinen L-Zellen, die aus embryonalen Fibroblasten gewonnen werden, 26 h beträgt [113]. Der noch langsamere Wiederanstieg der Reporterfluoreszenz ist möglicherweise eine Folge davon, dass durch Mimic-Transfektion eine unphysiologisch hohe Anzahl an Mimic-Molekülen in die Zelle gelangt. Bei einer derartigen Absättigung des Zell- und Nukleoplasmas mit miRNA-Molekülen sowie bei der vergleichsweise langen Halbwertszeit der Mimics [112] ist der verzögerte Abfall der Mimic-Aktivität am ehesten hauptsächlich durch den durch Zellteilung vermittelten Verdünnungseffekt zu erklären. Diesbezüglich wurde beispielsweise in Hela-Zellen gezeigt, dass durch transiente Transfektion von miR-76 (100 nM) ca. 1,8 Millionen Kopien des Mimic-Moleküls in eine Zelle gelangen, wohingegen die Gesamtzahl endogener miR-76 in diesen Zellen und auch in ESCs nur ca. 100 000 beträgt [33,114,115].

Grundsätzlich kann die Reprogrammierung von MEFs zu iPSCs in zwei verschiedene Phasen eingeteilt werden, welche sich durch spezifische, zelluläre Vorgänge unterscheiden. In der ersten Phase, der sogenannten Initiierung, die sich über etwa 7 Tage erstreckt, findet der Übergang der Zellen vom mesenchymalen in den epithelialen Status statt (MET), wobei der umgekehrte Vorgang (EMT) gleichzeitig inhibiert wird [53,56,116]. In der zweiten Phase, der sogenannten Maturation, die meist ebenfalls etwa 7 Tage dauert, erfolgt in diesen Zellen dann eine verstärkte Demethylierung und Deacetylierung von DNA und Histonen, die schließlich zu dem charakteristischen, epigenetischen Status pluripotenter Stammzellen führt [117].

Unsere Ergebnisse lassen somit den Schluss zu, dass eine 24 h nach Beginn der OSK-Reprogrammierung erfolgende Transfektion von Mimics dazu führt, dass sich deren Wirkung hauptsächlich über die Initiierungsphase der Zellen erstreckt, wohingegen eine Transfektion am Tag 1 und Tag 7 nach Beginn der Reprogrammierung ein relevante miRNA-Aktivität während des gesamten Vorganges aufrecht erhält (**Abb. 33**).



**Abb. 33: Modell des Einflusses von miR-294 und miR-181d auf die OSK-Reprogrammierung in MEFs**  
 Die Transfektion der Mimics (miR-294 und miR-181d) erfolgte 24 h nach Beginn der OSK-Reprogrammierung. Die Gegenwart der Mimics führte innerhalb der 7-tägigen Frühphase zu einer signifikanten Steigerung der Reprogrammierungsrate in MEFs. Als molekulare Mechanismen konnte die Beteiligung des PI3K/Akt- und des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges identifiziert werden. Diese Resultate stehen im Einklang mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die eine Beteiligung dieser wie auch anderer Faktoren an der Regulation der Zellzyklusprogression, des MET/EMT-Gleichgewichtes oder der Apoptose wahrscheinlich machen [118-120]. miRNAs sind nicht zwingend notwendig für die Reprogrammierung, stabilisieren aber offenbar die daran beteiligten Prozesse [121].

## F 2 Wirkung von miR-294 auf die Reprogrammierung

Die Transfektion der ESCC-miRNAs miR-294 und miR-302b in MEFs unter Verwendung eines MYC-freien Reprogrammierungsprotokolls hatte eine 11 – 15-fache Steigerung der Reprogrammierungseffizienz zur Folge. Dies ist im Einklang mit Resultaten früherer Studien anderer Arbeitsgruppen mit ESCC-miRNAs, die etwa für miR-294 eine 8 – 10-fache Zunahme in MEFs belegen konnten [56,66,122]. Übereinstimmend konnte in einer Studie mit humanen Fibroblasten und den ESCC-miRNAs miR-302b und miR-372 (letztere ist das humane Äquivalent zu muriner miR-294) in einem MYC-freien Protokoll eine 10 – 14-fach erhöhte Reprogrammierungsrate erzielt werden [57], was die Validität des auch in der vorliegenden Studie verwendeten Reprogrammierungsprotokolls bestätigt.

Darüber hinaus gelang uns der Nachweis, dass miR-294 bei Transfektion in der frühen Phase der Reprogrammierung (Tag 1) stärker aktivierend wirkt als zu späteren Zeitpunkten (Tage 5, 9 und 13). Davon ist erneut abzuleiten, dass der fördernde Effekt primär auf

Einflussnahme in der Initialphase zurückzuführen ist. In der Maturationsphase hingegen ist der Einfluss von miRNA-294 demnach weit geringer. Eine Erklärung für diesen zeitabhängigen Effekt liegt möglicherweise auch in der im Rahmen der Reprogrammierung zunehmenden Heterogenität der Zellpopulation. Denn bekanntermaßen erreicht nur ein kleiner Teil der retroviral transduzierten Zellen die Maturationsphase [54,59], sodass Mimics, welche zu späten Zeitpunkten transfiziert werden, auf eine Mischpopulation von Zellen unterschiedlicher Entwicklungsphasen treffen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen zur Wirkung von ESCC-miRNAs in der Frühphase der Reprogrammierung decken sich mit Resultaten anderer Studien, die zeigten, dass diese die Selbsterneuerung von ESCs durch Inhibition der EMT aufrechterhalten. Zusätzlich wurde auch gezeigt, dass sie in ESCs die zelluläre Apoptosekaskade inhibieren und so ebenfalls zur Selbsterneuerung beitragen [56,116,123,124].

Darüber hinaus ist bekannt, dass Vertreter der ESCC-miRNA-Familie die Biosynthese von p21 und Lats2 inhibieren [125]. Beide Proteine vermitteln eine Inhibition der G1-S Zellzyklus-transition. Hierdurch wird einerseits die Seneszenz inhibiert und andererseits die Zellzyklus-progression gefördert, indem die Zellen vermehrt in der S-Phase vorliegen [57,62,124,126] (**Abb. 33**).

### **F 3 Wirkung von miR-181d auf die Reprogrammierung**

Neben Mitgliedern der ESCC-Familie wurden auch miRNAs der 181-Familie auf eine potenziell verstärkende Wirkung bei der Reprogrammierung von MEFs untersucht. Diese miRNAs waren bislang insbesondere als Onkogene in der Onkogenese verschiedener solider und hämatologischer Malignome bekannt [127-129].

Wir konnten erstmals experimentell zeigen, dass die Transfektion der miR-181a-d an Tag 1 und 7 der OSK-Reproprogrammierung eine bis zu 3-fache Steigerung der iPSC-Kolonienzahl zur Folge hatte, wobei miR-181d als stärkster Aktivator dieser Gruppe identifiziert und detailliert weiter untersucht wurde.

