

# **Pluripotenzerhaltung von Mausstammzellen in Abhängigkeit des PI3K/Akt Signalwegs**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Britta Merz  
aus Balingen

Tübingen  
2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

24.11.2017

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Michael Schwarz

## Zusammenfassung

Aufgrund der steigenden Lebenserwartung nehmen degenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer oder Diabetes deutlich zu. Momentan können bei diesen Erkrankungen jedoch nur die Symptome, nicht aber deren Ursachen behandelt werden. Ein Forschungsansatz hierzu stellt die regenerative Medizin dar. Diese beschäftigt sich mit der möglichen zellbasierten Ersetzung von beschädigtem Gewebe oder Organen. Hierzu könnten beispielsweise Stammzellen aufgrund ihrer unbegrenzten Teilungsfähigkeit und ihrer Fähigkeit, Zelltypen aller Gewebe auszubilden, einen wichtigen Beitrag leisten. Da die Forschung mit humanen Stammzellen ethisch und rechtlich bedenklich ist, bietet sich das murine Modellsystem für die Erforschung von Stammzeleigenschaften an. Für eine gezielte Differenzierung von Stammzellen ist es wichtig, zuvor grundlegende Eigenschaften wie beispielsweise pluripotenzrelevante Signalwege, genau zu verstehen. Ein wichtiger Signalweg im Zusammenhang mit der Pluripotenzerhaltung in murinen Stammzellen (mES Zellen) stellt der PI3K/Akt Signalweg dar. Bisherige Erkenntnisse zeigen, dass die Inhibition von PI3K den Verlust der pluripotenten Fähigkeit von mES Zellen zur Folge hat. Es gibt Hinweise darauf, dass dies hauptsächlich auf eine Hemmung der Serin/Threonin Kinase Akt zurückgehen soll. Akt soll die Pluripotenz zum einen über die Hochregulation pluripotenzassoziierter Transkriptionsfaktoren und zum anderen durch eine direkte Stabilisierung pluripotenzrelevanter Proteine regulieren. So führt die Aktivierung von Akt beispielsweise zu einer Hochregulation der Transkriptionsfaktoren Tbx3 und Nanog, die wiederum die Expression von Oct4 und Sox2 induzieren. Oct4 und Sox2 können durch die Phosphorylierung durch Akt direkt stabilisiert werden. Da bisher noch nicht bekannt war, ob eine oder mehrere der Akt Isoformen bedeutend für die Pluripotenzerhaltung von mES Zellen ist, sollte dies in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden. Dafür wurden als erstes mittels der TALEN Technologie Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen generiert, die erstaunlicher Weise ohne einen Verlust ihrer pluripotenten Fähigkeit kultiviert werden konnten. Um auszuschließen, dass der Verlust von Akt1 durch Akt2 kompensiert wird, wurde in diesen Zellen zusätzlich Akt2 shRNA basiert herunterreguliert. Unerwarteter Weise hatte der Verlust beider Akt Isoformen keinen Effekt auf die Pluripotenzerhaltung in den Stammzellen, was mit verschiedenen Assays, wie der Nachweis der Alkalischen Phosphatase Aktivität, der Expression pluripotenzrelevanter Transkriptionsfaktoren auf mRNA- und Proteinebene, sowie der Differenzierungsfähigkeit in Zellen aller drei Keimblätter, gezeigt werden konnte. Es gab keine Hinweise auf eine mögliche Kompensation des Verlusts der beiden Isoformen durch Akt3 noch durch eine veränderte Regulation der anderen beiden pluripotenzassozierten Signalwege JAK/STAT und MAPK. Es wurde ebenfalls nachgewiesen, dass der Verlust der Pluripotenz bei der Inhibition von PI3K

nicht auf eine verminderte Aktivierung PDK1 zurückzuführen ist, da eine Inhibition von PDK1 oder eine Herunterregulation des Proteins mit shRNA die Pluripotenz der verwendeten mES Zellen nicht beeinträchtigt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine unspezifische Inhibition von mTOR durch einen PI3K Inhibitor ebenfalls nicht für den Verlust der Pluripotenz der Stammzellen verantwortlich ist, da die Inhibition von mTOR mit Rapamycin nur die Proliferation der Zellen beeinflusst. Entgegen der Annahmen in der Literatur wird in dieser Arbeit somit dargelegt, dass der Verlust der Pluripotenz durch eine Inhibition der PI3K in V6.4 mES Zellen nicht auf eine damit einhergehende Inaktivierung der Akt Isoformen 1 und 2 zurück zu führen ist und es somit offen bleibt, wie genau die Inhibition von PI3K einen negativen Effekt auf die Pluripotenzerhaltung der Stammzellen hat.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
Inhaltsverzeichnis .....	I
1 Abkürzungsverzeichnis.....	V
2 Einleitung .....	1
2.1 Embryonale Mausstammzellen .....	3
2.2 Regulation der Pluripotenz von mES Zellen .....	5
2.2.1 Pluripotenzassoziierte Transkriptionsfaktoren .....	9
2.2.2 Sekundär pluripotenzassoziierte Transkriptionsfaktoren.....	11
2.3 Der PI3K/Akt Signalweg .....	13
2.3.1 Regulation des PI3K/Akt Signalwegs .....	13
2.3.2 Der PI3K/Akt Signalweg und Apoptose .....	14
2.3.3 PI3K/Akt Signalweg und Proteinsynthese/Proliferation.....	15
2.3.4 PI3K Signalweg und Metabolismus .....	15
2.3.5 PI3K/Akt Signalweg und Angiogenese .....	16
2.4 Akt-Isoformen.....	16
2.5 Die Rolle des PI3K/Akt Signalwegs bei der Pluripotenzerhaltung .....	18
2.6 Zielsetzung.....	19
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Geräte und Software .....	20
3.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	20
3.3 Methoden .....	30
3.3.1 Zellbiologische Methoden.....	30
3.3.1.1 Isolierung und Mitomycin C-Behandlung von MEFs .....	30
3.3.1.2 Kultivierung Embryonaler Mausfibroblasten (MEFs).....	30
3.3.1.3 Ausbringen von Feederlayerzellen .....	31
3.3.1.4 Beschichtung von Zellkulturplatten mit Gelatine .....	31
3.3.1.5 Bestimmung der Zellzahl und Ausplattieren von Zellen .....	31

3.3.1.6	Kultivierung von embryonalen Mausstammzellen (mES Zellen) .....	31
3.3.1.7	Auftauen von in Stickstoff gelagerten Zellen.....	31
3.3.1.8	Kryokonservierung von Zellen .....	32
3.3.1.9	Kultivierung von HEK 293 T Zellen.....	32
3.3.1.10	Transfektion von HEK 293 T Zellen.....	32
3.3.1.11	Generierung stabiler Zelllinien mittels TALEN-Technologie .....	32
3.3.1.12	shRNA vermittelter knockdown in mES Zellen.....	34
3.3.1.13	Ungerichtete Differenzierung vom mES Zellen .....	35
3.3.2	Immunbiologische Methoden.....	35
3.3.2.1	Gewinnung von Gesamtzellextrakten .....	35
3.3.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten.....	36
3.3.2.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	36
3.3.2.4	Detektion der Alkalischen Phosphatase-Aktivität in pluripotenten Zellen ..	36
3.3.2.5	Western Blot .....	36
3.3.2.6	Immunfluoreszenz- und Fluoreszenzmikroskopie.....	37
3.3.3	Molekularbiologische Methoden .....	38
3.3.3.1	RNA-Isolierung.....	38
3.3.3.2	Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion .....	38
3.3.3.3	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) .....	38
3.3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	39
3.3.3.5	Agarosegelelektrophorese .....	40
3.3.3.6	DNA-Extraktion nach Amplifizierung und Sequenzierung .....	40
4	Ergebnisse .....	41
4.1	Die Inhibierung des PI3K Signalwegs in mES Zellen führt in Stammzellen zu einem Verlust der Pluripotenz.....	41
4.2	Stammzellen behalten bei Herunterregulation von Akt ihre Fähigkeit der Selbsterneuerung bei.....	44
4.2.1	Generierung von Akt1 defizienten mES Zellen mittels TALEN Technologie ....	44
4.2.2	Akt1 knockout Zellen sind pluripotent und weisen im Vergleich zu wildtyp Zellen keine Veränderungen bezüglich Morphologie und Proliferation auf .....	45

4.2.3	Sowohl wt als auch Akt1 <sup>-/-</sup> mES Zellen zeigen LIF-abhängige Phosphorylierung von Stat3 und ERK1/2.....	50
4.2.4	Stammzellen behalten ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowohl bei einem knockdown von Akt2 als auch bei einem Doppelknockdown von Akt1 und Akt2 bei .....	52
4.2.5	Akt2 knockdown und Akt1/Akt2 knockdown mES Zellen zeigen das selbe LIF-abhängige Proliferationsverhalten wie wt Zellen .....	54
4.2.6	Akt2 und Akt1/Akt2 defiziente mES Zellen können in Zellen der drei Keimblätter differenzieren .....	56
4.2.7	Akt2 und Akt1/Akt2 defiziente mES Zellen zeigen die selbe LIF-abhängige Phosphorylierung von Stat3 und ERK1/2 .....	58
4.2.8	Stammzellen behalten bei Inhibition von Akt mit MK-2206 ihre Fähigkeit der Pluripotenz .....	60
4.3	Stammzellen behalten bei Inhibition von PDK1 ihr Selbsterneuerungspotential .....	62
4.4	Die Inhibition von mTOR führt zu einer geringeren Proliferation in wt und Akt defizienten Stammzellen.....	64
4.5	Die Inhibition des JAK Signalweges führt zu einem geringeren Selbsterneuerungspotential in wt und Akt defizienten Stammzellen.....	67
4.6	Der knockout von Akt1 in V6.4 mES Zellen führt zu einer Herunterregulation verschiedener Gene im WNT/β-Catenin Signalweg .....	71
5	Diskussion.....	74
5.1	Die Inhibition von PI3K beeinflusst die Pluripotenz von Stammzellen .....	76
5.2	Stammzellen behalten bei Inhibition von Akt ihren pluripotenten Zustand bei.....	77
5.2.1	Akt1 defiziente Stammzellen erneuern sich selbst und zeigen dasselbe Proliferationsverhalten wie wt Zellen .....	77
5.3	Der Verlust von Akt1 in mES Zellen beeinflusst weder den JAK/STAT noch den MAPK Signalweg .....	79
5.4	Stammzellen behalten ihre Fähigkeit der Pluripotenzerhaltung bei einem gleichzeitigen Verlust von Akt1 und Akt2 bei.....	79
5.5	Stammzellen behalten ihren pluripotenten Zustand bei der Herunterregulation von PDK1 bei .....	81
5.6	Die Inhibition von mTOR beeinflusst die Proliferation von V6.4 mES Zellen.....	82
5.7	Die Inhibition des JAK/STAT Signalwegs beeinflusst die Pluripotenz in V6.4 mES Zellen	84

5.8	Herunterregulation von Genen im WNT Signalweg bei einem Akt1 knockout.....	84
5.9	Abschließende Bemerkungen und Ausblick .....	86
6	Literaturverzeichnis .....	91
7	Erklärung zum Eigenanteil.....	99
8	Lebenslauf.....	100
9	Eidesstattliche Erklärung.....	101



# 1 Abkürzungsverzeichnis

-/-	Homozygoter <i>knockout</i>
AFP	$\alpha$ -Fetoprotein
AP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BAD	<i>Bcl-2-Antagonist of Cell Death</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bp	Basenpaare
Brg1	<i>Brahama-related gene 1</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CBP	CREB <i>binding protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CKI	<i>casein kinase I</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CT	<i>threshold cycle</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
Dsh	Dishevelled
DTT	Dithiothreitol
EB	<i>embryoid body</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>

EpiS Zellen	Epiblasten Stammzellen
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
et al.	<i>et alii</i> , und andere
EZH2	<i>enhancer of Zeste homolog 2</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
Fbxo15	F-Box Protein 15
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
FOXO	<i>Forkhead Box Protein</i>
Fz	Frizzled Receptor
Grb2	<i>growth-factor-receptor-bound protein 2</i>
GSK	Glycogensynthasekinase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	hypoxia-inducible factor 1-alpha
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> , humanes Leukozytenantigen
HMG	<i>high mobility group</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
ICM	<i>inner cell mass</i> , Innere Zellmasse
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IGF1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IL	Interleukin
ILK	<i>Integrin linked kinase</i>
iPS Zelle	<i>induced pluripotent stem cell</i> , induzierte pluripotente Stammzelle
JAK	Janus Kinase
Klf4	<i>krüppel-like factor 4</i>
ko	knockout
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LRP	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDM2	<i>mouse double minute 2</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MEK	MAPK/ERK kinase
mEpiSC	<i>mouse epiblast stem cell</i>
mES Zellen	Maus embryonale Stammzellen

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

mESC	<i>mouse embryonic stem cell</i> , embryonale Mausstammzelle
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
muLV	murines Leukämievirus
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
Oct4	<i>octamer-binding transcription factor 4</i>
OSKM	Yamanaka Faktoren: Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PBS/T	PBS mit Tween
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKB	Proteinkinase B
Pou5f1	POU class 5 homeobox 1
PRAS	Prolinreiches Akt-Substrat
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PWB	Phos-tag™WB
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time-PCR</i>
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RIPA-Puffer	Radioimmunopräzipitations Assay - Puffer
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SCNT	<i>somatic cell nuclear transfer</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
Ser	Serin
SH2	<i>Src-homology 2</i>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SMA	<i>smooth muscle actin</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
Sox	<i>sex determining region Y-box</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAL	<i>transcription activator-like</i>
TALENs	TAL-Effektor Nukleasen
TBS	<i>Tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
Tbx3	<i>T-box transcription factor3</i>
TCF/LEF	<i>T-cell factor/lymphoid-enhancer-binding factor</i>
Tcf3	<i>E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin
TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
Thr	Threonin
TSC	<i>tuberous sclerosis complex</i>
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WB	Western Blot

## 2 Einleitung

Embryonale Stammzellen (ES Zellen) haben aufgrund ihres pluripotenten Status, der Eigenschaft sich selbst zu erneuern und ihrer Fähigkeit, Zellen aller drei Keimblätter auszubilden, besonders für entwicklungsbiologische Forschung und für therapeutische Ansätze in der regenerativen Medizin Potential. Regenerative Medizin beschäftigt sich hauptsächlich mit der Regeneration von funktionellem Gewebe oder Organen nach schweren oder chronischen Krankheiten. Beispielsweise ist der Verlust von funktionellen Nervenzellen bei neurodegenerativen Erkrankungen oder der Verlust von Kardiomyozyten nach einem Infarkt bisher irreversibel, da sich die Gewebe *in vivo* nicht regenerieren können. Pluripotente Stammzellen, die in alle Zelltypen differenziert werden können, könnten daher in der Zukunft einen wichtigen Beitrag zur regenerativen Medizin leisten. Ein weiterer Vorteil von Stammzellen liegt in ihrer unbegrenzten Teilungsfähigkeit, weshalb sie eine Quelle an unbegrenzt zur Verfügung stehenden Zellen darstellen (Robinton & Daley, 2012). Bisher gibt es verschiedene zellbasierte Therapien, die in Tierstudien getestet wurden. In Modellen für Morbus Parkinson wurden beispielsweise schon dopaminerge Neurone, die aus pluripotenten Stammzellen generiert wurden, erfolgreich in Mäuse implantiert (Ganat et al., 2012; Roy et al., 2006). Mit aus ES Zellen generierten Kardiomyozyten konnte bereits die Funktion des Herzmuskels nach einem Herzinfarkt bei Mäusen verbessert werden (Laflamme et al., 2007). Andere Krankheiten, die potentiell auf der Basis von Stammzelltherapien behandelt werden könnten, sind Leberkrankheiten, endokrine Störungen wie beispielsweise bei Diabetes, Muskel-, Lungen-, Retina- und Knochendegeneration (Mahla, 2016).