Im Gegensatz zu ESCC-miRNAs werden Mitglieder der 181-Familie weder in MEFs noch ESCs endogen exprimiert [16]. Während ESCC-miRNAs eine Differenzierung von ESCs blockieren, fördern miRNAs der 181-Familie diesen Vorgang [130,131]. Interessanterweise binden die Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog an den Promotor des Clusters miR-183c-miR-181d [70], was auf eine vermehrte Transkription der miR181-Familie während der Reprogrammierung und einen positiven Regelkreis schließen lässt. In Übereinstimmung mit den Resultaten der ESCC-miRNAs hatte auch die zeitabhängige Transfektion von miR-181d am Tag 1 OSK-Reproprogrammierung eine 4-fache Steigerung der Reprogrammierungsrate zur Folge, während dieser Effekt an späteren Zeitpunkten deutlich geringer war. In Analogie zu

ESCC-miRNAs kann daher auch für miR-181d eine überwiegende Einflussnahme auf zelluläre Prozesse in der Initialphase der Reprogrammierung und somit eine Einflussnahme auf die MET postuliert werden. In der Tat konnte in einer Studie in Glioblastomzellen nachgewiesen werden, dass die Expression von miR-181b invers mit der EMT verknüpft ist und diesen, der Reprogrammierung entgegenstehenden, Prozess über eine Inhibition der KPNA4-Biosynthese inhibiert. KPNA4 ist eines der primären Importin-Isoformen für die nukleäre Translokation von NF $\kappa$ B, welches wiederum ein essenzieller Aktivator der EMT ist. [132]. (Abb. 33).

## F 4 Gemeinsame Wirkung von miR-294 und miR-181d

Aufgrund der jeweils signifikanten Steigerung der Transfektionseffizienz durch miR-294 und miR-181d, stellte sich die Frage, ob die gleichzeitige Präsenz beider Mimics in den Zellen möglicherweise einen additiven oder synergistischen Effekt zur Folge haben würde. Überraschenderweise lag bei gemeinsamer Transfektion von miR-294- und miR-181d-Mimics während der OSK-Reprogrammierung die Zunahme der Reprogrammierungsrate nicht signifikant über den Werten, die jeweils mit den einzeln transfizierten miRNAs zu erreichen war. Eine mögliche Ursache ist, dass sich die Wirkungen der offensichtlich unterschiedlichen Zielgene und nachgeschalteten Signalwege teilweise gegenseitig aufheben, also offenbar weder vollständig überlappen noch vollkommen unterschiedliche Effekte haben. Frühere *in silico* Untersuchungen unserer sowie anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass die Ziel-mRNAs, die von miR-294 und miR-181d während der OSK-Reprogrammierung jeweils gebunden und inhibiert werden, keine Gemeinsamkeiten aufweisen [2,133]. Somit kann trotz unterschiedlicher Zielgene beider miRNA-Familien die Hypothese aufgestellt werden, dass deren Effekte letztlich auf ähnliche zelluläre Signalwege konvergieren und somit bei gleichzeitiger Transfektion keinen Synergismus hervorrufen.

In der Tat konnte in unserer Arbeitsgruppe mittels *in silico*-Anreicherungsanalysen rechnerisch eine Beeinflussung der Signalwege von E-Cadherin, Wnt, p53, TGF $\beta$  und PI3K/Akt, sowie der Prozesse Apoptose und Zellzyklusregulation durch beide miRNA-Familien ermittelt werden [2]. Von all diesen Signalwegen, außer dem von PI3K/Akt, ist bereits bekannt, dass sie die Reprogrammierung regulieren [124,126,134,135], während letzterer bis dato nicht mit der Reprogrammierung in Verbindung gebracht worden war [2]. Exemplarisch wurde daher nachfolgend die Bedeutung des Wnt/ $\beta$ -Catenin- und PI3K/Akt-Signalweges während der OSK-Reprogrammierung genauer untersucht.

## F 5 PI3K/Akt-Signalweg in der Reprogrammierung mit miR-294 und miR-181

Die Transfektion von miR-294 in der Frühphase der OSK-Reprogrammierung resultierte in einer verstärkten Phosphorylierung von Akt unter IGF-1 Stimulationsbedingungen, was auf ein erhöhtes Aktivitätsniveau des PI3K/Akt-Signalweges hinweist. Dieser Effekt war offenbar nicht allein auf eine veränderte Biosynthese des natürlichen Akt-Inhibitors PTEN in den Zellen zurückzuführen, da dessen Proteinexpression unter den Bedingungen nur leicht vermindert war. Bezeichnenderweise trat der durch IGF-1 induzierte, stimulatorische Effekt von miR-294 auf phospho-Akt nur nach vorherigem Aushungern der Zellen in serumfreiem Medium auf. Dies lässt sich durch die in FBS enthaltenen Wachstumsfaktoren erklären, die ansonsten zu einer konstitutiven Aktivierung von Akt führen würden.

Methodisch ist anzumerken, dass die hier vorgestellten Westernblot-Ergebnisse unter Verwendung von Sekundärantikörpern, die mit Infrarot-Fluorochromen gekoppelt waren, in einem dafür optimierten Scanner desselben Herstellers erfolgten. Die dynamische Messbreite dieser Methode liegt deutlich höher und das Hintergrundsignal deutlich niedriger als bei der ansonsten weit verbreiteten Chemilumineszenz, die auf der standardmäßigen Bestimmung von Schwarz-Werten beruht.

Mittels Westernblot gelang erstmals der Nachweis, dass miR-294 zur Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges im Rahmen der OSK-Reprogrammierung beiträgt. In weiterführenden Studien unserer Arbeitsgruppe führte die konstitutive Aktivierung von Akt in der Initiierungsphase (Tag 2 – 8), nicht jedoch in der Maturationsphase (Tag 9 – 16), zu einer deutlichen Steigerung der Reprogrammierungseffizienz [2], was die hier gezeigten Resultate bestätigt.

Grundsätzlich kann die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges vielfältige Reaktionen in Zellen auslösen, wie z.B. die Hemmung der Apoptose oder die Förderung der Zellproliferation [71,86]. Auch in iPSCs ist der PI3K/Akt-Signaltransduktion für das Überleben der Zellen essenziell, zumal eine Blockierung des Signalweges zur Apoptose führt [136].

Die in dieser Arbeit gezeigte, durch miR-294 induzierte, aber ausschließlich in der Frühphase zu beobachtende Hochregulation der PI3K/Akt-Aktivität, die mit der ebenfalls nur früh erreichbaren Verbesserung der Reprogrammierungseffizienz korreliert, lässt den Schluss zu, dass sich miR-294 über den PI3K/Akt-Signalweg letztlich insbesondere auf die in der Initiierungsphase dominierende MET auswirkt. Es ist bekannt, dass der durch ESCC-miRNAs verursachte, stabilisierende Effekt auf die MET primär durch Hemmung der Translation der mRNA von TGF $\beta$ 2 beruht [56]. Interessanterweise belegen mehrere Studien in verschiedenen Modellorganismen eine inverse Beziehung zwischen aktiviertem

PI3K/Akt-Signaling und der MET. In der Zebrafisch-Gastrulation beispielsweise kolokalisiert aktiviertes Akt mit Aktin an der Führungsreihe der mesoendodermalen Zellen, welche eine EMT, also den gegenteiligen zellulären Prozess, durchlaufen [137]. In humanen Brustkrebszellen führt die Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges zur Aktivierung der MET, begleitet von einer Reduktion von Snail1, Steigerung der E-Cadherin-Expression sowie einer Verringerung der Invasivität und Proliferativität der Zellen [138]. In Fibroblasten ist ein MET-spezifischer antimigratorischer- und antiinvasiver Effekt von aktiviertem Akt belegt, wobei ein Knockout von Akt1 in MEFs eine verringerte Zellmigration nach sich zog, das Ausschalten von Akt2 jedoch den gegenteiligen Effekt zur Folge hatte [139]. Weiterhin zeigten Bissell und Kollegen eine verringerte Motilität von Brustkrebszellen, welche aktivierte Akt1-Isoform exprimierten [140]. Zusammenfassend scheint die Ausprägung der unterschiedlichen zellulären Effekte der PI3K/Akt-Signaltransduktion, zumindest in differenzierten Zellen, von der jeweils betroffenen Akt-Isoform sowie dem Zelltyp abhängig zu sein. So etwa stellten auch Xue und Kollegen in einer umfassenden Übersichtsarbeit heraus, dass die MET in Fibroblasten durch Akt2 gefördert und durch Akt1 gehemmt wird, während die beiden Akt-Isoformen in epithelialen Zellen und Tumoren umgekehrte Funktionen aufweisen [55]. In humanen Fibroblasten wurde während der OSK-Reprogrammierung mit ESCC-miRNAs gezeigt, dass Akt1 am Tag 7 nach Transduktion signifikant reprimiert war [57].

Somit kann zusammenfassend postuliert werden, dass der fördernde Effekt von miR-294 auf die Reprogrammierung u.a. auf einer über den PI3K/Akt-Signalweg vermittelten Stabilisierung der MET in der Initiierungsphase beruht (**Abb. 33**).

## **F 6 Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in der Reprogrammierung mit miR-294 und miR-181**

Bekanntermaßen führt eine Aktivierung von Akt zu einer Hyperphosphorylierung und damit verbundenen Inaktivierung von GSK3 $\beta$ , einem negativen Modulator des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges. Dies wiederum resultiert in einer Aktivierung Wnt/ $\beta$ -Catenin-abhängig transkribierter Gene und hat eine Hemmung der Apoptose sowie Förderung der Zellzyklusprogression zur Folge [141] (**Abb. 33**). Nach Transfektion von miR-294 und miR-181d ist die Aktivität des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in der Frühphase der OSK-Reprogrammierung um bis zu 14-fach erhöht. Dies bestätigt die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten *in silico*-Studien, welche Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaling als putativen Ziel-Signalweg herausarbeiten konnten [2]. Auffällig war, dass bei unseren Untersuchungen nach Transfektion der Zellen, ob mit miR-294 oder miR-181, zwar die Reporteraktivität bzw. der Anteil nukleären  $\beta$ -Catenins erhöht war, jedoch die Gesamtmenge des zellulären  $\beta$ -Catenins um ca. 30% abnahm. Dies lässt auf einen hemmenden Einfluss der beiden miRNAs auf die Biosynthese von  $\beta$ -Catenin oder eine Förderung des Abbaus von  $\beta$ -Catenin durch das

Proteasom schließen, wobei es dennoch zu einer vermehrten Translokation des verbleibenden Proteins in den Nukleus mit resultierender, erhöhter Signalwegsaktivität kommt. In einer Studie, die ebenfalls die OSK-Reprogrammierung in MEFs untersuchte, konnte nach Transfektion von ESCC-miRNAs auch eine erhöhte nukleäre  $\beta$ -Catenin Konzentration gezeigt werden, wobei in dieser Arbeit der gesamtzelluläre Anteil an  $\beta$ -Catenin nicht untersucht wurde [56].

Grundsätzlich überwiegen Hinweise, dass konstitutiv aktiviertes  $\beta$ -Catenin [42], oder auch die Applikation niedermolekularer Inhibitoren für GSK3 $\beta$ , durch Blockade des  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplexes die Reprogrammierung fördern [126,133,142]. In ähnlicher Weise erhöht auch die Zugabe von löslichem Wnt3a, dem wirksamsten Liganden zur Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges, die Reprogrammierungsrate [134], allerdings nur in der frühen Initiationsphase [2]. In einer Studie von Vidal und Kollegen konnten murine Fibroblasten durch Inhibition von TGF $\beta$ , Aktivierung von Wnt/ $\beta$ -Catenin-*Signaling* und Zugabe von Ascorbinsäure mit hoher Effizienz reprogrammiert werden [143]. Im Widerspruch dazu stehen Berichte, wonach erhöhte Wnt/ $\beta$ -Catenin-Aktivität in der Frühphase die Reprogrammierung von MEFs inhibiert, in der Spätphase jedoch erhöht [144,145]. Die molekularen Mechanismen der Beteiligung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-*Signaling* an der Überwindung der Initiationsphase in der Reprogrammierung sind nicht abschließend geklärt und weisen wahrscheinlich auch Kontext-spezifische Unterschiede, abhängig von Ausgangszelltyp und der Reprogrammierungstechnik, auf.

## F 7 Fazit und Ausblick

Die Gewinnung und Modifizierung von iPSC-Linien ist insbesondere für die translationale Medizin bei der Erforschung und Therapie von Krankheiten von großer Bedeutung. Dabei besteht die Gefahr der Reaktivierung retroviral-integrierter Transkriptionsfaktoren und der Einschleusung genetischer Mutationen während der retroviral-vermittelten Insertion genetischen Materials [146]. Diese Gefahr wird versucht durch Entwicklung alternativer Reprogrammierungsverfahren zu minimieren. So wurden Protokolle etabliert, die ohne Überexpression des potenten Onkogens MYC auskommen [66]. Darüber hinaus gewann die transiente, nicht-retroviral vermittelte Transfektion von miRNAs für die Reprogrammierung an Bedeutung, zumal sie das Risiko unerwünschter Mutationen deutlich vermindert [147,148].