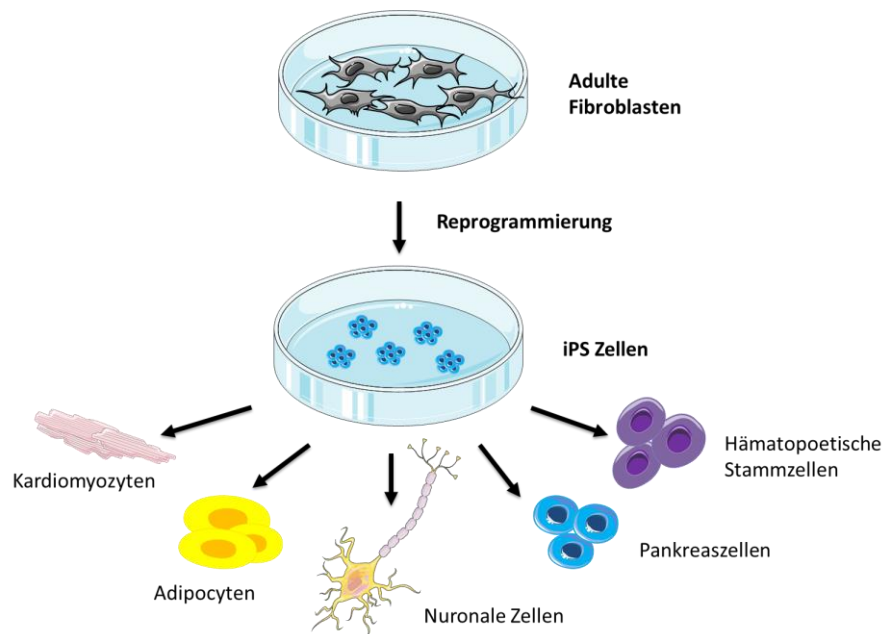
Ein anderer wichtiger Aspekt der Stammzellforschung betrifft den Bereich der Toxikologie. Viele Primärzellen können nur begrenzt für Forschungszwecke gewonnen werden. Zum Beispiel können Leberzellen nur über eine Leberbiopsie entnommen werden. Eine Entnahme von Zellen aus anderen Geweben ist noch komplizierter. Da viele Medikamente über die Leber verstoffwechselt werden, sind Leberzellen relevant für toxikologische *screenings*. Viele Medikamente sind auch kardio- und/oder neurotoxisch, weshalb diese Zelltypen ebenfalls ein wichtiges *screeningtool* darstellen. Pluripotente Stammzellen könnten daher eine unlimitierte Quelle für die Anwendung toxikologischer *screenings* darstellen und so auch die Anzahl an Tierexperimenten verringern (Guguen-Guillouzo, Corlu, & Guillouzo, 2010; Vojnits & Bremer, 2010).

Die Stammzelltechnologie birgt jedoch enormes ethisches Diskussionspotential, primär im Zusammenhang mit der Verwerfung von humanen Oozyten und Embryonen (Zacharias, Nelson, Mueller, & Hook, 2011). Ein weiteres Problem stellt die HLA-Spezifität differenzierter

humaner ES Zellen dar. So benötigen beispielsweise Gewebeempfänger bei Organtransplantationen eine zusätzliche immunsuppressive Therapie um Abstoßungsreaktionen zu minimieren. Eine neue Quelle zur Generierung patientenspezifischer pluripotenter Stammzellen stellt die Entdeckung der Reprogrammierung somatischer Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS Zellen) von Kazutoshi Takahashi und Shinya Yamanka im Jahr 2006 dar. Ein Jahr später wurde die erste erfolgreiche Generierung humaner iPS Zellen aus Fibroblasten publiziert (Takahashi et al., 2007). Aus den humanen Fibroblasten wurden über eine retrovirale Überexpression der sogenannten „Yamanaka-Faktoren“ Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc (OSKM) humane iPS Zellen generiert. Patientenspezifische iPS Zellen können seither ohne ethische Bedenken aus kleinen Gewebemengen (z.B. aus einer Hautbiopsie) gebildet werden (Muller & Lengerke, 2009) (Abbildung 2.1).

Die hauptsächliche Limitierung dieser Methode zur Reprogrammierung somatischer Zellen liegt in der Integration der viralen Erbinformation in das Wirtsgenom, was aufgrund einer möglichen spontanen Reaktivierung von viralen Transgenen mit einem erhöhten Tumorrisiko verbunden sein kann. Daher sind iPS Zellen, die mit Retroviren hergestellt wurden, nicht für die klinische Anwendung geeignet. Deshalb wurden andere Methoden zur Herstellung der iPS Zellen etabliert. Dazu gehören die Reprogrammierung mit nicht-integrativen Adenoviren (Stadtfeld, Nagaya, Utikal, Weir, & Hochedlinger, 2008) oder Sendaiviren (Fusaki, Ban, Nishiyama, Saeki, & Hasegawa, 2009), nicht-integrativer DNA (F. Gonzalez, Boue, & Izpisua Belmonte, 2011), RNA (Warren et al., 2010), rekombinanten Proteinen (H. Zhou et al., 2009) und „*small molecules*“ (F. Gonzalez et al., 2011).

Die molekularen Ereignisse während der Reprogrammierung sind jedoch noch nicht vollständig erforscht und bei reimplantierten iPS Zellen in Mäuse, wurde in einigen Fällen eine Erkennung der Zellen durch das Immunsystem festgestellt (T. Zhao, Zhang, Rong, & Xu, 2011). Um eine mögliche Tumorentstehung zu verhindern, muss bei einer Reimplantation der aus iPS Zellen hervorgegangenen differenzierten Zellen sichergestellt werden, dass keine pluripotenten Zellen mehr vorhanden sind. Bevor also aus iPS Zellen spezifisch differenzierte Gewebezellen in Patienten reimplantiert werden können, bedarf es noch weitreichender Studien zur immunogenen Erkennung, Tumorbildungspotential und molekularen Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede zu ES Zellen.



**Abbildung 2.1: Gewinnung patientenspezifischer induzierter Stammzellen mit anschließender Differenzierung.**

Adulte Fibroblasten können *in vitro* kultiviert werden und beispielsweise über die ektopische Überexpression der vier Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc zu iPS Zellen reprogrammiert werden. Die iPS Zellen besitzen wie ES Zellen, die Fähigkeit, in alle Zelltypen des Körpers zu differenzieren. Die schematische Darstellung wurde mit Hilfe von *Servier Medical Art* erstellt.

## 2.1 Embryonale Mausstammzellen

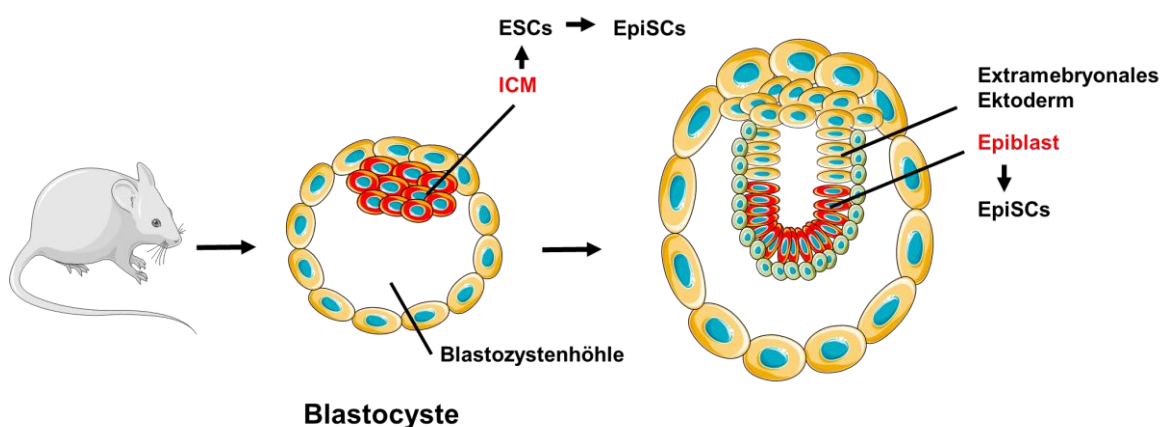
ES Zellen sind pluripotent. Sie besitzen also die Fähigkeit über multipotente Vorläuferzellen Zelltypen aller drei Keimblätter (mesodermal, endodermal und ektodermal) auszubilden (Hirai, Karian, & Kikyo, 2011). Im Gegensatz zu totipotenten Zellen (befruchtete Eizelle bis zum Achtzellstadium) kann sich aus pluripotenten Zellen kein extraembryonales Plazentagewebe entwickeln.

Eine grundlegende Eigenschaft von Stammzellen ist die Fähigkeit der unbegrenzten Teilung. Um die unbegrenzte Teilungsfähigkeit aufrecht erhalten zu können, exprimieren die Zellen das Enzym Telomerase. Andernfalls würden die Telomere bei jeder Zellteilung aufgrund des Hayflick Limits (Goldstein, 1990) verkürzt werden. ES Zellen können daher nach deren Entnahme aus der inneren Zellmasse (ICM) der Blastocyste *in vitro* unbegrenzt kultiviert werden (Zeng, 2007). Im Jahre 1981 wurden zum ersten Mal ES Zellen aus der Maus (mES Zellen) isoliert und erfolgreich auf einer Feederzellschicht aus mitotisch inaktivierten embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) kultiviert (Evans & Kaufman, 1981). *In vitro* können mES Zellen durch die Zugabe des IL-6-Typ-Zytokins LIF (*leukaemia inhibitory factor*) zum

Medium ihren pluripotenten Zustand auch ohne Kultivierung auf einer Feederzellschicht beibehalten (Smith et al., 1988).

Der pluripotente Status von mES Zellen wird *in vitro* durch mehrere Merkmale charakterisiert: Morphologisch betrachtet wachsen die Zellen in kuppelförmigen Kolonien mit einer deutlichen äußeren Begrenzung, wobei einzelne Zellgrenzen bei geringer Vergrößerung nicht sichtbar sind (Robinton & Daley, 2012). Außerdem sind die Zellen nach enzymatischer Vereinzelnung überlebensfähig und können embryoähnliche Aggregate (*embryoid bodies*, EBs) ausbilden (Koike, Sakaki, Amano, & Kurosawa, 2007). Des Weiteren führt eine Implantation von mES Zellen in tetraploide Blastozysten zur Entwicklung von gesunden Mäusen. Werden mES Zellen in immundefiziente Mäuse implantiert, führt dies zur Ausbildung von Teratomen. Ein zusätzliches Pluripotenzenmerkmal weiblicher mES Zellen ist der Aktivitätserhalt beider X-Chromosomen (Hall et al., 2009).

In einem späteren Entwicklungsstadium können pluripotente Stammzellen aus dem Epiblast isoliert und kultiviert werden. Die Epiblasten Stammzellen der Maus (mEpiS Zellen) können auch durch eine *in vitro* Differenzierung von mES Zellen erhalten werden (Abbildung 2.2). Im Gegensatz zu mES Zellen wachsen die mEpiS Zellen in flacheren Kolonien, sind nach Vereinzelnung nicht überlebensfähig und in weiblichen Zellen liegt ein X-Chromosom schon deaktiviert vor. Zudem zeigen die mEpiS Zellen keine LIF abhängige Selbsterneuerung. Der Erhalt der Pluripotenz wird in mEpiS Zellen über FGF2 und Aktin abhängige Signalwege gewährleistet (Warmflash, Arduini, & Brivanlou, 2012).



**Abbildung 2.2: Quellen zur Isolierung von mES und mEpiS Zellen.**

Aus der Inneren Zellmasse (ICM) der Blastozyste können ES Zellen für die Kultivierung entnommen werden. EpiS Zellen können durch Differenzierung von ES Zellen erhalten werden oder direkt aus dem Epiblast entnommen werden. Die Schematische Darstellung wurde mit Hilfe von *Servier Medical Art* erstellt.



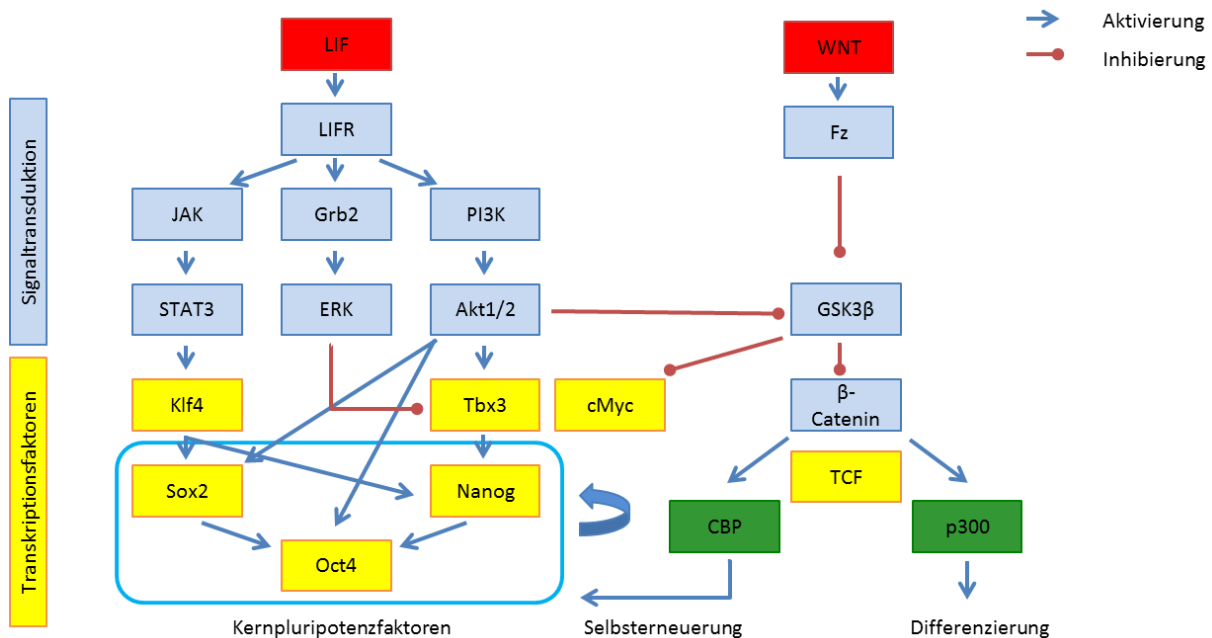
## 2.2 Regulation der Pluripotenz von mES Zellen

Charakteristisch für ES Zellen ist eine erhöhte Aktivität pluripotenzassoziierter Transkriptionsfaktoren und von Genen, die die Modellierung der Chromatinstruktur beeinflussen. Zusätzlich zu den spezifischen Transkriptionsfaktoren sind grundsätzliche epigenetische Mechanismen als Schlüsselfunktionen für den Erhalt der Pluripotenz notwendig. ES Zellen zeigen generell eine offene Chromatinkonfiguration (Gaspar-Maia, Alajem, Meshorer, & Ramalho-Santos, 2011), was mit einem hyperaktiven Transkriptom einhergeht (Efroni et al., 2008). Trotz der relativ offenen Chromatinstruktur in Stammzellen werden aber viele gewebespezifische Gene nur in geringen Mengen exprimiert (Gaspar-Maia et al., 2011). Heterochromatin in ES Zellen ist in wenige große Domänen unterteilt, die bei einer Differenzierung der Zellen kleiner, weniger und hyperkondensiert werden (Aoto & Nakao, 2006). Während der Differenzierung von ES Zellen erfolgt eine weitreichende epigenetische Modifizierung der Chromatinstruktur (Efroni et al., 2008).

Die Selbsterneuerung von mES Zellen wird durch die Aktivierung eines Netzwerks aus Transkriptionsfaktoren aufrechterhalten. Ein Schlüsselmediator für die Selbsterneuerung von mES Zellen *in vitro* ist das Zytokin LIF (Niwa, Ogawa, Shimosato, & Adachi, 2009). Nach der extrazellulären Bindung von LIF an den LIF Rezeptor, werden drei intrazelluläre Hauptsignalwege aktiviert: Die JAK/STAT3, MAPK und PI3K/AKT Signalwege. Über die Aktivierung des JAK/STAT3 und PI3K/Akt Signalwegs wird die Kerneinheit der pluripotenzassozierten Transkriptionsfaktoren, bestehend aus Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 und cMyc aktiviert (Niwa, 2007) (siehe Abbildung 2.3). Obwohl LIF das einzige routinemäßig in der Zellkultur verwendete IL-6 Mitglied ist, können auch andere IL-6 Zytokine wie Oncostatin M, Ciliary Neurotrophic Factor und Cardiotrophin 1 die Selbsterneuerung in mES Zellen erhalten (Hirai et al., 2011).

Der LIF/JAK/STAT Signalweg wurde schon eingehend untersucht und die zentrale Rolle der Stat3 Aktivierung bei der Selbsterneuerung von mES Zellen beschrieben (Hirai et al., 2011). Durch die Bindung von LIF an den LIF Rezeptor, rekrutiert dieser das Membranglycoprotein-130 (gp130), welches dimerisiert und gebundene Janus Kinasen (JAK) über induzierte Transphosphorylierung aktiviert. JAK phosphoryliert anschließend gp130, welches daraufhin STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) über die SH2 Domäne binden kann. STAT3 wird an Thr705 durch JAK phosphoryliert und bildet anschließend Homodimere mit freigelegter Kernlokalisierungssequenz (NLS). Die STAT3 Dimere werden mit den nukleären Importproteinen Importin- $\alpha$ 3 und Importin- $\alpha$ 6 in den Zellkern transportiert, um dort die Expression spezifische Zielgene, darunter pluripotenzassozierte Gene wie Oct4, Sox2 und Nanog, zu induzieren (Abbildungen 2.3 und 2.4). Zusätzlich zu der LIF induzierten Aktivierung

von STAT3 wird dieses über den ebenfalls durch LIF stimulierten PI3K/Akt Signalweg CREB vermittelt acetyliert und somit stabilisiert (Niwa, Burdon, Chambers, & Smith, 1998).