Die eigenen Untersuchungen an MEFs belegen, dass die Transfektion von miR-294, aber auch miR-181d die Effizienz der durch Oct4, Sox2 und Klf4 ausgelösten Reprogrammierung signifikant erhöht, sofern die miRNAs während der Initiationsphase in die Zellen eingebracht werden. Dabei wird mit miR-294 eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs beobachtet, während miR-294 und miR-181 das Wnt/ $\beta$ -Catenin-*Signaling* deutlich aktivieren.

Aufgrund des Fehlens additiver oder synergistischer Effekte von miR-294 und miR-181d scheint die Wirkung beider Signalwege über ähnliche Zielgene funktionell zu konvergieren. Dies belegen auch Folgestudien unserer Arbeitsgruppe, die zeigten, dass durch gleichzeitige Aktivierung des PI3K/Akt- und Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges keine zusätzliche Verbesserung der Reprogrammierungsrate zu erzielen war [2]. Die genauen, molekularen Mechanismen, wie die Signalwege einzeln oder koordiniert agieren, um die Pluripotenz von Stammzellen aufrechtzuerhalten oder adulte Zellen wieder in einen embryonalen Status zurückzusetzen, sind bislang noch wenig verstanden (**Abb. 33**).

Die Resultate der vorliegenden Arbeit belegen eindeutig, dass die Transfektion von miR-294 und miR-181d zu einer deutlichen Steigerung der OSK-Reprogrammierungseffizienz muriner Fibroblasten führt und dass die PI3K/Akt- und Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwege an diesem Effekt beteiligt sind.

Das bessere Verständnis der molekularen Mechanismen, die der Reprogrammierung zugrunde liegen, ist essenziell für die Entwicklung von Protokollen, die ohne die Integration genetischen Materials in das Wirtsgenom und die damit assoziierten Risiken auskommen. Studien konnten belegen, dass die Verwendung integrationsfreier Protokolle die Häufigkeit genetischer Mutationen in humanen [149] und murinen [150] iPSCs und damit auch deren Entartungspotential nach Differenzierung und autologer Reimplantation deutlich reduzieren. Kürzlich gelang es, ein entsprechendes Protokoll für humane Fibroblasten zu entwickeln, das ausschließlich auf Transfektion modifizierter mRNAs sowie miRNA-Mimics zurückgreift und Erfolgsraten erzielt, die mit klassischen Reprogrammierungsprotokollen vergleichbar sind [151]. Trotz dieser Anstrengungen müssen noch weitere Risiken für die Patientensicherheit bei der Herstellung von iPSCs überwunden werden [152], bevor diese vielversprechende Technologie den Weg in die klinische Anwendung finden kann.

# LITERATURVERZEICHNIS

1. Greve, T.S., Judson, R.L. & Blelloch, R. microRNA control of mouse and human pluripotent stem cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**, 213-239 (2013).
2. Judson, R.L., Greve, T.S., Parchem, R.J. & Blelloch, R. MicroRNA-based discovery of barriers to dedifferentiation of fibroblasts to pluripotent stem cells. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 1227-1235 (2013).
3. Evans, M.J. & Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156 (1981).
4. Martin, G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7634-7638 (1981).
5. Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. & Smith, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643-655 (2003).
6. Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A. & Vallier, L. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**, 191-195 (2007).
7. Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L. & McKay, R.D. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**, 196-199 (2007).
8. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S. & Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147 (1998).
9. Rossant, J. & Tam, P.P. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* **136**, 701-713 (2009).
10. Osorno, R., Tsakiridis, A., Wong, F., Cambray, N., Economou, C., Wilkie, R., Blin, G., Scotting, P.J., Chambers, I. & Wilson, V. The developmental dismantling of pluripotency is reversed by ectopic Oct4 expression. *Development* **139**, 2288-2298 (2012).
11. Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H. & Smith, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*

**95**, 379-391 (1998).

12. Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**, 372-376 (2000).
13. Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N. & Lovell-Badge, R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* **17**, 126-140 (2003).
14. Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. & Yamanaka, S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631-642 (2003).
15. Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R. & Young, R.A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**, 947-956 (2005).
16. Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., Calabrese, J.M., Dennis, L.M., Volkert, T.L., Gupta, S., Love, J., Hannett, N., Sharp, P.A., Bartel, D.P., Jaenisch, R. & Young, R.A. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* **134**, 521-533 (2008).
17. Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L. & Lander, E.S. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315-326 (2006).
18. Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., Bell, G.W., Otte, A.P., Vidal, M., Gifford, D.K., Young, R.A. & Jaenisch, R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**, 349-353 (2006).
19. Mott, J.L. & Mohr, A.M. Overview of MicroRNA Biology. *Seminars in liver disease* **35**, 3-11 (2015).
20. Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B. & Bartel, D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19**, 92-105 (2009).
21. Farh, K.K., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B.P., Johnston, W.K., Lim, L.P., Burge, C.B. & Bartel, D.P. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* **310**, 1817-1821 (2005).

22. Bartel, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233 (2009).
23. Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B. & Bartel, D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19**, 92-105 (2009).
24. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. & Kim, V.N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **23**, 4051-4060 (2004).
25. Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209-216 (2003).
26. Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. & Zamore, P.D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199-208 (2003).
27. Fabian, M.R. & Sonenberg, N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 586-593 (2012).
28. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297 (2004).
29. Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P. & Bartel, D.P. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**, 64-71 (2008).
30. Bazzini, A.A., Lee, M.T. & Giraldez, A.J. Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science* **336**, 233-237 (2012).
31. Djuranovic, S., Nahvi, A. & Green, R. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* **336**, 237-240 (2012).
32. Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S. & Bartel, D.P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835-840 (2010).
33. Calabrese, J.M., Seila, A.C., Yeo, G.W. & Sharp, P.A. RNA sequence analysis defines Dicer's role in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18097-18102 (2007).
34. Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N.D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foa, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Muller, R.U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D.B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H.I., Hornung, V., Teng, G.,

- Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C.E., Nagle, J.W., Ju, J., Papavasiliou, F.N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M.J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J.J., Sander, C., Zavolan, M. & Tuschl, T. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* **129**, 1401-1414 (2007).
35. Bar, M., Wyman, S.K., Fritz, B.R., Qi, J., Garg, K.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Bendoraite, A., Mitchell, P.S., Nelson, A.M., Ruzzo, W.L., Ware, C., Radich, J.P., Gentleman, R., Ruohola-Baker, H. & Tewari, M. MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. *Stem Cells* **26**, 2496-2505 (2008).
36. Morin, R.D., O'Connor, M.D., Griffith, M., Kuchenbauer, F., Delaney, A., Prabhu, A.L., Zhao, Y., McDonald, H., Zeng, T., Hirst, M., Eaves, C.J. & Marra, M.A. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res* **18**, 610-621 (2008).
37. Jouneau, A., Ciaudo, C., Sismeiro, O., Brochard, V., Jouneau, L., Vandormael-Pournin, S., Coppee, J.Y., Zhou, Q., Heard, E., Antoniewski, C. & Cohen-Tannoudji, M. Naive and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles. *RNA* **18**, 253-264 (2012).
38. Kiezun, A., Artzi, S., Modai, S., Volk, N., Isakov, O. & Shomron, N. miRviewer: a multispecies microRNA homologous viewer. *BMC Res Notes* **5**, 92 (2012).
39. Barroso-delJesus, A., Romero-Lopez, C., Lucena-Aguilar, G., Melen, G.J., Sanchez, L., Ligerio, G., Berzal-Herranz, A. & Menendez, P. Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. *Mol Cell Biol* **28**, 6609-6619 (2008).
40. Card, D.A., Hebbar, P.B., Li, L., Trotter, K.W., Komatsu, Y., Mishina, Y. & Archer, T.K. Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **28**, 6426-6438 (2008).
41. Reik, W., Dean, W. & Walter, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089-1093 (2001).
42. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
43. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872 (2007).
44. Wernig, M., Zhao, J.P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O. & Jaenisch, R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S*

A **105**, 5856-5861 (2008).

45. Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.C., Townes, T.M. & Jaenisch, R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* **318**, 1920-1923 (2007).
46. de Jaime-Soguero, A., Abreu de Oliveira, W. & Lluís, F. The Pleiotropic Effects of the Canonical Wnt Pathway in Early Development and Pluripotency. *Genes* **9**, 93 (2018).
47. Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R. & Bushman, F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**, 521-529 (2002).
48. Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**, 949-953 (2008).
49. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-317 (2007).
50. Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P. & Jaenisch, R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* **2**, 10-12 (2008).
51. Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N. & Yamanaka, S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* **26**, 101-106 (2008).
52. Roßbach, M., Hadenfeld, M. & Brüstle, O. Industrial Applications of Stem Cells. in *Translational Stem Cell Research: Issues Beyond the Debate on the Moral Status of the Human Embryo* (eds. Hug, K. & Hermerén, G.) 91-102 (Humana Press, Totowa, NJ, 2011).
53. Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H.K., Beyer, T.A., Datti, A., Woltjen, K., Nagy, A. & Wrana, J.L. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* **7**, 64-77 (2010).
54. Buganim, Y., Faddah, D.A., Cheng, A.W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K., Klemm, S.L., van Oudenaarden, A. & Jaenisch, R. Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* **150**, 1209-1222 (2012).
55. Xue, G. & Hemmings, B.A. PKB/Akt-Dependent Regulation of Cell Motility. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **105**, 393-404 (2013).
56. Liao, B., Bao, X., Liu, L., Feng, S., Zovoilis, A., Liu, W., Xue, Y., Cai, J., Guo,

- X., Qin, B., Zhang, R., Wu, J., Lai, L., Teng, M., Niu, L., Zhang, B., Esteban, M.A. & Pei, D. MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. *J Biol Chem* **286**, 17359-17364 (2011).
57. Subramanyam, D., Lamouille, S., Judson, R.L., Liu, J.Y., Bucay, N., Derynck, R. & Belloch, R. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **29**, 443-448 (2011).
58. Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C.J., Creighton, M.P., van Oudenaarden, A. & Jaenisch, R. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* **462**, 595-601 (2009).
59. Polo, J.M., Anderssen, E., Walsh, R.M., Schwarz, B.A., Nefzger, C.M., Lim, S.M., Borkent, M., Apostolou, E., Alaei, S., Cloutier, J., Bar-Nur, O., Cheloufi, S., Stadtfeld, M., Figueroa, M.E., Robinton, D., Natesan, S., Melnick, A., Zhu, J., Ramaswamy, S. & Hochedlinger, K. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* **151**, 1617-1632 (2012).
60. Esteban, M.A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., Li, W., Weng, Z., Chen, J., Ni, S., Chen, K., Li, Y., Liu, X., Xu, J., Zhang, S., Li, F., He, W., Labuda, K., Song, Y., Peterbauer, A., Wolbank, S., Redl, H., Zhong, M., Cai, D., Zeng, L. & Pei, D. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **6**, 71-79 (2010).
61. Lee, Y.L., Peng, Q., Fong, S.W., Chen, A.C., Lee, K.F., Ng, E.H., Nagy, A. & Yeung, W.S. Sirtuin 1 facilitates generation of induced pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts through the miR-34a and p53 pathways. *PLoS One* **7**, e45633 (2012).
62. Banito, A., Rashid, S.T., Acosta, J.C., Li, S., Pereira, C.F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J.C., Azuara, V., Walsh, M., Vallier, L. & Gil, J. Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev* **23**, 2134-2139 (2009).
63. Hu, S., Wilson, K.D., Ghosh, Z., Han, L., Wang, Y., Lan, F., Ransohoff, K.J., BurrIDGE, P. & Wu, J.C. MicroRNA-302 increases reprogramming efficiency via repression of NR2F2. *Stem Cells* **31**, 259-268 (2013).
64. Li, Z., Yang, C.S., Nakashima, K. & Rana, T.M. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. *EMBO J* **30**, 823-834 (2011).
65. Lin, S.L., Chang, D.C., Lin, C.H., Ying, S.Y., Leu, D. & Wu, D.T. Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res* **39**, 1054-1065 (2011).
66. Judson, R.L., Babiarz, J.E., Venere, M. & Belloch, R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* **27**, 459-

461 (2009).

67. Pfaff, N., Fiedler, J., Holzmann, A., Schambach, A., Moritz, T., Cantz, T. & Thum, T. miRNA screening reveals a new miRNA family stimulating iPS cell generation via regulation of Meox2. *EMBO Rep* **12**, 1153-1159 (2011).
68. Ye, D., Wang, G., Liu, Y., Huang, W., Wu, M., Zhu, S., Jia, W., Deng, A.M., Liu, H. & Kang, J. MiR-138 promotes induced pluripotent stem cell generation through the regulation of the p53 signaling. *Stem Cells* **30**, 1645-1654 (2012).
69. Guo, X., Liu, Q., Wang, G., Zhu, S., Gao, L., Hong, W., Chen, Y., Wu, M., Liu, H., Jiang, C. & Kang, J. microRNA-29b is a novel mediator of Sox2 function in the regulation of somatic cell reprogramming. *Cell Res* **23**, 142-156 (2013).
70. Chen, J., Wang, G., Lu, C., Guo, X., Hong, W., Kang, J. & Wang, J. Synergetic cooperation of microRNAs with transcription factors in iPS cell generation. *PLoS One* **7**, e40849 (2012).
71. Nicholson, K.M. & Anderson, N.G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* **14**, 381-395 (2002).
72. Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. & Hemmings, B.A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* **15**, 6541-6551 (1996).
73. Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. & Sabatini, D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101 (2005).
74. Osaki, M., Oshimura, M. & Ito, H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* **9**, 667-676 (2004).
75. Joung, S.M., Park, Z.Y., Rani, S., Takeuchi, O., Akira, S. & Lee, J.Y. Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1. *J Immunol* **186**, 499-507 (2011).
76. Toulany, M. & Rodemann, H.P. Potential of Akt mediated DNA repair in radioresistance of solid tumors overexpressing erbB-PI3K-Akt pathway. *Translational Cancer Research* **2**, 190-202 (2013).
77. Cantley, L.C. & Neel, B.G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 4240-4245 (1999).
78. Franke, T.F., Kaplan, D.R. & Cantley, L.C. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88**, 435-437 (1997).

79. Burgering, B.M. & Coffey, P.J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* **376**, 599-602 (1995).
80. Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. & Reed, J.C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**, 1318-1321 (1998).
81. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. & Greenberg, M.E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868 (1999).
82. Zimmermann, S. & Moelling, K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* **286**, 1741-1744 (1999).
83. Zhang, X., Tang, N., Hadden, T.J. & Rishi, A.K. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 1978-1986 (2011).
84. Grille, S.J., Bellacosa, A., Upson, J., Klein-Szanto, A.J., van Roy, F., Lee-Kwon, W., Donowitz, M., Tsichlis, P.N. & Larue, L. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* **63**, 2172-2178 (2003).
85. Singh, A.M., Bechard, M., Smith, K. & Dalton, S. Reconciling the different roles of Gsk3 $\beta$  in "naïve" and "primed" pluripotent stem cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **11**, 2991-2996 (2012).
86. Liang, J. & Slingerland, J.M. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* **2**, 339-345 (2003).
87. Sipos, F. & Galamb, O. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World J Gastroenterol* **18**, 601-608 (2012).
88. Larue, L. & Bellacosa, A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* **24**, 7443-7454 (2005).
89. Manning, B.D. & Cantley, L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274 (2007).
90. Agarwal, A., Das, K., Lerner, N., Sathe, S., Cicek, M., Casey, G. & Sizemore, N. The AKT/I kappa B kinase pathway promotes angiogenic/metastatic gene expression in colorectal cancer by activating nuclear factor-kappa B and beta-catenin. *Oncogene* **24**, 1021-1031 (2005).
91. Nusse, R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* **15**, 28 (2005).

92. Nusse, R. & Varmus, H.E. *Wnt* genes. *Cell* **69**, 1073-1087 (1992).
93. MacDonald, B.T., Tamai, K. & He, X. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **17**, 9-26 (2009).
94. Chou, H.Y., Howng, S.L., Cheng, T.S., Hsiao, Y.L., Lieu, A.S., Loh, J.K., Hwang, S.L., Lin, C.C., Hsu, C.M., Wang, C., Lee, C.I., Lu, P.J., Chou, C.K., Huang, C.Y. & Hong, Y.R. GSKIP is homologous to the Axin GSK3 $\beta$  interaction domain and functions as a negative regulator of GSK3 $\beta$ . *Biochemistry* **45**, 11379-11389 (2006).
95. Dema, A., Schroter, M.F., Perets, E., Skroblin, P., Moutty, M.C., Deak, V.A., Birchmeier, W. & Klussmann, E. The A-Kinase Anchoring Protein (AKAP) Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Interaction Protein (GSKIP) Regulates  $\beta$ -Catenin through Its Interactions with Both Protein Kinase A (PKA) and GSK3 $\beta$ . *J Biol Chem* **291**, 19618-19630 (2016).
96. Goessling, W., North, T.E., Loewer, S., Lord, A.M., Lee, S., Stoick-Cooper, C.L., Weidinger, G., Puder, M., Daley, G.Q., Moon, R.T. & Zon, L.I. Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell* **136**, 1136-1147 (2009).
97. Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P. & Smith, A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519-523 (2008).
98. Cole, M.F., Johnstone, S.E., Newman, J.J., Kagey, M.H. & Young, R.A. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev* **22**, 746-755 (2008).
99. Tam, W.L., Lim, C.Y., Han, J., Zhang, J., Ang, Y.S., Ng, H.H., Yang, H. & Lim, B. T-cell factor 3 regulates embryonic stem cell pluripotency and self-renewal by the transcriptional control of multiple lineage pathways. *Stem Cells* **26**, 2019-2031 (2008).
100. Yi, F., Pereira, L. & Merrill, B.J. Tcf3 functions as a steady-state limiter of transcriptional programs of mouse embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* **26**, 1951-1960 (2008).
101. Singh, A.M., Reynolds, D., Cliff, T., Ohtsuka, S., Mattheyses, A.L., Sun, Y., Menendez, L., Kulik, M. & Dalton, S. Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* **10**, 312-326 (2012).
102. Birnboim, H.C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523 (1979).
103. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*

- 72**, 248-254 (1976).
104. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
  105. Veeman, M.T., Slusarski, D.C., Kaykas, A., Louie, S.H. & Moon, R.T. Zebrafish prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr Biol* **13**, 680-685 (2003).
  106. Naviaux, R.K., Costanzi, E., Haas, M. & Verma, I.M. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol* **70**, 5701-5705 (1996).
  107. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D. & Naldini, L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* **72**, 8463-8471 (1998).
  108. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, II & Thomson, J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920 (2007).
  109. Davis, H.E., Morgan, J.R. & Yarmush, M.L. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem* **97**, 159-172 (2002).
  110. Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* **11**, 597-610 (2010).
  111. Brown, B.D., Gentner, B., Cantore, A., Colleoni, S., Amendola, M., Zingale, A., Baccarini, A., Lazzari, G., Galli, C. & Naldini, L. Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat Biotechnol* **25**, 1457-1467 (2007).
  112. Gantier, M.P., McCoy, C.E., Rusinova, I., Saulep, D., Wang, D., Xu, D., Irving, A.T., Behlke, M.A., Hertzog, P.J., Mackay, F. & Williams, B.R.G. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res* **39**, 5692-5703 (2011).
  113. Corish, P. & Tyler-Smith, C. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Engineering, Design and Selection* **12**, 1035-1040 (1999).
  114. Jin, H.Y., Gonzalez-Martin, A., Miletic, A.V., Lai, M., Knight, S., Sabouri-Ghomi, M., Head, S.R., Macauley, M.S., Rickert, R.C. & Xiao, C. Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. *Frontiers in genetics* **6**, 340-340 (2015).
  115. Janas, M.M., Wang, B., Harris, A.S., Aguiar, M., Shaffer, J.M.,