**Abbildung 2.3: Die Aktivierung des LIF-Signalwegs führt zu einer verstärkten Expression der Kernpluripotenzfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog in mES Zellen.**

Die Bindung von LIF an den LIF Rezeptor aktiviert den JAK/STAT, PI3K/Akt und MAPK/ERK Signalweg. Der aktive JAK/STAT Signalweg führt zu einer Aktivierung von Klf4, welches wiederum die Expression von Sox2 induziert. Über den PI3K/Akt Signalweg wird die Expression und Kernlokalisierung von Tbx3 angeregt, wodurch die Expression von Nanog induziert wird. Sox2 und Nanog, sowie auch Oct4 selbst induzieren eine erhöhte Oct4 Expression. Die Kernpluripotenzfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog regulieren sich selbst transkriptionell positiv. Die Aktivierung des MAPK Signalwegs über ERK antagonisiert die Translokation von Tbx3 in den Zellkern. Eine Aktivierung des WNT/β-Catenin Signalwegs über den Frizzled Rezeptor (Fz) bewirkt über die Inhibition von GSK3β die Stabilisierung von β-Catenin, welches nach Bindung an die Cofaktoren TCF/LEF bzw. CBP/p300 im Zellkern transkriptionell aktiv vorliegt.

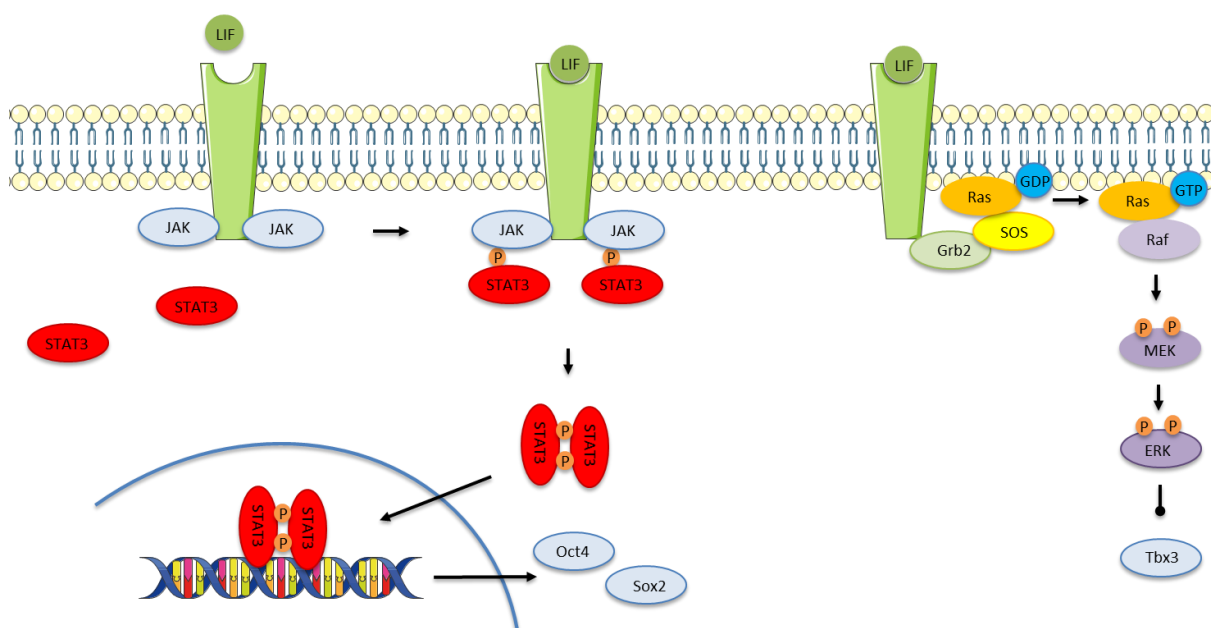
Die Aktivierung von STAT3 beeinflusst nicht nur direkt die Expression von Zielgenen, sondern ist auch durch Interaktionen mit chromatinmodifizierenden Proteinen an Änderungen der Chromatinstruktur beteiligt. Zu diesen Proteinen zählen unter anderen die ATPase Brg1, welche bei der Chromatinrelaxation beteiligt ist, und histonmodifizierende Proteine, wie beispielsweise Ctr9 im Paf1 Komplex, die entscheidend zur Aktivierung von Genen beitragen (Hirai et al., 2011).

Bei einer konstitutiven Aktivierung von STAT3 in Stammzellen, können diese ihr pluripotentes Potential auch in Abwesenheit von LIF beibehalten (Matsuda et al., 1999), wohingegen die

Suppression von STAT3 zu einer Differenzierung der Zellen führt (Burdon, Smith, & Savatier, 2002).

STAT3 ist außer an der murinen Fetalentwicklung auch an verschiedenen anderen zellulären Prozessen beteiligt. Es ist unter anderen auch ein wichtiges Signalmolekül für viele Zytokine und Wachstumsfaktoren (Takada et al., 2007). STAT3 ist auch in diversen humanen Tumoren in konstitutiv aktivierter Form zu finden und weist dort onkogenes Potential, sowie auch anti-apoptotische Aktivität auf (Catlett-Falcone et al., 1999).

An phosphoryliertes gp130 bindet außer STAT3 auch über SHP2 der Grb2/SOS-Komplex und führt so zu einer Aktivierung des MAPK Signalwegs. SOS2 bindet membrangebundenes Ras, woraufhin es zu einem Austausch von GDP mit GTP kommt. GTP gebundenes Ras wiederum phosphoryliert und aktiviert somit die Kinase Raf, die ihrerseits die Kinase MEK phosphoryliert und aktiviert. Aktives MEK phosphoryliert und aktiviert anschließend ERK (Abbildung 2.4).



**Abbildung 2.4: Die LIF induzierte Aktivierung des JAK/STAT und MAPK Signalwegs.**

Nach Bindung von LIF an den Rezeptor phosphoryliert rezeptorassoziiertes JAK STAT3, welches dimerisiert und in den Kern transloziert. Über die Aktivierung des Grb2/SOS Komplexes wird der MAPK Signalweg über die kaskadenartige Phosphorylierung von MEK und ERK aktiviert. Die schematische Darstellung wurde mit Hilfe von *Servier Medical Art* erstellt.

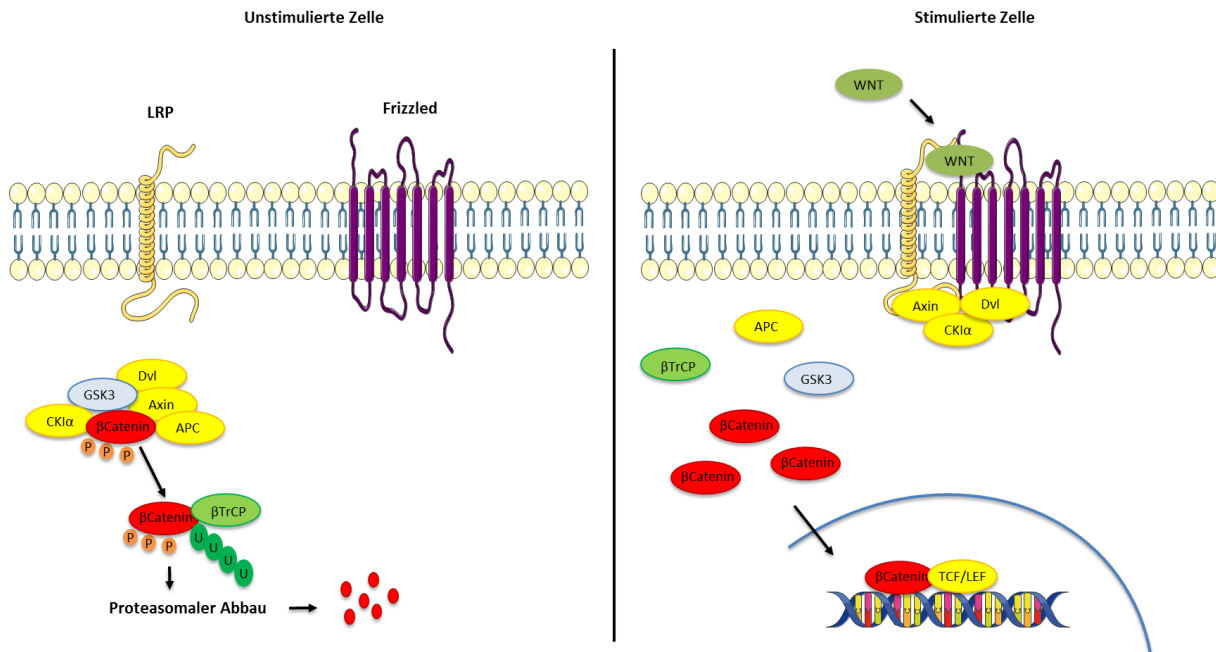
Im Gegensatz zu den parallel aktivierten JAK/STAT und PI3K/Akt Signalwegen antagonisiert der MAPK Signalweg die Expression der Kernpluripotenzfaktoren durch eine Induktion des nukleären Exports des T-box Transkriptionsfaktors Tbx3. Dies kann dazu führen, dass die Tbx3 induzierte Expression von Nanog nicht mehr gewährleistet werden kann (Hirai et al.,

2011). Die Aktivierung der MAPK Kaskade kann daher zur Differenzierung der Stammzellen führen (Kunath et al., 2007). Es scheint naheliegend, dass die gegenteiligen Effekte des MAPK Signalwegs und die des JAK/STAT und PI3K/Akt Signalwegs für die Selbsterneuerung von Stammzellen in stetiger Balance gehalten werden müssen.

Die Bindung von LIF an den LIF Rezeptor führt auch zu einer Aktivierung des PI3K/Akt Signalwegs. Der Fokus dieser Studie liegt auf dem PI3K/Akt Signalweg, weshalb dieser im nachfolgenden Abschnitt genauer behandelt wird.

Die Aktivierung des PI3K/Akt Signalwegs führt zu der Akt-vermittelten Phosphorylierung der Kinase GSK3 $\beta$ , was zu deren Inaktivierung führt. GSK3 $\beta$  wird nicht nur durch den aktiven PI3K/Akt Signalweg, sondern auch über einen aktiven WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg gehemmt. Bei einem inaktiven WNT Signalweg wird  $\beta$ -Catenin von GSK3 $\beta$ , das im Komplex mit Axin, APC, Dsh und CKI vorliegt, phosphoryliert und somit zur Ubiquitinylierung durch  $\beta$ TrCP markiert. Die Ubiquitinylierung dient der Markierung zum proteasomalen Abbau des Proteins. Eine Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs durch die Bindung von WNT Liganden, einer Familie von Glycoproteinen, an den heterodimeren Rezeptorkomplex aus Frizzled (Fz) und LRP5/6 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein*), resultiert in der Bindung von Axin an den zytoplasmatischen Teil von LRP. Der zytoplasmatische Teil von Fz interagiert mit Dsh, was die Interaktion zwischen LRP und Axin noch verstärkt. Die Bindung von Axin und Dsh an den Rezeptor führt in einem älteren Model des WNT Signalwegs zu Dissoziation von GSK3 $\beta$  aus dem  $\beta$ -Catenin phosphorylierenden Komplex. In einem neueren Model des WNT Signalwegs wird davon ausgegangen, dass die Bindung von WNT an den Rezeptor dazu führt, dass der gesamte Phosphorylierungskomplex mit LRP interagiert und so die Ubiquitinylierung von  $\beta$ -Catenin durch  $\beta$ -TrCP blockiert wird und daher neu synthetisiertes  $\beta$ -Catenin akkumulieren kann und in den Kern wandert (Clevers & Nusse, 2012).

Da  $\beta$ -Catenin selbst keine DNA-Bindedomäne besitzt, interagiert das Protein mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie TCF/LEF (Hirai et al., 2011), sowie mit den chromatinmodifizierenden Proteinen CBP/p300 und Brg1 (Lien & Fuchs, 2014) (Abbildung 2.5).  $\beta$ -Catenin aktiviert so den für eine Selbsterneuerung wichtigen Transkriptionsfaktor TCF1 und inhibiert den differenzierungsaktivierenden Transkriptionsfaktor TCF3 (Niwa, 2007). Während der Selbsterneuerung von Stammzellen wird  $\beta$ -Catenin aufgrund der engen Assoziation zusammen mit Oct4 und E-Cadherin an die Zellmembran nur gering transkriptionell aktiv. Ein Verlust von  $\beta$ -Catenin führt dazu, dass eine Inhibition von GSK3 $\beta$  durch den WNT oder PI3K Signalweg die Inhibition Pluripotenzrelevanter Gene TCF3 nicht aufgehoben werden kann (Atlasi et al., 2013).



**Abbildung 2.5: Der WNT/β-Catenin Signalweg**

Bei inaktivem WNT Signalweg wird β-Catenin durch GSK3β im Komplex mit Axin, APC (*adenomatous polyposis coli*) und CK1α (Casein Kinase I) phosphoryliert und somit zum proteasomalen Abbau markiert. Bei einer Aktivierung des Signalwegs durch Bindung von WNT an den Frizzled und LRP Rezeptor führt dies zur Dissoziation von GSK3β aus dem Komplex, was dazu führt, dass β-Catenin nicht mehr für den proteasomalen Abbau markiert wird und in den Kern translozieren kann. Im Kern interagiert β-Catenin unter anderen mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF und wird so transkriptionell aktiv. Die Abbildung wurde mit Hilfe von *Servier Medical Art* erstellt.

### 2.2.1 Pluripotenzassoziierte Transkriptionsfaktoren

Die Kerntranskriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog werden in allen Stammzellen exprimiert. Der knockout eines der drei Gene führt zu einer fehlerhaften Epiblastenformation und Letalität während der Implantation. Folgend können keine Oct4<sup>-/-</sup>, Sox2<sup>-/-</sup> oder Nanog<sup>-/-</sup> mES Zellen aus Blastozysten entnommen werden (Masui et al., 2007; Mitsui et al., 2003; Nichols et al., 1998).

#### Oct4

Der Transkriptionsfaktor Oct4 (auch bekannt als Pou5f1) ist essentiell für die frühe Entwicklung und Erhaltung der Pluripotenz *in vivo* und *in vitro* (Nichols et al., 1998). Oct4 ist ein Mitglied der Familie der POU-Transkriptionsfaktoren. Die POU-Domäne besteht aus einer POU spezifischen Domäne POU<sub>S</sub> und einer Homöodomäne POU<sub>H</sub>, die durch einen Linker miteinander verbunden sind. Oct4 bindet über die POU Domäne an eine konservierte Oktamersequenz der DNA. Zielgene von Oct4 weisen unterschiedlichste zelluläre Funktionen, wie beispielsweise transkriptionelle Regulation, Chromatinmodifikation und posttranskriptionelle Regulation durch nichtcodierende RNAs und microRNAs auf (Ng & Surani, 2011). Die Expression von Oct4 wird während der Differenzierung von Stammzellen

deutlich herunterreguliert (Boiani & Scholer, 2005) und ist daher ein wichtiger Faktor bezüglich der Erhaltung der Pluripotenz und Kontrolle der Zelldifferenzierung (Pesce & Scholer, 2001). Oct4 wird u.a. durch den JAK/STAT und den PI3K/Akt Signalweg beeinflusst. Lin zeigte 2012, dass eine Phosphorylierung von Oct4 an T235 durch Akt die Stabilität des Transkriptionsfaktors erhöht und die Kernlokalisation begünstigt. Die Phosphorylierung resultiert wiederum in einer verstärkten Akt Expression (Y. Lin et al., 2012). Eine Phosphorylierung von Oct4 an T228 hingegen durch ERK verstärkt den Abbau von Oct4 und kann so zu einer Differenzierung der Zellen führen (Spelat, Ferro, & Curcio, 2012).

### **Sox2**

Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor in Stammzellen ist das *SRY-related high-mobility-group box* Protein Sox2. Die Mitglieder der Sox Familie enthalten eine HMG Box, über die die Proteine funktionell mit POU Domäne Proteinen, wie beispielsweise Oct4, interagieren (W. N. Zhao et al., 2012). Sox2 wird sowohl in ES Zellen als auch in unipotenten Zellen wie neuronalen Stammzellen exprimiert. Der Transkriptionsfaktor bindet unter anderem zusammen mit Oct4 und Nanog an Promotoren pluripotenzrelevanter Gene (J. Kim, Chu, Shen, Wang, & Orkin, 2008). Interessanterweise wird die Stabilität von Sox2 durch eine Akt-abhängige Phosphorylierung erhöht, was zu einer größeren transkriptionellen Aktivität führt (Jeong et al., 2010).

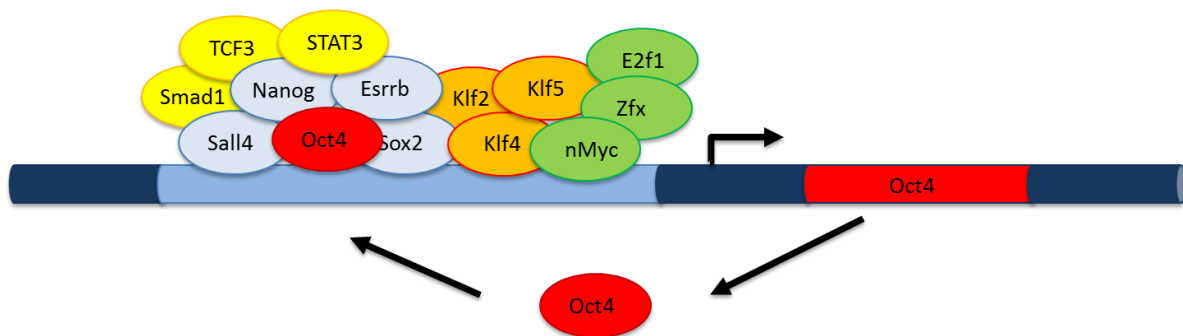
### **Nanog**

Das Homöodomänenprotein Nanog gehört ebenfalls zu dem Netzwerk der Kernpluripotenzfaktoren. Nanog wird nicht nur in undifferenzierten mES Zellen exprimiert, sondern Nanog mRNA kann auch in geringen Mengen in adultem Gewebe nachgewiesen werden (Hart, Hartley, Ibrahim, & Robb, 2004). In mES Zellen dient die erhöhte Expression von Nanog bei einem aktiven LIF-Signalweg der Erhaltung des undifferenzierten Zustands und dem Erhalt des Selbsterneuerungspotentials (Boiani & Scholer, 2005). Mitsui *et al.* zeigte, dass der Transkriptionsfaktor sowohl für den Pluripotenzerhalt in mES Zellen als auch in murinen Epiblasten wichtig ist (Mitsui et al., 2003). Nanog kann *in vitro* zudem die Selbsterneuerung von Stammzellen ungeachtet des JAK/STAT Signalwegs aufrechterhalten. Eine Phosphorylierung von Nanog an Ser56/57 und Ser65 scheint die Selbsterneuerung von Stammzellen zu begünstigen, wohingegen eine Phosphorylierung durch ERK1 an anderen Serin-Resten des Proteins zu einer Destabilisierung führt (Saunders et al., 2017). Während der Differenzierung von Stammzellen, wird Nanog von ERK1 phosphoryliert, was zu einem proteasomalen Abbau des Proteins führt (S. H. Kim et al., 2014).

Die Regulation des Zusammenspiels der drei Kernpluripotenzfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog spielt somit eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Pluripotenz und der Selbsterneuerung von Stammzellen. Die Primärfunktionen von Oct4 und Nanog liegen wahrscheinlich in der

Hemmung der Zelldifferenzierung und der Pluripotenzhaltung (Boiani & Scholer, 2005). Promotoren, an die Oct4, Sox2 und Nanog binden, enthalten oft auch Bindungsstellen für Effektoren des Akt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs wie z.B. Tcf3 und Tcf1 (Yi et al., 2011).

Das Zusammenwirken der pluripotenzassoziierten Faktoren wird anhand der Expression von Oct4 nach Assoziation verschiedener Transkriptionsfaktoren an den Oct4 Promotor in Abbildung 2.6 veranschaulicht (Ng & Surani, 2011). Oct4, Sox2 und Nanog regulieren u.a. die eigene Genexpression durch autoregulatorische Rückkopplung (Warmflash et al., 2012).



**Abbildung 2.6: Zusammenspiel pluripotenzrelevanter Transkriptionsfaktoren am Beispiel des Oct4 Promotors.**

Oct4 ist einer der am besten charakterisierten Transkriptionsfaktoren in mES Zellen. An die regulatorische Domäne vom Oct4 Gen binden multiple Transkriptionsfaktoren, darunter auch Oct4 selbst. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Ng & Surani, 2011).

## 2.2.2 Sekundär pluripotenzassoziierte Transkriptionsfaktoren

Zusätzlich zu den Kernpluripotenzfaktoren gibt es weitere bekannte pluripotenzassoziierte Transkriptionsfaktoren. Zu ihnen zählen unter anderem Klf4, cMyc, Tbx3, Tcf3 und Tcf1.

### Klf4 und cMyc

*Klf4* codiert ein *krüppel-like* Zinkfinger Protein, das als Cofaktor von Oct4 und Sox2 bei der Aktivierung von Zielgenen mitwirkt (Nakatate et al., 2006). Die Klf Familie reguliert mehrere biologische Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung, Entwicklung und Apoptose. Alle Klf Familienmitglieder besitzen drei C-Terminal lokalisierte Cys2His2 Zinkfinger, die ähnliche Affinitäten für die Bindung an GC-reiche Sequenzen zeigen (W. N. Zhao et al., 2012). Klf4 und Klf2 regulieren die Expression einiger pluripotenzrelevanter Transkriptionsfaktoren, wie Nanog, Tcf1, Esrrb, Sall4, Tcf3 und nMyc (Parisi et al., 2008). In einigen Studien wurde gezeigt, dass die Expression von Klf4 zur Erhöhung des Proteinlevels des Zellzyklusinhibitors p21 beiträgt. Als Folge der Erhöhung von p21 wird zum einen die Zellproliferation gehemmt, zum anderen werden zelluläre Level von p53 reduziert, was das Apoptoserisiko hingegen

deutlich vermindert. Intrazelluläres p53 wird beispielsweise durch die hochregulierte cMyc Expression in mES Zellen verstärkt exprimiert. Einige Studien weisen darauf hin, dass daher eine Erhaltung des Gleichgewichts zwischen Klf4 und cMyc unerlässlich bei der Erhaltung der Pluripotenz (Muchkaeva, Dashinimaev, Terskikh, Sukhanov, & Vasiliev, 2012) ist. Eine weitere wichtige Funktion der beiden Transkriptionsfaktoren Klf4 und cMyc ist die Assoziation mit mehreren Histonacetyltransferase-Komplexen, wie p300 und CBP und deren Rekrutierung an Zielgene. Die Acetylierung von DNA durch Histonacetyltransferasen ist unter anderem für eine Öffnung von Chromatinstrukturen notwendig. Aktives cMyc greift somit in die Induktion der DNA-Replikation und das Voranschreiten des Zellzyklus ein. Klf4 und cMyc spielen zudem eine wesentliche Rolle bei der Änderung der Chromatinstruktur während der Reprogrammierung somatischer Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (Sanges & Cosma, 2010).

### **Tbx3**

Ein weiterer Faktor, der sowohl mit der Erhaltung der Selbsterneuerung als auch mit der Differenzierung zu extraembryonalem Endoderm in Zusammenhang steht, ist Tbx3 (Lu, Yang, & Jin, 2011). Tbx3 gehört zur Familie der T-Box Transkriptionsfaktoren und wird in mES Zellen über den LIF induzierten PI3K/Akt Signalweg verstärkt exprimiert. Frühere Beobachtungen ergaben, dass eine Überexpression von Tbx3 in mES Zellen ohne LIF-Zusatz einen pluripotenten Zustand der Zellen aufrecht erhalten kann (Niwa et al., 2009). Darüber hinaus reguliert Tbx3 als Cofaktor die Expression vieler pluripotenzassoziiierter Zielgene zusammen mit Oct4, Sox2 und Nanog als Bestandteile von Multiproteinkomplexen (Han et al., 2010).

### **TCF/LEF**

Die Transkriptionsfaktoren der TCF-Familie sind ebenfalls bedeutend für die Pluripotenzerhaltung von Stammzellen. LEF1 und TCF gehören zur Familie der HMG-DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren. Bei aktivem WNT Signalweg wandert  $\beta$ -Catenin in den Zellkern und kann über die Bindung an TCF/LEF transkriptionell aktiv werden (W. N. Zhao et al., 2012). LEF1 kann durch synergistische Bindung mit  $\beta$ -Catenin an den Oct4 Promotor die Expression von Oct4 induzieren. Des Weiteren bleiben mES Zellen *in vitro* bei einer ektopen Überexpression von LEF1 auch in Abwesenheit von LIF pluripotent, während eine Herunterregulation von LEF1 mittels siRNA zu einer Differenzierung der Zellen führt (Huang & Qin, 2010).

Ebenfalls wurde gezeigt, dass TCF3 und TCF1 häufig zusammen mit den Kernpluripotenzfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog an Zielgene binden. In diesen Komplexen agiert TCF3 als repressorische Komponente und verhindert so eine zielgerichtete Genexpression. Durch Aktivierung des WNT Signalwegs transloziert  $\beta$ -Catenin in den Zellkern und bildet Komplexe mit TCF/LEF. Im Fall von TCF3 inhibiert  $\beta$ -Catenin über eine direkte



Interaktion dessen Repressorfunktion (Niwa, 2011). Im Gegensatz dazu aktiviert  $\beta$ -Catenin TCF1 und führt so zur Expression von Zielgenen (Yi et al., 2011). Die Kontrolle der Balance zwischen der Repressorfunktion von TCF3 und der Aktivatorfunktion von TCF1 durch den WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg ist sowohl für die Erhaltung der Pluripotenz als auch für die Differenzierungsfähigkeit der mES Zellen essentiell (K. Watanabe & Dai, 2011).

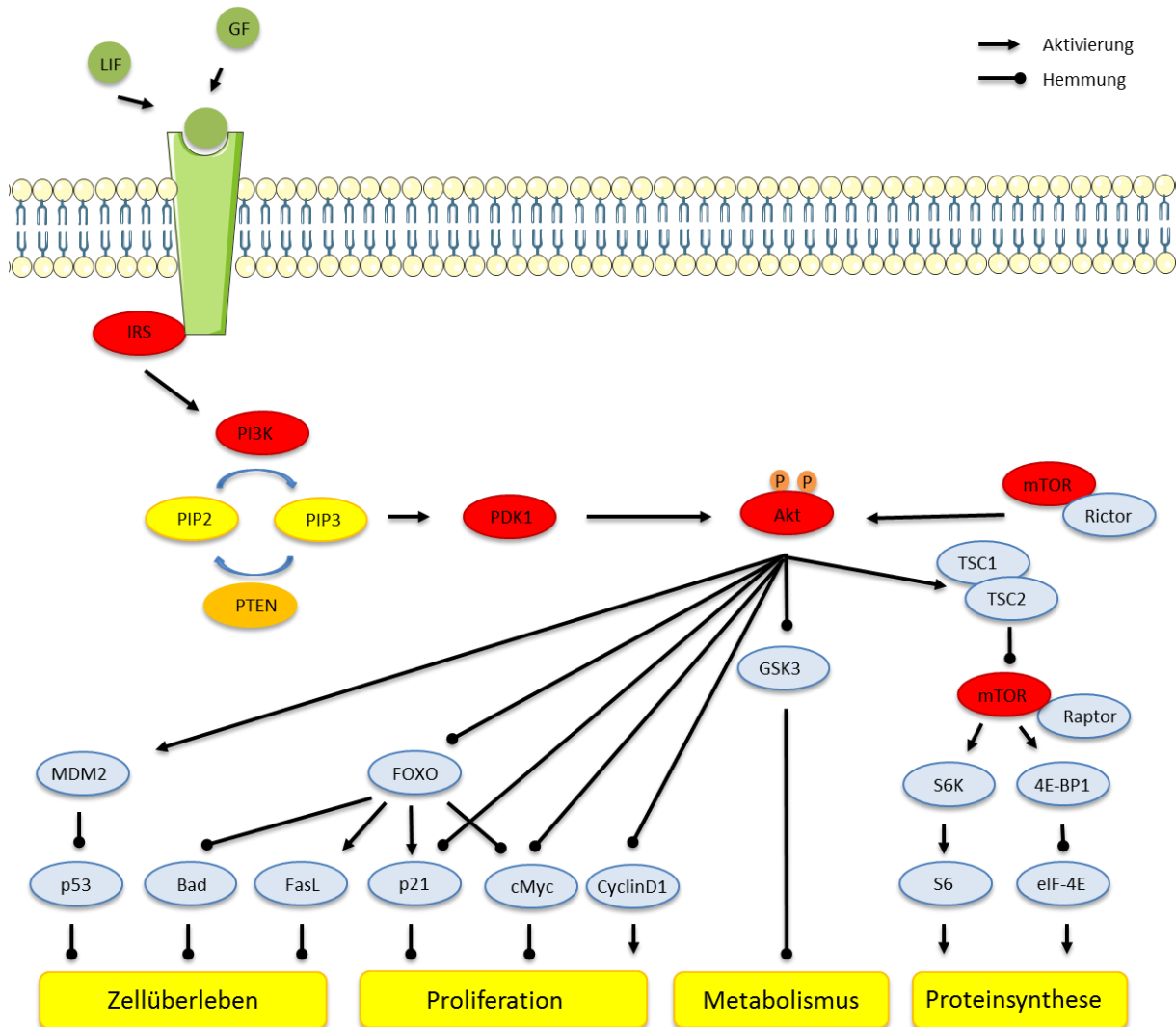
## 2.3 Der PI3K/Akt Signalweg

### 2.3.1 Regulation des PI3K/Akt Signalwegs

Der PI3K/Akt Signalweg ist nicht nur an der Pluripotenzerhaltung von embryonalen Stammzellen, sondern auch an anderen fundamentalen Prozessen wie Energiestoffwechsel, Proliferation, Zellmigration, Zellüberleben, Antwort auf DNA-Schäden und Apoptose beteiligt. Der PI3K/Akt Signalweg ist hochkonserviert und wird durch die Bindung von Wachstumsfaktoren oder Hormonen (beispielsweise Insulin) an verschiedene Membranrezeptoren wie Rezeptortyrosinkinasen (RTK), Integrine oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) (Fayard, Tintignac, Baudry, & Hemmings, 2005) angeschaltet (Hemmings & Restuccia, 2012). Aktivierte RTKs bzw. GPCRs initiieren die Rekrutierung der p85 Untereinheit von PI3K über ihre regulatorische Untereinheit oder Adapterproteine wie Gab1 oder IRS1. Die Bindung von PI3K führt zu einer Konformationsänderung des Proteins und so zu einer Aktivierung der katalytischen p110 Untereinheit. Aktive PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol (3,4)-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) in der Plasmamembran. PIP<sub>3</sub> rekrutiert unter anderem die Kinasen PDK1 und AKT über deren Pleckstrin-homologe (PH) Domäne an die Plasmamembran. Nach der initialen Phosphorylierung von Akt an Thr308 der katalytischen Domäne durch PDK1 wird die vollständige Kinaseaktivität von Akt durch Phosphorylierung an Ser473 durch mTORC2 (mTOR Komplex 2), DNA-PK (DNA-abhängigen Proteinkinase), ATM (*ataxia telangiectasia* mutierten Kinase) (Schultze, Hemmings, Niessen, & Tschopp, 2012), ILK (*integrin linked kinase*)/Rictor-Komplex (McDonald et al., 2008) oder eine Autophosphorylierung durch Akt selbst (Fayard et al., 2005) induziert. Die aktive Kinase dissoziiert von der Membran und phosphoryliert spezifische Targetproteine mit dem Konsensus Motiv (R-X-R-X-X-S/T) (Martelli et al., 2012), was diese entweder aktivieren oder deaktivieren kann (Hemmings & Restuccia, 2012).

Der Akt Signalweg kann durch verschiedene Phosphatasen gehemmt bzw. abgeschaltet werden. PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog) beispielsweise ist einer der Hauptregulatoren des Signalwegs. PTEN dephosphoryliert PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> und schaltet so das rezeptorvermittelte Aktivierungssignal für Akt ab.

Des Weiteren regulieren PP2A (Proteinphosphatase 2A), SHIP (*SH2-containing inositol phosphatase*) und CTMP (*Carboxyl-terminal modulator protein*) den Akt Signalweg negativ (Maira et al., 2001; Ugi et al., 2004) (Abbildung 2.7).