- Subrahmanyam, Y.V., Behlke, M.A., Wucherpfennig, K.W., Gygi, S.P., Gagnon, E. & Novina, C.D. Alternative RISC assembly: binding and repression of microRNA-mRNA duplexes by human Ago proteins. *RNA* **18**, 2041-2055 (2012).
116. Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q., Qin, B., Xu, J., Li, W., Yang, J., Gan, Y., Qin, D., Feng, S., Song, H., Yang, D., Zhang, B., Zeng, L., Lai, L., Esteban, M.A. & Pei, D. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* **7**, 51-63 (2010).
117. David, L. & Polo, J.M. Phases of reprogramming. *Stem Cell Res* **12**, 754-761 (2014).
118. Jayawardena, T.M., Egemnazarov, B., Finch, E.A., Zhang, L., Payne, J.A., Pandya, K., Zhang, Z., Rosenberg, P., Mirotsov, M. & Dzau, V.J. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res* **110**, 1465-1473 (2012).
119. Yoo, A.S., Sun, A.X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., Lee-Messer, C., Dolmetsch, R.E., Tsien, R.W. & Crabtree, G.R. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* **476**, 228-231 (2011).
120. Nam, Y.J., Song, K., Luo, X., Daniel, E., Lambeth, K., West, K., Hill, J.A., DiMaio, J.M., Baker, L.A., Bassel-Duby, R. & Olson, E.N. Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5588-5593 (2013).
121. Ebert, M.S. & Sharp, P.A. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell* **149**, 515-524 (2012).
122. Lin, S.L., Chang, D.C., Chang-Lin, S., Lin, C.H., Wu, D.T., Chen, D.T. & Ying, S.Y. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA* **14**, 2115-2124 (2008).
123. Guo, W.T., Wang, X.W., Yan, Y.L., Li, Y.P., Yin, X., Zhang, Q., Melton, C., Shenoy, A., Reyes, N.A., Oakes, S.A., Blelloch, R. & Wang, Y. Suppression of epithelial-mesenchymal transition and apoptotic pathways by miR-294/302 family synergistically blocks let-7-induced silencing of self-renewal in embryonic stem cells. *Cell Death Differ* **22**, 1158-1169 (2015).
124. Maherali, N. & Hochedlinger, K. Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* **19**, 1718-1723 (2009).
125. Wang, Y., Baskerville, S., Shenoy, A., Babiarz, J.E., Baehner, L. & Blelloch, R. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet* **40**, 1478-1483 (2008).

126. Ichida, J.K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E.Y., Chung, J.E., Egli, D., Loh, K.M., Carter, A.C., Di Giorgio, F.P., Koszka, K., Huangfu, D., Akutsu, H., Liu, D.R., Rubin, L.L. & Eggan, K. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell* **5**, 491-503 (2009).
127. Cichocki, F., Felices, M., McCullar, V., Presnell, S.R., Al-Attar, A., Lutz, C.T. & Miller, J.S. Cutting edge: microRNA-181 promotes human NK cell development by regulating Notch signaling. *J Immunol* **187**, 6171-6175 (2011).
128. Wang, B., Hsu, S.H., Majumder, S., Kutay, H., Huang, W., Jacob, S.T. & Ghoshal, K. TGFbeta-mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3. *Oncogene* **29**, 1787-1797 (2010).
129. Wang, Y., Yu, Y., Tsuyada, A., Ren, X., Wu, X., Stubblefield, K., Rankin-Gee, E.K. & Wang, S.E. Transforming growth factor-beta regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM. *Oncogene* **30**, 1470-1480 (2011).
130. Melton, C., Judson, R.L. & Blelloch, R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* **463**, 621-626 (2010).
131. O'Loghlen, A., Munoz-Cabello, A.M., Gaspar-Maia, A., Wu, H.A., Banito, A., Kunowska, N., Racek, T., Pemberton, H.N., Beolchi, P., Laval, F., Masui, O., Vermeulen, M., Carroll, T., Graumann, J., Heard, E., Dillon, N., Azuara, V., Snijders, A.P., Peters, G., Bernstein, E. & Gil, J. MicroRNA regulation of Cbx7 mediates a switch of Polycomb orthologs during ESC differentiation. *Cell Stem Cell* **10**, 33-46 (2012).
132. Wang, H., Tao, T., Yan, W., Feng, Y., Wang, Y., Cai, J., You, Y., Jiang, T. & Jiang, C. Upregulation of miR-181s reverses mesenchymal transition by targeting KPNA4 in glioblastoma. *Sci Rep* **5**, 13072 (2015).
133. Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S. & Meissner, A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* **454**, 49 (2008).
134. Marson, A., Foreman, R., Chevalier, B., Bilodeau, S., Kahn, M., Young, R.A. & Jaenisch, R. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* **3**, 132-135 (2008).
135. Redmer, T., Diecke, S., Grigoryan, T., Quiroga-Negreira, A., Birchmeier, W. & Besser, D. E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO Rep* **12**, 720-726 (2011).
136. Hossini, A.M., Quast, A.S., Plotz, M., Grauel, K., Exner, T., Kuchler, J., Stachelscheid, H., Eberle, J., Rabien, A., Makrantonaki, E. & Zouboulis, C.C.

PI3K/AKT Signaling Pathway Is Essential for Survival of Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS One* **11**, e0154770 (2016).

137. Montero, J.A., Kilian, B., Chan, J., Bayliss, P.E. & Heisenberg, C.P. Phosphoinositide 3-kinase is required for process outgrowth and cell polarization of gastrulating mesendodermal cells. *Curr Biol* **13**, 1279-1289 (2003).
138. Jin, X., Zhu, L., Cui, Z., Tang, J., Xie, M. & Ren, G. Elevated expression of GNAS promotes breast cancer cell proliferation and migration via the PI3K/AKT/Snail1/E-cadherin axis. *Clinical and Translational Oncology* (2019).
139. Zhou, G.L., Tucker, D.F., Bae, S.S., Bhatheja, K., Birnbaum, M.J. & Field, J. Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration. *J Biol Chem* **281**, 36443-36453 (2006).
140. Liu, H., Radisky, D.C., Nelson, C.M., Zhang, H., Fata, J.E., Roth, R.A. & Bissell, M.J. Mechanism of Akt1 inhibition of breast cancer cell invasion reveals a protumorigenic role for TSC2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4134-4139 (2006).
141. Maurer, U., Preiss, F., Brauns-Schubert, P., Schlicher, L. & Charvet, C. GSK-3 – at the crossroads of cell death and survival. *Journal of cell science* **127**, 1369 (2014).
142. Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T.W. & Smith, A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* **6**, e253 (2008).
143. Vidal, S.E., Amlani, B., Chen, T., Tsigos, A. & Stadtfeld, M. Combinatorial modulation of signaling pathways reveals cell-type-specific requirements for highly efficient and synchronous iPSC reprogramming. *Stem Cell Reports* **3**, 574-584 (2014).
144. Aulicino, F., Theka, I., Ombrato, L., Lluís, F. & Cosma, M.P. Temporal perturbation of the Wnt signaling pathway in the control of cell reprogramming is modulated by TCF1. *Stem Cell Reports* **2**, 707-720 (2014).
145. Ho, R., Papp, B., Hoffman, J.A., Merrill, B.J. & Plath, K. Stage-specific regulation of reprogramming to induced pluripotent stem cells by Wnt signaling and T cell factor proteins. *Cell Rep* **3**, 2113-2126 (2013).
146. Baum, C., von Kalle, C., Staal, F.J., Li, Z., Fehse, B., Schmidt, M., Weerkamp, F., Karlsson, S., Wagemaker, G. & Williams, D.A. Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol Ther* **9**, 5-13 (2004).
147. Parchem, R.J., Ye, J., Judson, R.L., LaRussa, M.F., Krishnakumar, R., Blelloch, A., Oldham, M.C. & Blelloch, R. Two miRNA clusters reveal