**Abbildung 2.7: Der PI3K/Akt Signalweg ist an fundamentalen zellulären Prozessen wie Zellüberleben, Proliferation, Metabolismus und Proteinsynthese beteiligt.**

Über LIF, das an den LIF-Rezeptor bindet, oder Wachstumsfaktoren (GF), die an Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) binden, kann der PI3K/Akt Signalweg aktiviert werden und beeinflusst so viele zelluläre Prozesse wie Zellüberleben, Proliferation, Metabolismus und Proteinsynthese. Die schematische Darstellung wurde mit Hilfe von *Servier Medical Art* erstellt.

### 2.3.2 Der PI3K/Akt Signalweg und Apoptose

Durch die negative Regulierung pro-apoptotischer Proteine wie BAD, ein BH3-only Protein der Bcl-2-Familie, erhöht Akt beispielsweise das Überleben von Zellen (Datta et al., 1997).

Außerdem wird die Expression pro-apoptotischer BH-*only* Proteine über eine Hemmung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. durch FOXO (*Forkhead-Box-Proteine*) oder durch das Tumorsuppressorprotein p53 inhibiert. Aktives Akt phosphoryliert FOXO, welches dadurch aus dem Kern transportiert wird und somit transkriptionell nicht mehr aktiv ist. MDM2, eine E3 Ubiquitin Ligase, die p53 für den proteasomalen Abbau markiert, wird ebenfalls durch die Phosphorylierung durch Akt aktiv (B. P. Zhou et al., 2001). Ein anderes von Akt modifiziertes Protein, das eine bedeutende Rolle bei der Apoptose einnimmt, ist die Initiator-Caspase 9, die in phosphorylierter Form nicht zu einem Auslöser der Apoptose prozessiert wird (Cardone et al., 1998).

### 2.3.3 PI3K/Akt Signalweg und Proteinsynthese/Proliferation

Eine weitere wichtige Funktion von Akt liegt in der zellulären Wachstumsförderung. Dies wird hauptsächlich durch die Aktivierung von mTORC1 (mTOR Komplex 1), dem Hauptregulator der Translationsinitiation und Ribosomenbiogenese, bewirkt (Wullschlegler, Loewith, & Hall, 2006). Akt interagiert nicht direkt mit mTORC1, sondern inaktiviert TSC2 (*tuberous sclerosis* Komplex 2) und PRAS40 (prolinreichen Akt-Substrats mit 40 kDa Molekulargewicht), wodurch diese mTORC1 nicht mehr negativ regulieren. Substrate von mTORC1 sind S6K1 (S6 Kinase1), die wiederum S6 phosphoryliert und den Translationsregulator 4E-BP1 (*eucaryotic initiation factor 4E-binding protein 1*) (Manning & Cantley, 2007).

Akt ist neben ERK an der Regulation der Zellproliferation über den Zellzyklus beteiligt. Durch die Phosphorylierung der CDK- (*cyclin dependent kinase*-) Inhibitoren p27<sup>Kip1</sup> und p21<sup>Cip1/WAF1</sup> verbleiben diese im Zytosol und werden so an der Translokation in den Nukleus und an der Inhibition des Zellzyklus gehindert (Sekimoto, Fukumoto, & Yoneda, 2004). Die bereits erwähnten Modifikationen von GSK3 $\beta$ , TSC2 und PRAS40 durch Akt tragen durch Stabilisierung bzw. die induzierte Synthese von Proteinen, die am Zellzyklus beteiligt sind, zu einem Fortschreiten des Zyklus und somit zur Proliferation bei (Manning & Cantley, 2007). Durch die Akt induzierte Inaktivierung von GSK3 $\beta$  wird auch beispielsweise der proteasomale Abbau von cMyc inhibiert, was die Proliferation wiederum positiv beeinflusst (Bechard & Dalton, 2009).

### 2.3.4 PI3K Signalweg und Metabolismus

Als Resonanz auf Wachstumsfaktoren reguliert Akt die Nährstoffaufnahme und die Nährstoffumsetzung zelltypspezifisch. Dabei ist eine der wichtigsten Funktionen von Akt die Stimulation der Glukoseaufnahme als Antwort auf die Aktivierung des Insulin Rezeptors. Akt aktiviert AS160 (Akt Substrat mit 160 kDa), was wiederum die Translokation von dem

Glukosetransporter 4 (Glut4) in die Plasmamembran ermöglicht (Manning & Cantley, 2007). Die von Akt induzierte Aktivierung von mTORC1 führt zu einer HIF1 $\alpha$  vermittelten Expression von dem Glukosetransporter 1 (Glut1) (Taha et al., 1999; Zelzer et al., 1998). Nach der Glukoseaufnahme über die Transporter in die Zelle, wird diese durch die Hexokinase zu Glucose-6-Phosphat umgesetzt, welches anschließend zellspezifisch unter der Regulation von Akt entweder zu Glykogen umgebaut werden kann oder zur Energiegewinnung durch Glykolyse verwendet wird (Elstrom et al., 2004).

### 2.3.5 PI3K/Akt Signalweg und Angiogenese

Ein aktiver PI3K/Akt Signalweg beeinflusst auch die Angiogenese (Wachstum von Blutgefäßen) von Endothelzellen. Bindet VEGF (*vascular endothelial growth factor*) an den VEGF Rezeptor, wird eNOS (endotheliale Stickoxid Synthase) aktiviert und setzt Stickoxid frei, wodurch die Angiogenese induziert wird (Dimmeler et al., 1999). Zusätzlich führt ein aktives Akt Signal zu einer verstärkten Synthese der Transkriptionsfaktoren HIF1 $\alpha$  und HIF1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor*), die wiederum die Expression und Sekretion von VEGF und anderen Angiogenesefaktoren induzieren (Gordan & Simon, 2007).

## 2.4 Akt-Isoformen

Es gibt drei bekannte Akt-Isoformen, deren eventuell unterschiedlichen Funktionen noch weitgehend unerforscht sind (Santi & Lee, 2010). Die drei Isoformen werden von separaten Genen codiert, verfügen jedoch über eine PH-, eine katalytische und eine regulatorische C-terminale Domäne. Außerdem sind die Aminosäuresequenzen zu 80% deckungsgleich. Unterschiede zwischen den Akt Isoformen sind hauptsächlich in der PH-Linker Region und im C-terminalen Bereich (Kumar & Madison, 2005). Zur Aktivierung wird Akt1 an Thr308 und Ser473, Akt2 an Thr309 und Ser474 und Akt3 an Thr305 und Ser472 phosphoryliert (Santi & Lee, 2010) (Abbildung 2.8).

Akt1 wird ubiquitär exprimiert. Das Fehlen dieser Isoform in Mäusen führt zu einem verminderten Wachstum. *In vitro* weisen Akt knockout Zellen eine erhöhte Apoptoserate auf (Cho, Thorvaldsen, Chu, Feng, & Birnbaum, 2001). Akt2 wird hauptsächlich in Muskeln, Leber und Adipozyten exprimiert und reguliert die glucoseabhängige Zellhomöostase. Akt2 defiziente Mäuse entwickeln sich weitgehend normal, zeigen aber früh Typ2 Diabetes (Cho, Mu, et al., 2001). Eine simultane Deletion von Akt1 und Akt2 ist neonatal letal und die Tiere weisen aufgrund der Entwicklungsstörungen von Muskeln, Haut und Knochen ein bis zu 50% geringeres Körpergewicht als Wildtyp (wt) Tiere auf (Peng et al., 2003). Akt3 wird hauptsächlich im Gehirn und in den Hoden exprimiert (Hay, 2011) und ist in Mäusen für die

Entwicklung einer normalen Gehirngröße essentiell. Akt3 knockout Mäuse haben daher kleinere Gehirne als wt Mäuse (Easton et al., 2005). Ein gleichzeitiger knockout von Akt1 und Akt3 ist embryonal letal (Dummler et al., 2006).



**Abbildung 2.8: Domänen der Akt Isoformen mit Phosphorylierungsstellen**

Die Aminosäuresequenzen der drei Akt Isoformen sind zu 80% deckungsgleich. Über die N-terminale PH-Domäne bindet Akt an Phospholipide in der Membran. Initial werden die Isoformen durch Phosphorylierung an dem markierten Threonin innerhalb der katalytischen Kinase Domäne durch PDK1 aktiviert. Durch eine nachfolgende Phosphorylierung des markierten Serins an der C-terminalen hydrophoben Domäne (HD) durch beispielsweise mTORC kommt es zur vollständigen Aktivierung von Akt. Akt1 wird ubiquitär, Akt2 hauptsächlich in Muskeln, Leber und Adipozyten und Akt3 in Gehirn und Hoden exprimiert.

Obwohl die Aminosäuresequenzen der Akt-Isoformen zu einem hohen Grad deckungsgleich sind, regulieren sie teilweise unterschiedliche physiologische Funktionen. Dies kann durch unterschiedliche Gewebeverteilung, verschiedenartige Aktivierung durch externe Signale, andere Zielsubstrate und oder eine inhomogene Verteilung der Isoformen in subzellulären Kompartimenten bedingt sein (Hay, 2011).

Akt ist eine der meisten hyperaktivierten Kinasen in humanen Tumoren (Altomare & Testa, 2005), was in Anbetracht der Funktionen von Akt bezüglich Proliferation, Überleben der Zellen, Metabolismus, Wachstum, Invasion und Angiogenese nicht unerwartet erscheint. Interessanterweise sind die Akt-Isoformen in bestimmten Tumorarten unterschiedlich verändert. Dies könnte ein Hinweis auf isoformspezifische Zelltransformationen, Zellzykluskontrolle, Tumorentwicklung, Migrationsverhaltens oder Metastasenbildung sein (E. Gonzalez & McGraw, 2009). Akt1 ist beispielsweise häufig in Schilddrüsen- und Lungenkrebs (Lee et al., 2011; Saji et al., 2011), Akt2 in Gliomen (Zhang et al., 2009) und Akt3 in Melanomen (Stahl et al., 2004) dereguliert.

Bei der Reprogrammierung von somatischen Zellen zu iPS Zellen spielt Akt ebenfalls eine Rolle. Eine erhöhte Akt1 Aktivität verstärkt über mTOR die Reprogrammierungseffizienz aufgrund einer im Vergleich zu Kontrollen erhöhten STAT3 Aktivierung und verstärkten Expression des LIF Rezeptors. Eine verstärkte Aktivierung von Akt2 und Akt3 führt ebenfalls zu einer höheren STAT3 Aktivität und begünstigt so die Reprogrammierung. Außerdem wurde gezeigt, dass Akt1 und Akt3 essentiell für die Proliferation der resultierenden iPS Zellen ist (Tang et al., 2014).

## **2.5 Die Rolle des PI3K/Akt Signalwegs bei der Pluripotenzerhaltung**

Die Literatur suggeriert eine bedeutende Rolle von PI3K/Akt bei der Pluripotenzerhaltung von Stammzellen. Die Gruppe von Storm zeigte 2009, dass die Inhibition von PI3K mit dem Inhibitor LY294002 in mES Zellen nach drei bis vier Tagen zu einem irreversiblen Verlust der Selbsterneuerung führt (Storm et al., 2009). Diese Beobachtung bestätigt die von derselben Gruppe 2006 publizierte Aussage, dass eine Inhibition von PI3K zu einer geringeren Expression von Nanog führt. Die verringerte Nanog Expression konnte durch eine zusätzliche Inhibition von GSK3 $\beta$ , welches auch von aktivem Akt inhibiert wird, wieder aufgehoben werden (Storm et al., 2007). Die Expression von Nanog wird zudem durch die Bindung des Tumorsuppressorproteins p53 an die regulatorische Domäne des Nanog-Promotors negativ reguliert. Bei einem aktivem PI3K/Akt Signalweg wird die Aktivität von p53 zum Teil durch Akt über eine Aktivierung von MDM2 gehemmt (T. Lin et al., 2005). Zusätzlich begünstigt die Inaktivierung von GSK3 $\beta$  durch Akt die Stabilisierung von cMyc, da dadurch cMyc nicht mehr proteasomal abgebaut wird (Bechard & Dalton, 2009). In diesem Zusammenhang zeigen weitere Studien, dass mES Zellen mit einem GSK3 Doppelknockout nicht differenzieren und somit ihren pluripotenten Zustand beibehalten (Doble, Patel, Wood, Kockeritz, & Woodgett, 2007).

Ling publizierte 2013, dass eine Aktivierung von PDK1, welches im Signalweg unterhalb von PI3K liegt, die Pluripotenz in Stammzellen auch bei einer Kultivierung der Zellen ohne LIF erhalten kann. Die Pluripotenzerhaltung bei der PDK1 Überexpression geht auf die verstärkte Aktivierung von Akt zurück, da bei einer zusätzlichen Inhibition von Akt die ES Zellen ihren pluripotenten Zustand verlieren (Ling, Voskas, & Woodgett, 2013). Die Akt abhängige Pluripotenzerhaltung von ES Zellen wurde zuvor auch von der Gruppe von Watanabe postuliert und somit bestätigt. Watanabe zeigte, dass durch eine Überexpression von aktivem Akt der pluripotente Zustand der Stammzellen auch bei einer Kultivierung der Zellen ohne LIF beibehalten werden kann. Die verstärkte Akt Expression führt zu keiner Änderung der Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs und des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs (K. Watanabe & Dai, 2011).

Außerdem wurde gezeigt, dass ein aktives Akt Signal die Expression der Kernpluripotenzfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog über Tbx3 hochreguliert (Niwa et al., 2009). Und es wurde beobachtet, dass eine Phosphorylierung von Oct4 an Thr235 durch Akt in embryonalen Karzinomzellen die Proteinstabilität erhöht und zusätzlich die Translokation von Oct4 in den Kern und die DNA Bindungskapazität begünstigt. In dieser Studie wurde außerdem gezeigt, dass unphosphoryliertes Oct4 an den Promotor von Akt bindet und so die Expression von Akt unterdrückt (Y. Lin et al., 2012). Die erhöhte DNA Bindungskapazität von an T234 und S235 von Oct4 wurde durch Brumbaugh *et al.* bestätigt (Brumbaugh et al., 2012). Zudem zeigte die Gruppe von Jeong, dass eine Phosphorylierung von Sox2 an T118 den Transkriptionsfaktor stabilisiert (Jeong et al., 2010).

## 2.6 Zielsetzung

Aufgrund vorhergehender Inhibitor- und Überexpressionsstudien, bei denen gezeigt wurde, dass die Inhibition von PI3K zu einem Verlust der Pluripotenz in Stammzellen führt (Storm et al., 2009) und zudem die Aktivierung von PDK1 in Stammzellen zu einer Akt vermittelten Erhaltung der Selbsterneuerung führt (Ling et al., 2013), sollte Ziel dieser Arbeit die Aufklärung, welche der Akt Isoformen maßgeblich an der PI3K vermittelten Pluripotenzerhaltung in mES Zellen mitwirkt, sein. Es wurde von verschiedenen Gruppen nicht nur gezeigt, dass die Überexpression von hyperaktivem Akt die Stammzellen auch bei einer Kultivierung ohne LIF pluripotent bleiben (S. Watanabe et al., 2006), sondern auch, dass die aktive Kinase zur Stabilisierung und Expression wichtiger pluripotenzassoziierter Transkriptionsfaktoren beiträgt (Brumbaugh et al., 2012; Jeong et al., 2010; Y. Lin et al., 2012). Zudem führt eine Inhibition von Akt auch bei Überexpression von aktiver PDK1 zu einem Verlust der Pluripotenz in Stammzellen, was darauf hindeutet, dass die Aktivierung des PI3K/Signalwegs die Pluripotenz hauptsächlich über die Aktivität von Akt beeinflusst (Ling et al., 2013).