- alternative paths in late-stage reprogramming. *Cell Stem Cell* **14**, 617-631 (2014).
148. Augustyniak, J., Zychowicz, M., Podobinska, M., Barta, T. & Buzanska, L. Reprogramming of somatic cells: possible methods to derive safe, clinical-grade human induced pluripotent stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **74**, 373-382 (2014).
  149. Cheng, L., Hansen, N.F., Zhao, L., Du, Y., Zou, C., Donovan, F.X., Chou, B.K., Zhou, G., Li, S., Dowey, S.N., Ye, Z., Chandrasekharappa, S.C., Yang, H., Mullikin, J.C. & Liu, P.P. Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. *Cell Stem Cell* **10**, 337-344 (2012).
  150. Sugiura, M., Kasama, Y., Araki, R., Hoki, Y., Sunayama, M., Uda, M., Nakamura, M., Ando, S. & Abe, M. Induced pluripotent stem cell generation-associated point mutations arise during the initial stages of the conversion of these cells. *Stem Cell Reports* **2**, 52-63 (2014).
  151. Kogut, I., McCarthy, S.M., Pavlova, M., Astling, D.P., Chen, X., Jakimenko, A., Jones, K.L., Getahun, A., Cambier, J.C., Pasmooij, A.M.G., Jonkman, M.F., Roop, D.R. & Bilousova, G. High-efficiency RNA-based reprogramming of human primary fibroblasts. *Nat Commun* **9**, 745 (2018).
  152. Yoshihara, M., Hayashizaki, Y. & Murakawa, Y. Genomic Instability of iPSCs: Challenges Towards Their Clinical Applications. *Stem cell reviews* **13**, 7-16 (2017).

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Klassifikation von miRNAs.....	9
Abb. 2: Schema der miRNA-Biogenese.....	10
Abb. 3: Die Familie der ESCC-miRNAs und ihre Sequenzen.....	11
Abb. 4: Schematische Darstellung der Reprogrammierung.....	13
Abb. 5: Gewinnung und mögliche Anwendung von iPSCs .....	14
Abb. 6: Der PI3K/Akt-Signalweg .....	16
Abb. 7: Der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg.....	18
Abb. 8: Gating von Zellen in der Durchflusszytometrie .....	30
Abb. 9: Luciferase-Reporterplasmide für den kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg .....	36
Abb. 10: Das Transferplasmid pSin-EF2-GFP-302-Sponge-Pur .....	39
Abb. 11: Petrischalen-Beladung mit verschiedenen Medien bei der Blastozysteninjektion	43
Abb. 12: Wirkungsweise des GFP-302-Sponge-Konstruktes .....	48
Abb. 13: Mikrotiterplatten-Schema für den HCI-fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Mimic-Aktivität.....	49
Abb. 14: HCI-Fluoreszenzmikroskopie während des Sponge-Experimentes .....	50
Abb. 15: Quantitative Analyse der fluoreszenz-mikroskopisch erfassten Reporteraktivität..	51
Abb. 16: Versuchsaufbau zur durchflusszytometrischen Fluoreszenzmessung .....	51
Abb. 17: Durchflusszytometrisches Zell-Gating über die GFP-Fluoreszenzintensität.....	52
Abb. 18: GFP-Fluoreszenz miR-302b-transfizierter Reporterfibroblasten (Histogramm)....	53
Abb. 19: Zeitverlauf der GFP-Fluoreszenz nach Transfektion von miR-302b in MEFs .....	54
Abb. 20: Schema der Reprogrammierung von MEFs zu iPSCs .....	55
Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung potenzieller iPSC-Kolonien .....	56
Abb. 22: Reprogrammierungs-Effizienz bei Mimic-Transfektion an Tag 1 und 7.....	56
Abb. 23: Reprogrammierungs-Effizienz bei Mimic-Transfektion an Tag 1, 5, 9 oder 13.....	57
Abb. 24: Reprogrammierungs-Effizienz bei kombinierter Mimic-Transfektion .....	58
Abb. 25: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Pluripotenzmarker-Expression .....	59
Abb. 26: Schema der Blastozysteninjektion und der Prüfung auf Chimärismus.....	61

Abb. 27: Mikroskopische Analyse des Chimärismus in E12,5-Embryos.....	62
Abb. 28: Westernblot-Analyse des PI3K/Akt-Signalweges .....	64
Abb. 29: Quantitative Auswertung der Westernblots des PI3K/Akt-Signalwegs.....	66
Abb. 30: Immunzytochemischer Nachweis der subzellulären Lokalisation von $\beta$ -Catenin .	68
Abb. 31: Quantitative Auswertung der subzellulären Lokalisation von $\beta$ -Catenin .....	69
Abb. 32: Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegsaktivität im Luciferase-Assay .....	71
Abb. 33: Modell des Einflusses von miR-294 und miR-181d auf die OSK-Reprogrammierung in MEFs.....	74

# TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: miRNA-Expression in pluripotenten Stammzellen .....	12
Tabelle 2: Geräte .....	21
Tabelle 3: Software .....	21
Tabelle 4: Verbrauchsmaterial .....	21
Tabelle 5: Chemikalien, Färbemittel, Reagenzien, Kits .....	23
Tabelle 6: Puffer, Substanzen, Nährmedien .....	24
Tabelle 7: Antikörper, Liganden .....	24
Tabelle 8: Plasmide und miRNA .....	25
Tabelle 9: Verwendete Organismen .....	25
Tabelle 10: Karyotypisierung der durch OSK-Reprogrammierung und miR-181d erzeugten iPSCs .....	63

# DANKSAGUNG

Ich danke

... meinem Doktorvater Professor Dr. Christian Ries.

... meinem Promotionsbetreuer an der LMU München Dr. Peter Neth.

... meinen Promotionsbetreuern an der UCSF Dr. Robert Judson und Prof. Dr. Robert Blelloch.

... Prof. Dr. Heesemann für die Unterstützung im Rahmen des FöFoLe Stipendiums.

... meinen Kollegen im amerikanischen Labor, insbesondere Dr. Ronald Parchem für das Lehren der aufwendigen Blastozysteninjektionstechnik.

... meinen Eltern für ihre Unterstützung.

... und Romina für ihre Unterstützung und Geduld während langer Labortage und während meines Auslandsaufenthaltes