Daher sollte in den verwendeten Mausstammzellen V6.4 zuerst untersucht werden, ob die Inhibition von PI3K in diesen Zellen ebenfalls die Pluripotenz negativ beeinflusst. Anschließend sollte analysiert werden, ob ein Verlust von Akt1 oder Akt2 einen Einfluss auf die Pluripotenzerhaltung der Stammzellen bzw. einen Einfluss auf die Stabilisierung der pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktoren hat. Dafür sollten Akt1 knockout mES Zellen mittels der TALEN Technologie generiert werden. Zusätzlich sollte Akt2 shRNA basiert herunterreguliert werden. Zudem sollte getestet werden, ob die drei Akt Isoformen spezifische Funktionen bei der Pluripotenzerhaltung von Stammzellen besitzen, oder ob alle drei Isoformen eine redundante Funktion aufweisen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte und Software

**Tabelle 3.1: Verwendete Geräte und Software**

Gerät/Software	Hersteller
Detektionsgerät FX Vilber Lourmat	Peqlab
Entwicklermaschine SRX-101	Konica
Fluoreszenzmikroskop	Leica
Fusion Software	Peqlab
Infinite M200 Reader	Tecan
LightCycler 480 II	Roche
LightCycler Software	Roche
NanoDrop 1000 Photometer	Peqlab
NanoDrop 1000 Software	Peqlab
Power Supply	BioRad
Software ImageJ	ImageJ
Thermocycler Mastercycler epgradient S	Eppendorf
Thermoshaker	UNIVERSAL Labortechnik
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf
Tischzentrifuge Multifuge Avant-J-30 I	Eppendorf
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zellkulturinkubator HERA cell 240	Heraeus, Thermo Scientific
Zellkultursterilbank HERA Safe	Thermo Scientific

#### 3.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3.2: verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterial für die Zellkultur**

Chemikalie/Produkt	Hersteller
1-Monothioglycerol	Sigma
2-Mercaptoethanol	Sigma
Aggrewell™ Plates	Stemcell Technologies
Aktivin A	PeptoTech
Alkaline Phosphatase Detection Kit	Merck/Millipore



---

Ascorbinsäure	Sigma
B27 Serum-free Supplement (50x)	GIBCO
Cell Scraper	Sarstedt
Cryogenic vials (Kryoröhrchen)	Nalgene
Dimethylsulfoxid (DMSO)	neoLab
DMEM High Glucose (4,5 g/l) mit Glutamin	PAA Laboratories GmbH
DMEM k.o.	Invitrogen life technologies™
DMEM Low Glucose (1 g/l) mit Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH
Duvelisib	Selleckchem
Falcon-Röhrchen	BD Biosciences
Fetales Kälberserum Gold (10 % (v/v))	PAA Laboratories GmbH
Gelatine	Merck
GSK2334470	Selleckchem
Ham's F-12 Nutrient Mix	Invitrogen life technologies™
HEPES	PAA Laboratories GmbH
Idelalisib	Selleckchem
ITS-Supplement	Sigma-Aldrich
JAK I	Merck/Millipore
jetPei® (PolyPlus-Transfection Inc.)	PeqLab
KnockOut™ Serum Replacement (SR)	Invitrogen life technologies™
L-Glutamin (200 mM)	GIBCO
LIF mouse	Biomol
LY294002	Merck/Millipore
MEM non-essential aminoacids	GIBCO
Mitomycin C	BIOTREND
MK-2206	Selleckchem
Mr. Frosty	Nalgene
MycoZap Plus-CL	Lonza
N2 Supplement	PAA Laboratories GmbH
Neubauer Improved Zählkammer	Assistent Bright Line Germany
OPH-109 Q-VD-OPH	MP Biomedicals
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH
Perform®	Schülke
PF-4989216	Selleckchem
Protaminsulfat	Merck/Millipore
Puromycin Dihydrochlorid	ThermoFischer

---

Rapamycin	Selleckchem
Retinsäure	Sigma
Sodium Pyruvate (100 mM)	GIBCO
Trypsin/EDTA (0,05%)	GIBCO
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one
Zellkulturschalen	Greiner bio-one

**Tabelle 3.3: verwendete Chemikalien und Material für Western Blot Analyse**

Chemikalie/Arbeitsmaterial	Hersteller
96 Well F-Bodenplatte	Greiner
APS	Roth
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific Pierce
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
DTT	Roth
Glycerin	AppliChem
Glycin	AppliChem
Nitrocellulose-Membran	Millipore
Nonidet P-40	AppliChem
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche
Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit	Vector Laboratories
Rotiphorese acrylamide 40 (37.5:1)	Roth
SDS	AppliChem
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas
TEMED	Roth
Western Bright Sirius	Biozym

**Tabelle 3.4: verwendete Chemikalien und Material für Immunbiologische Methoden**

Chemikalie/Arbeitsmaterial	Hersteller
DAPI	Merck
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH
ECL-Lösung	Promega
Fluorescent mounting medium	Dako
Formaldehyd ≤37% für Histologie	Carl Roth
Triton-X-100	Roth
Tween 20	Merck

**Tabelle 3.5: verwendete Chemikalien und Material für Molekularbiologische Methoden**

Chemikalien/Arbeitsmaterial	Hersteller
384 well plate qRT-PCR white	Roche
Agarose	Roth
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen
GeneJET PCR Purification Kit	Fermentas
Light Cycler 480 sealing foil	Roche
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche
Midori Green Advance	Biozym
Nuklease freies Wasser	Fermentas
O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas
Platinum Pfx DNA Polymerase Kit	Invitrogen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen
RNeasy Mini kit	Qiagen

**Tabelle 3.6: Medien für Zellkultur**

Medium	Zusammensetzung
MEF-Medium	DMEM High Glucose mit Glutamin 10% FCS
mESC-Medium	0,2% MycoZap DMEM knockout 20% KnockOut™ Serum Replacement (SR) 1% MEM non-essential amino acids 1% Pen/Strep 1% L-Glutamin 0,9 mM 2-Mercaptoethanol 1000 U/ml mLIF
HEK-Medium	DMEM High Glucose mit Glutamin 10% FCS 1% L-Glutamin 0,2% MycoZAP 1 mM MEM Sodium Pyruvate
Einfriermedium für MEFs	80% FCS 20% DMSO 1:1 mit MEF-Medium

---

Einfrriermedium für mES Zellen	80% SR 20% DMSO 1:1 mit mESC-Medium
EB-Medium	DMEM knockout 10% SR 1% MEM <i>non essential amino acids</i> 1% L-Glutamin 1% Pen/Strep 1% Natriumpyruvat 0,45 mM 1-Monothioglycerol
Basalmedium	DMEM low Glucose 1% I Glutamin 1% Pen/Strep 1% HEPES
Mesoderm-Medium	Basalmedium 1% N2 Supplement 1% B27 Supplement 5 <sup>ng/ml</sup> Ascorbinsäure 0,4 mM 1-Monothioglycerol
Endoderm-Medium	Basalmedium 25 <sup>ng/μl</sup> Activin 1% N2 Supplement 1% B27 Supplement
Ektoderm-Medium	EB-Medium 1 μM Retinsäure

---

**Tabelle 3.7: Zelllinien**

Zellen	Herkunft	Charakteristika
mESC V6.4	Maus embryonale Stammzellen, (Stemgent)	Adhärenz Zellen, pluripotent
MEF wt	Maus embryonale Fibroblasten BL6 (Charles River)	Adhärenz Zellen
HEK 293 T	humane embryonale Nierenzellen (Invitrogen)	Adhärenz Zellen, Zelllinie, transformiert mit SV40 large T Antigen
Akt1 ko mES Zellen	Maus Embryonale Stammzellen V6.4 (Julia Günter)	Deletion im Akt1 Gen

**Tabelle 3.8: Plasmide**

Bezeichnung	Charakteristika	Bezugsquelle
psPAX2	Lentivirales Verpackungsplasmid, empty backbone.	Open biosystem
pLKO.1	TRC Klonierungsvektor	Open biosystem
pMD2.G	VSV-G Envelop expression	Open biosystem
shAkt2 #1	TRCN0000055259	Sigma
shAkt2 #2	TRCN0000055260	Sigma
shAkt2 #3	TRCN0000022670	Sigma
shPDK1 #1	TRCN0000078808	Sigma
shPDK1 #2	TRCN0000078809	Sigma
shPDK1 #3	TRCN0000078810	Sigma
Mm-Akt1_TALEN_L1	Expressionsvektor für linkes Akt2-TALEN-Fragment, Zielsequenz 1	ToolGen
Mm-Akt1_TALEN_R1	Expressionsvektor für rechtes Akt2-TALEN-Fragment, Zielsequenz 1	ToolGen
Mm-Akt1_RG2S1	Reporterplasmid mit Akt2-Zielsequenz 1	ToolGen
Mm-Akt1_TALEN_L2	Expressionsvektor für linkes Akt2-TALEN-Fragment, Zielsequenz 2	ToolGen
Mm-Akt1_TALEN_R2	Expressionsvektor für rechtes Akt2-TALEN-Fragment, Zielsequenz 2	ToolGen
Mm-Akt1_RG2S2	Reporterplasmid mit Akt2-Zielsequenz 1	ToolGen

**Tabelle 3.9: verwendete Puffer für Western Blot Analysen**

Puffer	Zusammensetzung
Laufpuffer 10x	30 g Tris Base 145 g Glycin 0,1% SDS Auf 1l ddH <sub>2</sub> O auffüllen
RIPA-Lysepuffer	150 mM NaCl 1% Nonidet P-40 0.5% Desoxycholsäure 0.1% SDS 50 mM Tris ph 7,4 In ddH <sub>2</sub> O
Transferpuffer	3.03 g Tris 14.41 g Glycin 200 ml Methanol Auf 1 l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
SDS-Probepuffer 5x (Lämmli)	1 M Tris/HCl 0,2 M 1,4-DTT 40 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0,5 % (w/v) Bromphenolblau pH 6,8

**Tabelle 3.10: verwendete Puffer für Immunfluoreszenzfärbungen**

Puffer	Zusammensetzung
Blockpuffer	4% BSA 0,05% Saponin Auffüllen mit PBS
DAPI-Lösung	1 <sup>mg</sup> / <sub>ml</sub> Lösung verdünnen auf 1 <sup>µg</sup> / <sub>ml</sub> mit PBS

**Tabelle 3.11: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels der diskontinuierlichen SDS-PAGE**

Reagenz	10 % Trenngel	5% Sammelgel
Acrylamid	2,5 ml	400 µl
TEMED	4 µl	3 µl
Tris pH 8,8	2,5 ml	-
Tris pH 6,8	-	400 µl
10% SDS	100 µl	30 µl
10% APS	100 µl	30 µl
ddH <sub>2</sub> O	4,8 ml	2,2 ml

**Tabelle 3.12: für Western Blot verwendete Antikörper**

Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
Anti- β-Catenin	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-Akt1	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-Akt2	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-cMyc	GeneTex	1:1000
Anti-GSK3 α/β	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-Klf4	Abcam	1:1000
Anti-LEF1	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-MAPK 42/44	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-mouse HRP	Jackson ImmunoResearch	1:10 000
Anti-Nanog	Abcam	1:1000
Anti-Oct4	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-pGSK3 α/β (Ser21/9)	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-pAkt1 (Thr308)	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-p-Akt1/2/3	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:1000
Anti-pAkt2 (Ser474)	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-pMAPK42/44 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-pS6 (Ser235/236)	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-pStat3 (Tyr705)	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-rabbit HRP	Jackson ImmunoResearch	1:10 000
Anti-S6	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-Sox2	Cell Signaling Technology®	1:1000
Anti-Stat3	R&D Systems	1:1000
Anti-TCF4	Cell Signaling Technology®	1:1000

**Tabelle 3.13: für Immunfluoreszenz verwendete Antikörper**

Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
Mouse monoclonal Anti-Nestin	Abcam	1:200
Mouse monoclonal Anti-AFP	R&D Systems	1:100
Mouse monoclonal Anti-SMA	Sigma Aldrich	1:500
Chicken-anti-mouse Alexa Fluor 488	Invitrogen	1:100

**Tabelle 3.14: für qRT-PCR verwendete Primer**

Gen	Bezeichnung	Anbieter
Akt1	Mm_Akt1_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
Akt2	Mm_Akt2_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
Cdh2	Mm_Cdh2_1_SG	Qiagen
cMyc	Mm_Myc_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
Dppa2	Mm_Dppa2_2_SG	Qiagen
Epcam	Mm_Epcam_2_SG	Qiagen
GAPDH	Mm_Gapdh_3_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
Klf4	Mm_Klf4_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
Nanog	Mm_Nanog_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
Oct4	Mm_Pou5f1_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
Sox2	Mm_Sox2_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
Tbx3	Mm_Tbx3_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
Tcf3	Mm_Tcf3_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
Tert	Mm_Tert_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
β-Aktin	Mm_Actb_2_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
AFP	For: GATGAAACCTATGCCCCTCC Rev: CTGTCAGTTCAGGCTTTTGC	Sigma Aldrich
Axin2	For: TGA CTCTCCTTCCAGATCCCA Rev: TGCCCACTAGGCTGACA	Sigma Aldrich
Brachyury	For: AGGTACCCAGCTCTAAGGAAC Rev: CGAGGCTAGACCAGTTATCATG	Sigma Aldrich
DKK1	For: CTCATCAATTCCAACGCGATCA Rev: GCCCTCATAGAGAACTCCCG	Sigma Aldrich
GATA4	For: CTGTCATCTCACTATGGGCAC Rev: GAGTGACAGGAGATGCATAGC	Sigma Aldrich
Grb10	For: GTGAAAGAGGTAGGACGCAAGT Rev: TCCAGCAATCAGGTAGAAGATG	Sigma Aldrich
KREMEN2	For: ACGACTAGGCATCTATGAAGTGT	Sigma Aldrich



---

	Rev: CCGGTCTGGTCCATACTCATC	
LEF1	For: AAGGCGATCCCCAGAAGGA	Sigma Aldrich
	Rev: AGGGTGTCTCTGGCCTTGT	
Nestin	For: TGGAACATGAATCTGTGGGTGA	Sigma Aldrich
	Rev: CGATTGGGCATCTAAATGGTCAATCG	
Sall4	For: CCCTGGGAACTGCGATGAAG	Sigma Aldrich
	Rev: TCAGAGAGACTAAAGAACTCGGC	
Sox17	For: ACGCTAGCTCAGCGGTCTACTATT	Sigma Aldrich
	Rev: AGGGATTTCTTAGCGCTTCCAGG	
Wnt8a	For: GGGAACGGTGGAATTGTCCTG	Sigma Aldrich
	Rev: GCAGAGCGGATGGCATGAA	
$\alpha$ -SMA	For: CCCAGACATCAGGGAGTAATGG	Sigma Aldrich
	Rev: TCTATCGGATACTTCAGCGTCA	

---

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Zellbiologische Methoden

##### 3.3.1.1 Isolierung und Mitomycin C-Behandlung von MEFs

Für die Isolierung von MEFs zur Generierung von Feederzellen wurden tragende E13.5 Mäuse verwendet, welche durch Genickbruch getötet wurden. Der Uterus wurde entnommen und in Petrischalen mit eiskaltem PBS überführt. Die Embryonen wurden aus dem Uterus präpariert, mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend wurde die Leber und der Kopf entfernt. Die Embryonen wurden in Eppendorfgefäße mit 100 µl PBS überführt, mit einer Schere zerkleinert und mit 900 µl Trypsin/EDTA versetzt. Die Gewebestücke wurden für 5 Minuten bei 37°C inkubiert, resuspendiert und nochmal für 5 Minuten bei 37°C inkubiert, bis die Zellen vereinzelt waren. Die Zellen wurden von abgestorbenen Zellen und ausgetretener DNA gesäubert und mit MEF-Medium versetzt. Die Zellsuspension wurde in ein 15-ml *Falcon*-Röhrchen überführt, mit MEF-Medium auf 10 ml aufgefüllt und für 5 Minuten bei 150 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in MEF-Medium resuspendiert, in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub> bei 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei einer Konfluenz von 100% wurden die MEFs in einem Verhältnis von 1:3 passagiert.

Ab Passagenzahl 2 wurde ein Teil der MEFs eingefroren und ein Teil weiterkultiviert. Für die Behandlung mit Mitomycin C wurden die Zellen expandiert, dann das verbrauchte Medium abgenommen und mit 10 µg/ml Mitomycin C (gelöst in PBS, Konzentration 1 mg/ml) in MEF-Medium ohne Pen/Strep versetzt. Nach einer Inkubation von drei Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub> bei 100% Luftfeuchtigkeit wurde das Mitomycin C-haltige Medium abgenommen und die adhärennten Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die MEFs mit EDTA/Trypsin von den Zellkulturplatten abgelöst, in MEF-Medium aufgenommen, für 5 Minuten bei 150 x g pelletiert und in Aliquots von 10<sup>6</sup> Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren (siehe 3.1.10). Um die Teilungsinaktivierung der Mitomycin C behandelten MEFs zu testen, wurden diese neu auf Zellkulturplatten ausgebracht und mittels Zellzahl-Bestimmung (siehe 3.1.5) im Verlauf der bis zu 10-tägigen Kultivierung quantifiziert. Außerdem wurden mES Zellen auf den behandelten MEFs ausgebracht, um ihr Wachstumsverhalten zu beobachten.

##### 3.3.1.2 Kultivierung Embryonaler Mausfibroblasten (MEFs)

Primäre MEFs wurden bei 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 37°C und 100% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die MEF Zellen wurden alle drei Tage passagiert. Dazu wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und mit EDTA/Trypsin bei 37°C für 5-20 Minuten von den Zellkulturschalen abgelöst und in neuem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:3 auf Zellkulturplatten ausgebracht.

### **3.3.1.3 Ausbringen von Feederlayerzellen**

Mitomycin C-behandelte MEFs, die in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, wurden in vorgewärmten MEF-Medium resuspendiert, bei 150 x g für 5 Minuten pelletiert und in neues MEF-Medium aufgenommen. Ausgebracht wurden die Zellen in einer Dichte von ungefähr  $10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>.

### **3.3.1.4 Beschichtung von Zellkulturplatten mit Gelatine**

Für die Beschichtung von Zellkulturplatten mit Gelatine wurde eine 2% Gelatinelösung bei 37°C geschmolzen und mit ebenfalls 37°C warmen Wasser auf eine 0,1% Lösung verdünnt. Mit dieser 0,1% Gelatinelösung wurde der Boden von Zellkulturplatten vollständig benetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde die Gelatinelösung wieder abgezogen und die Platten für 2 h bei RT getrocknet.

### **3.3.1.5 Bestimmung der Zellzahl und Ausplattieren von Zellen**

Um Zellen für weiterführende Experimente in Kulturschalen auszubringen, wurden die entsprechenden Zelllinien durch Zugabe von EDTA/Trypsin von der Plastikoberfläche gelöst und erneut im jeweiligen Medium aufgenommen. Die abgelösten Zellen wurden mit einer Neubauer-Kammer (0,1 mm Tiefe und 0,0025 mm<sup>2</sup> Gesamtfläche) gezählt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension verwendet und die Anzahl intakter Zellen in vier Großquadraten bestimmt. Die gewünschte Zellzahl wurde in zellspezifischem Medium in neue Zellkulturplatten ausgebracht.

### **3.3.1.6 Kultivierung von embryonalen Mausstammzellen (mES Zellen)**

Embryonale Mausstammzellen wurden in 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dem mESC-Medium wurde kurz vor Verwendung Maus-LIF in einer Konzentration von 1000 U/ml zugesetzt. Die Zellen wurden auf einer Feederzellschicht oder Gelatine kultiviert und alle 2-4 Tage passagiert. Dazu wurden die adhären Zellen mit vorgewärmtem PBS gewaschen und mit EDTA/Trypsin von den Zellkulturplatten abgelöst, in neues Kulturmedium aufgenommen und in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:200 wieder ausgebracht. Nach dem Passagieren wurde am übernächsten Tag das Medium erneuert, ansonsten täglich.

### **3.3.1.7 Auftauen von in Stickstoff gelagerten Zellen**

Um eingefrorene Zellen aufzutauen, wurden diese in 37°C warmem Kulturmedium resuspendiert und anschließend bei 150 x g für 5 Minuten pelletiert. Um restliches DMSO zu entfernen, wurden die Zellen einmal mit Zellkulturmedium gewaschen, dann in Zellkulturschalen überführt und bei zellspezifischen Bedingungen kultiviert.

Bei Akt defizienten mES Zellen wurde in das entsprechende Kulturmedium 20 µM Caspase-Inhibitor Q-VD-OPH zugegeben, um Apoptose der Zellen zu verhindern.

### 3.3.1.8 Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung von Zellen wurden diese mit EDTA/Trypsin von den Zellkulturplatten abgelöst, das überschüssige Trypsin anschließend mit FCS- bzw. SR-haltigem Medium abgesättigt und die Zellen für 5 Minuten bei 150 x g pelletiert. Das Zellpellet wurde mit zellspezifischem Medium versetzt und mit Einfriermedium für MEF Zellen bzw. für mES Zellen in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Von der Zellsuspension wurde 1 ml in Kryoröhrchen überführt und in einem Einfriergefäß („Mr. Frosty“), der für eine konstante Kühlungsrate sorgt, bei -80°C eingefroren. Für eine Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

### 3.3.1.9 Kultivierung von HEK 293 T Zellen

Nach dem Auftauen der HEK 293 T Zellen (siehe 3.1.9) wurden diese in HEK-Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70-90% wurden die adhärennten Zellen mit vorgewärmten PBS gewaschen, mit EDTA/Trypsin abgelöst, in neues Medium aufgenommen und in einem Verhältnis von 1:10 auf Zellkulturplatten ausgebracht.

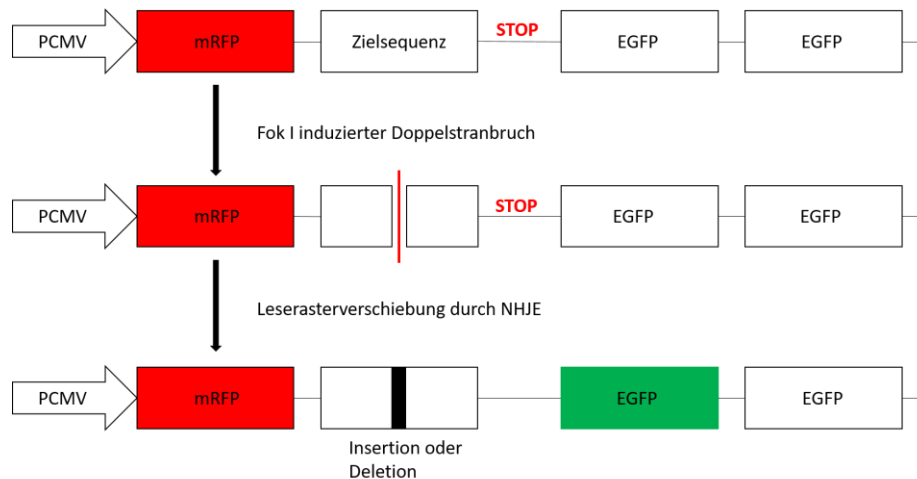
### 3.3.1.10 Transfektion von HEK 293 T Zellen

Für die Transfektion von HEK 293 T Zellen mit Fremd-DNA in Form von Plasmiden wurde das Transfektionsreagenz *jetPei*® (ein Polyethylenimin Derivat) nach Herstellerangaben verwendet. Die Transfektionsmethode beruht auf Lipofektion der behandelten Zellen. Hierbei wird die negativ geladene DNA von den positiv geladenen Lipidpartikeln umschlossen. Diese Partikel interagieren mit der Zelloberfläche und werden durch Endozytose in die Zellen aufgenommen.

### 3.3.1.11 Generierung stabiler Zelllinien mittels TALEN-Technologie

Um die Funktion von Akt1 und Akt2 im Zellsystem genauer untersuchen zu können, wurden die Gene Akt1 und Akt2 in MEFs bzw. Akt1 in mES Zellen mittels der TALEN- (*Transcription Activator-Like Effector Nuclease*) Technologie deletiert (Miller et.al...). Im Abschnitt 4.2.1 der Ergebnisse findet sich eine detaillierte Beschreibung der TALEN-Konstrukte und deren Wirkungsweise im Zellsystem. Bereits vordesignte TALEN-Paare und entsprechende Reporterplasmide wurden von dem Unternehmen ToolGen Genome Engineering erworben (Y. Kim et al., 2013) und zuerst in HEK 293 T Zellen getestet. Um zu testen, ob die Konstrukte in HEK 293 T Zellen eingebracht werden können und ob es folgend zu einem Doppelstrangbruch und somit zu einer Deletion des entsprechenden Gens kommt, wurden die zusammengehörenden TALEN-Konstrukte (TALEN-Paar) und das Reporterplasmid mittels Lipofektion mit *jetPEI* in die Zellen eingebracht. Das konstitutiv RFP (*red fluorescent portein*) exprimierende Reporterplasmid ist so konstruiert, dass es bei einer erfolgreichen Bindung der TALEN-Konstrukte an die spezifische DNA-Bindungssequenz zu einem DNA-

Doppelstrangbruch kommt. Der Doppelstrangbruch wird in Zellen meist durch NHJE (nicht homologe Verknüpfung der Enden) repariert. Resultiert daraus eine Leserasterverschiebung, wird EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), was sich nun im Leseraster befindet, exprimiert. Die Expression von EGFP ermöglicht eine Selektion mittels FACS (*fluorescence-activating cell sorting*) der Zellen, die erfolgreich alle TALEN-Konstrukte aufgenommen haben (Abb 3.1).



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Funktion des TALEN Reporterplasmids.**

Das Plasmid enthält ein konstitutiv exprimiertes RFP Gen, den beiden TALEN DNA-Zielsequenzen und zwei EGFP Genen, die sich außerhalb des Leserasters befinden. Bei einer Leserasterverschiebung um +1 oder +2 nach einem durch die Fok I induzierten Doppelstrangbruchs der DNA und einer nachfolgenden Reparatur (NHEJ → Insertion oder Deletion), kann das jeweilige sich im Leseraster befindliche EGFP Gen abgelesen und zusammen mit RFP exprimiert werden. Abbildung modifiziert nach (H. Kim et al., 2011).

2 x 10<sup>5</sup> HEK 293 T Zellen wurden pro 6-well Platte ausgebracht und 24 h später mit jeweils 1 µg der Plasmide Mm-Akt1\_TALEN\_L1, Mm-Akt1\_TALEN\_R1 und Mm-Akt1\_RG2S1 (Reporterplasmid) im Verhältnis 1:2 mit *jetPEI* transfiziert. Analog erfolgte die Transfektion von HEK 293 T Zellen mit den Plasmiden Mm-Akt1\_TALEN\_L2, Mm-Akt1\_TALEN\_R2 und Mm-Akt1\_RG2S2. Die Zielsequenz der TALEN-Paare liegt jeweils in Exon 1 des Akt1 Gens, weshalb bei einem Doppelstrangbruch ein frühes Stopp-Codon zu erwarten ist, was dazu führt, dass kein Akt Protein exprimiert wird. Aufgrund der erfolgten Leserasterverschiebung, konnten mit dem Mikroskop EGFP positive Zellen dargestellt werden.

Für die Generierung von Akt1 ko mES Zellen wurde jeweils ein zusammengehörendes TALEN-Paar mit einem entsprechenden TALEN-Reporterplasmids mittels Nukleofektion in die Zellen eingebracht. Die Nukleofektion basiert auf Elektroporation bei der ein elektrischer Impuls für einen kurzzeitigen Zusammenbruch der Membranintegrität sorgt. Dadurch können Plasmide in die Zelle und direkt in den Zellkern gelangen. Für das Einbringen der TALEN Konstrukte in mES Zellen wurde das *Mouse ES Cell Nucleofection Kit* verwendet. Es wurden

10<sup>5</sup> mES Zellen und 3 µg pro TALEN-Plasmid und die Programme A-23, A-24 und A-30 des Nukleofektors pro Ansatz verwendet. Die Nukleofektion erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Anschließend wurden die Zellen auf Feederzellen ausgebracht. Die Nukleofektion von MEFs erfolgte mittels *Mouse/Rat Hepatocyte Nuclofactor Kit*. Es wurden jeweils 2 x 10<sup>6</sup> Zellen und das Programm N-24 verwendet. Die Zellen wurden anschließend in *6-well* Platten ausgebracht. Für die FACS basierte Selektion wurden die Zellen zwei Tage nach der Transfektion mit Trypsin vereinzelt und gewaschen und anschließend in 0,5 ml eiskaltem PBS resuspendiert und durch einem Nylonsieb (40 µm) in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bis zur FACS-Analyse durch die *FACS Core Facility* Tübingen auf Eis gelagert. GFP positive mES Zellen wurden einzeln in *24-well* Platten mit Feederzellen und entsprechendem mESC-Medium sortiert. Die selektionierten Einzelklone wurden kultiviert und bei entsprechender Konfluenz passagiert. Mittels Western Blot wurden die einzelnen Klone auf Akt1 getestet.

#### 3.3.1.12 shRNA vermittelter knockdown in mES Zellen

Für die Generierung stabiler PDK1 bzw. Akt2 knockout Zelllinien wurden wt und Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen mit lentiviralen shRNA Konstrukten transduziert.

Für die Virusherstellung wurden HEK 293 T Zellen verwendet. Konfluente HEK 293 T Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion 1:10 in 10 cm Zellkulturplatten mit 10 ml HEK-Medium ausgebracht. Für die Transfektion der Zellen wurde die Calciumphosphat Methode verwendet. Pro Transfektionsansatz wurden 500 µl Nuklease freies Wasser mit 50 µl CaCl<sub>2</sub> (2,5 M) gemischt und mit den Helferplasmiden (jeweils 3 µg pMD2.G und 6,5 µg psPAX2) und 10 µg des entsprechenden lentiviralen *silencing* Vektor (pLKO.1 Konstrukte) versetzt und gemischt. Anschließend wurden unter konstanter Mischung mit einem Vortex-Gerät tropfenweise 500 µl HeBS Puffer (280 mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM HEPES, pH 7,05) zugeführt. Die Mischung wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf die am Tag zuvor ausgebrachten HEK 293 T Zellen gegeben. Nach 18 Stunden wurde das Medium abgezogen und gegen 7 ml mESC-Medium mit 5% FCS ersetzt.

Nach weiteren zwei Tagen wurde der Überstand der virusproduzierenden HEK 293 T Zellen abgenommen, sterilfiltriert (45 µm) und 1 ml davon auf am Tag zuvor ausgebrachte mES Zellen (10<sup>4</sup> Zellen pro *6-well* Platten) gegeben. 24 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um verbleibende Viruspartikel zu entfernen. Weitere zwei Tage später wurde mit der Puromycin Selektion der transduzierten Zellen begonnen. Dazu wurden dem mESC-Medium 1 µg/ml Puromycin zugesetzt.

Alle Materialien und Lösungen, die mit Lentiviren in Kontakt kamen, wurden mit Perform nach Herstellerangaben desinfiziert.

### 3.3.1.13 Ungerichtete Differenzierung vom mES Zellen

Für die ungerichtete Differenzierung von mES Zellen wurden aus diesen zuerst embryoähnliche Aggregate (EBs) generiert. Dazu wurden *Aggrewell*-Platten, die 1200 *Mikrowells* mit einem Durchmesser von 400 µm enthalten, mit 1 ml DMEM/F-12 gewaschen, mit 0,5 ml EB-Medium versetzt und bei 2000 x g für 5 Minuten bzw. bis in den *Mikrowells* keine Luftbläschen mehr sichtbar waren, zentrifugiert.

mES Zellen wurden mit EDTA/Trypsin vereinzelt. Pro *Aggrewell* wurden  $1,2 \times 10^6$  Zellen in 1,5 ml EB-Medium aufgenommen, in ein vorbereitetes *well* der *Aggrewell*-Platte überführt, vermischt und, um die Zellen in den *Mikrowells* zu sammeln, bei 50 x g für drei Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in den *Aggrewell*-Platten bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit für 72 Stunden kultiviert, wobei nach 48 Stunden 1 ml Medium durch frisches EB-Medium ersetzt wurde.

Um die EBs in Zellen der verschiedenen Keimblätter zu differenzieren, wurden ca. 150 EBs nach vorsichtigem Mischen und Abspülen der *Aggrewells* auf mit Gelatine beschichtete Glasplättchen in 12-*well* Platten ausgebracht und für 24 Stunden mit *DMEM high Glucose*, 5% FCS und 1% Pen/Strep bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert, bis die Zellaggregate sich abgesetzt hatten. Nachdem die EBs angewachsen waren, wurde auf die verschiedenen Differenzierungsmedien (Ektoderm-, Endoderm- und Mesoderm-Medium) umgestellt und diese jeweils alle 2 Tage gewechselt. Nach 8 Tagen wurde das Medium von den differenzierten Zellen abgenommen, diese mit 4% eiskaltem Formaldehyd für 15 min auf Eis fixiert und anschließend durch zweimaliges Waschen mit PBS überschüssiges Fixierungsreagenz entfernt. Die fixierten Zellen wurden für eine Immunfluoreszenzfärbung (siehe 3.3.3) verwendet.

## 3.3.2 Immunbiologische Methoden

### 3.3.2.1 Gewinnung von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die entsprechenden Zellen mit PBS gewaschen, mit EDTA/Trypsin vereinzelt und in den Zellen entsprechendem FCS- bzw. SR-haltigen Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 150 x g pelletiert, mit PBS gewaschen und nochmals bei 150 x g pelletiert. Das Pellet wurde entweder eingefroren und bei -80°C gelagert oder direkt mit 150 µl RIPA-Lysepuffer, versetzt mit Protease Inhibitor Cocktail und Phosphatase Inhibitor Cocktail, homogenisiert, für 30 Minuten auf Eis lysiert und teilweise im Ultraschallbad für 5 Minuten mit 50% Unterbrechungen behandelt. Zur Abtrennung von DNA und unlöslichen Zellbestandteilen wurden die Lysate 5 Minuten bei 20 000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden bei -20°C gelagert.

### 3.3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Die Proteinkonzentration von Gesamtzelllysat wurde mittels BCA Protein Assay Kit nach Herstelleranleitung bestimmt. Der enthaltene BCA-Puffer wurde in einem Verhältnis von 1:50 mit einer Kupferkomplexlösung gemischt und in einem Volumen von 200 µl pro 2 µl Probe bzw. BCA-Standardlösung eingesetzt. Die Proben wurden unverdünnt in eine *96-Well*-Platte überführt, mit der verdünnten Kupferkomplexlösung versetzt und 30 Minuten bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Konzentration der Proben wurde mit 5x bzw. 2,5x Probenpuffer (Lämmli) auf 1 µg/µl eingestellt.

### 3.3.2.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine der Zelllysate wurden entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt dabei durch die größenabhängige Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine durch das Gel. Eine einheitliche Laufrichtung wird durch SDS, welches an die Proteine bindet, diese denaturiert und ihnen eine negative Gesamtladung verleiht, gewährleistet.

Mit Probepuffer versetzte Lysate wurden bei 95°C für 5 Minuten erhitzt und mit einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel (siehe Tabelle 3.7) mit dem Proteingrößenstandard *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* als Referenz bei 20 mA im Sammelgel bzw. 40 mA im Trenngel aufgetrennt.

### 3.3.2.4 Detektion der Alkalischen Phosphatase-Aktivität in pluripotenten Zellen

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) wurde mit dem *Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit* bestimmt. Dafür wurden mES Zellen für 3-5 Tage kultiviert, zwei Minuten mit 4% Formaldehyd fixiert, zweimal mit Waschpuffer (PBS, 0,2% Tween) gewaschen und nach Herstellerangaben für 30 Minuten mit der Färbelösung im Dunkeln inkubiert. Nach der Einwirkzeit wurde die Färbelösung abgesaugt, die Zellen mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit PBS bedeckt. Die Platten mit den fixierten und gefärbten Zellen wurden zum einen mit einem Epson Scanner gescannt und zum anderen fluoreszenzmikroskopisch (10x Objektiv, Laser: 560nm) fotografiert und mit *ImageJ* ausgewertet.

### 3.3.2.5 Western Blot

Der Western Blot ermöglicht eine Identifizierung von Proteinen anhand der Bindung und Detektion spezifischer Antikörper. Die denaturierten, reduzierten und über eine SDS-PAGE (siehe 3.2.3) aufgetrennten Proteine der Zelllysate wurden im *Tank Blotting System* auf eine zuvor mit Transferpuffer aktivierten Nitrocellulose-Membran übertragen. Dafür wurden Membran und Gel luftblasenfrei zwischen *Whatman* Filterpapieren und Schwämmen zu einem „*Sandwich*“ zusammengelegt.



Der Proteintransfer erfolgte unter Kühlung in Transferpuffer für 90 Minuten bei 100 V. Im Anschluss wurde die Membran für 1 Stunde in 5% Magermilch in PBS/T (0,2% Tween) langsam geschüttelt, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Die Inkubation mit Primärantikörper (in 5% Magermilchpulver in PBS/T und 0,05% Natriumazid) erfolgte bei 4°C über Nacht. Danach wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit PBS/T gewaschen und für zwei Stunden mit einem entsprechenden speziesspezifischen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (in 5% Magermilch in PBS/T bzw. 5% BSA in PBS/T bei Anti-P Antikörper) bei 4°C inkubiert.

Bei HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgt die Detektion durch Chemilumineszenz. Zunächst wurde eine ECL-Lösung (1:1-Gemisch aus einer Luminol- und einer Wasserstoffperoxid-Lösung) hergestellt und die Membran damit benetzt. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Das oxidierte Luminol - und somit die Lokalisation des an das Zielprotein gebundenen Antikörpers - wurde mit dem Fusion FX Vilber Lourmat Detektionsgerät detektiert.

### **3.3.2.6 Immunfluoreszenz- und Fluoreszenzmikroskopie**

Mit dieser Methode können bestimmte Strukturen in Zellen über eine spezifische Bindung von Antikörpern, die wiederum mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind, sichtbar gemacht werden. Die fluoreszierenden Farbstoffe werden mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt, was zu einer Emission von Licht einer anderen Wellenlänge führt und somit detektierbar ist.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden auf Glasplättchen in 12-well Platten kultivierte und fixierte Zellen für zweimal 10 Minuten unter leichtem Schwenken mit PBS gewaschen. Danach erfolgte das Blocken in Blockpuffer für 1 h bei sanftem Schwenken und eine anschließende Inkubation der Zellen in entsprechender Primärantikörperlösung (Primärantikörper entsprechend verdünnt in Blockpuffer, jeweils 250 µl pro 12-well) über Nacht bei 4°C. Nach Entfernung der Primärantikörperlösung wurden die Zellen zweimal mit PBS für 10 Minuten unter leichtem Schwenken gewaschen und anschließend mit entsprechend gekoppelten Sekundärantikörpern für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen nochmal zweimal 10 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend die Zellkerne mit DAPI (1 µg/ml) gefärbt. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurden die mit Zellen bewachsenen Glasplättchen mit *Dako Fluorescent Mounting* Eindeckelmedium auf Objektträger fixiert und nach der Trocknung am Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI6000) analysiert.

### 3.3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.3.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus Zellen erfolgte mit den *Kits QiaShredder* und *Qiagen RNeasy RNA Mini* (Qiagen) nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll. Das Elutionsvolumen betrug 35  $\mu$ l. Danach wurde sowohl die Konzentration als auch die Reinheit der RNA mit Hilfe eines Nanodrops bestimmt. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

#### 3.3.3.2 Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion

Durch reverse Transkription wurde eine DNA-Kopie (cDNA) der zuvor isolierten RNA angefertigt. Die Reverse-Transkriptase (RT)-Reaktion beruht auf einer retroviralen reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) und wurde mit dem *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) durchgeführt. Dafür wurde 1  $\mu$ g RNA mit Nuklease freiem Wasser auf ein Volumen von 12  $\mu$ l aufgefüllt. Um genomische DNA zu entfernen, wurde im ersten Schritt 2  $\mu$ l gDNA Wipeout Buffer zugefügt. Die Entfernung der genomischen DNA erfolgte bei 42°C für zwei Minuten. Im Anschluss wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden pro Ansatz 1  $\mu$ l Primerlösung, 1  $\mu$ l der reversen Transkriptase Lösung und 4  $\mu$ l Reverse-Transkriptase Puffer zugefügt und gemischt. Die reverse Transkription erfolgte für 15 Minuten bei 42°C, gefolgt von einer Inaktivierung des Enzyms für 5 Minuten bei 95°C. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

#### 3.3.3.3 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Mit qRT-PCRs wurde die Expression der zu untersuchenden Gene relativ zu den konstitutiv exprimierten („*house-keeping*“) Genen (GAPDH und  $\beta$ -Aktin) in Echtzeit quantifiziert. Für die Amplifikation der cDNA wurde eine *FastStart Taq DNA-Polymerase* und für die Detektion der dsDNA-spezifische Fluoreszenzfarbstoff Resolight verwendet. Nach der reversen Transkription der RNA wurde die erhaltene cDNA 1:6 in Nuklease freiem PCR-Wasser verdünnt und davon 2,5  $\mu$ l (entspricht  $\sim$  20 ng) mit 5  $\mu$ l KAPA Master Mix sowie 1  $\mu$ l Primerlösung, 1,5  $\mu$ l PCR-Wasser und 1:400 Resolight versetzt. Die Auswertung erfolgte mit der *LightCycler Software* von Roche, wobei die erhaltenen CT-Werte auf die CT-Werte der *house-keeping*-Gene (GAPDH,  $\beta$ -Aktin) normalisiert wurden ( $\Delta\Delta$ CT-Methode). Die qRT-PCR wurde mit dem *LightCycler* unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 3.15: Bedingungen der qRT-PCR**

Programm	Zyklen	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	1	5 min	95°C
Amplifikation	45		
Denaturierung		10 sec	95°C
<i>Annealing</i>		10 sec	60°C
Elongation		10 sec	72°C
Schmelzkurve	1	5 sec	95°C
		1 min	65°C
			97°C

### 3.3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Genotypisierung der mittels TALEN Technologie hergestellten Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen wurde eine PCR zur Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnitts mit der *RedTaq* DNA-Polymerase nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit EDTA/Trypsin vereinzelt, in Medium aufgenommen, mit PBS gewaschen, und die DNA mit dem *DNeasy Blood & Tissue Kit* isoliert. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des Spektralphotometers Nano Drop 1000 durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Dazu wurden jeweils 1,5 µl gegen den Leerwert (Wasser) gemessen. Für die Berechnung der Hybridisierungstemperaturen wurde von den vom Oligonukleotidhersteller (Sigma Aldrich) angegebenen Schmelztemperaturen 5°C abgezogen. Der PCR-Reaktionsansatz wurde wie folgt angesetzt:

RedTaq Mastermix	12,5 µl
Vorwärts-Primer (10 mM)	1 µl
Rückwärts-Primer (10 mM)	1 µl
DNA-Template	250 ng
Wasser	Auffüllen auf 25 µl

**Tabelle 3.16: Primer für Amplifizierung**

Akt1 TALEN for:	CCTAATCTGCTGGGGTAGCA
Akt1 TALEN rev:	CTCCTGAAGCAGGCCTAGAG

Das zyklische PCR-Programm wurde folgendermaßen mit einem Thermocycler durchgeführt:

Initiale Denaturierung	3 min	94°C	} 35x
Denaturierung der DNA	30 sec	94°C	
Hybridisierung der Primer	30 sec	64°C	
Elongation der DNA	1 min	72°C	
Finale Elongation	2 min	72°C	

### 3.3.3.5 Agarosegelelektrophorese

Um die Produkte der Amplifikation auf ihre Größe zu untersuchen, wurden diese mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden 1%-ige Agarosegele (in TAE-Puffer (0,04 M Tris-Acetat, 0,001 M EDTA pH 8,0)) verwendet, die für die UV-abhängige Detektion mit 9 µl *Midori Green Advance* versetzt wurden. Von den amplifizierten Proben und der DNA-Standard (*O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder*) wurden jeweils 10 µl aufgetragen und bei 80-150 V aufgetrennt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte in einem UV-Transilluminator.

### 3.3.3.6 DNA-Extraktion nach Amplifizierung und Sequenzierung

Nach der Amplifizierung der spezifischen DNA Fragmenten wurden diese mit dem *GeneJet PCR Purification Kit* von Fermentas gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Zur Überprüfung der synthetisierten Fragmente wurden diese durch das Unternehmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) sequenziert. Dazu wurden pro Sequenzierung 15 µl DNA (50-100 ng/µl) mit 2 µl Sequenzierprimer (10 µM) versetzt und versandt.

**Tabelle 3.17**

Akt1 TALEN Sequ. for	TGGGAACCAGAGATGGGTAG
Akt1 TALEN Sequ. rev	CTTTCTGATAGGGCCTGCTG

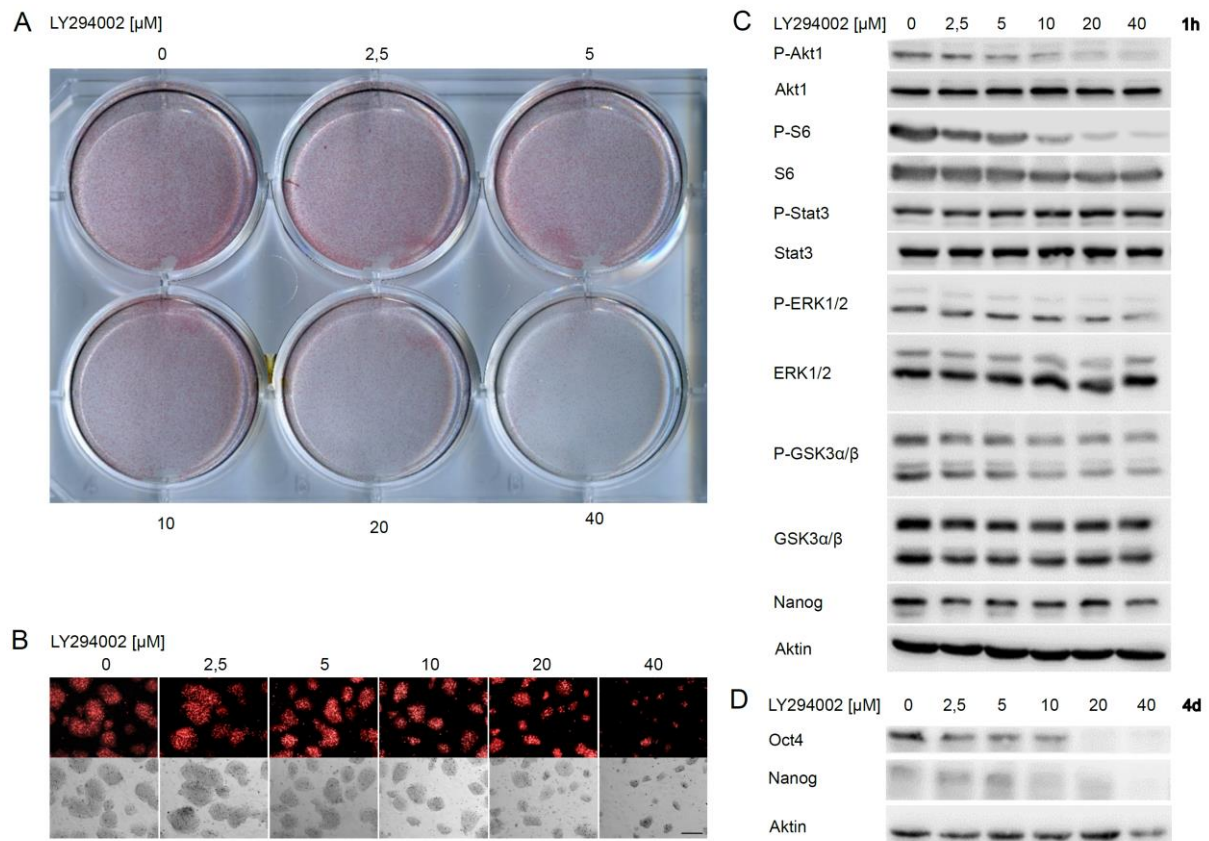
Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit dem Programm ApE (frei zugänglich) ausgewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Inhibierung des PI3K Signalwegs in mES Zellen führt in Stammzellen zu einem Verlust der Pluripotenz

Um die Rolle des PI3K/Akt Signalwegs in Mausstammzellen genauer zu untersuchen, wurde getestet, ob eine Inhibition von PI3K in den verwendeten mES Zellen V6.4, wie in der Publikation von Storm *et al.* (Storm et al., 2009) beschrieben, zu einem Verlust des Selbsterneuerungspotentials führt.

Dafür wurden mES Zellen auf Feederzellen ausgebracht und für 4 Tage mit dem spezifischen PI3K Inhibitor LY294002 (0 - 40  $\mu$ M) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität nachgewiesen. Die Expression aktiver Alkalischer Phosphatase ist eine der pluripotenzrelevanten Eigenschaften von Stammzellen. Zusätzlich wurde die Morphologie der Stammzellkolonien analysiert. Nach der Färbung mit dem Vector *FastRed* Kit wurden die Zellkulturplatten eingescannt bzw. unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung von 560 nm, fotografiert. Mit zunehmender InhibitorKonzentration nahm die Größe der mES Zellkolonien deutlich ab und nur noch der innenliegende Zellanteil der Kolonien exprimierte Alkalische Phosphatase (Abbildung 4.1 A). Mittels Western Blot wurde die Funktionsfähigkeit von LY294402 nachgewiesen. Dafür wurden auf Gelatine kultivierte mES Zellen für 24 Stunden ohne LIF kultiviert. Nach einer anschließenden Vorinkubation mit LY294002, wurde dem Zellkulturmedium für 15 Minuten LIF zugesetzt, um die Phosphorylierung von Proteinen im LIF-Signalweg zu induzieren. Die Phosphorylierung von Akt1 und S6, die beide unterhalb von PI3K im Signalweg liegen, nahm mit steigender Konzentration von LY294002 deutlich ab. Die Phosphorylierung von Stat3 und ERK1/2, die ebenfalls LIF-abhängig induziert wird, wurde durch die Inhibition von PI3K nicht beeinflusst (Abbildung 4.1 B). Für die Analyse der Wirkung des Inhibitors auf Kernpluripotenzfaktoren wurde zusätzlich die Expression von Nanog untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Inkubation der mES Zellen mit dem Inhibitor für eine Stunde die Expression von Nanog nicht beeinflusst wurde. Im Gegensatz dazu konnte bei einer Kultivierung der Zellen auf Feederzellen für 4 Tage in Anwesenheit des PI3K Inhibitors nachgewiesen werden, dass die Expression der Kernpluripotenzfaktoren Nanog und Oct4 konzentrationsabhängig deutlich abnahm (Abbildung 4.1 C).

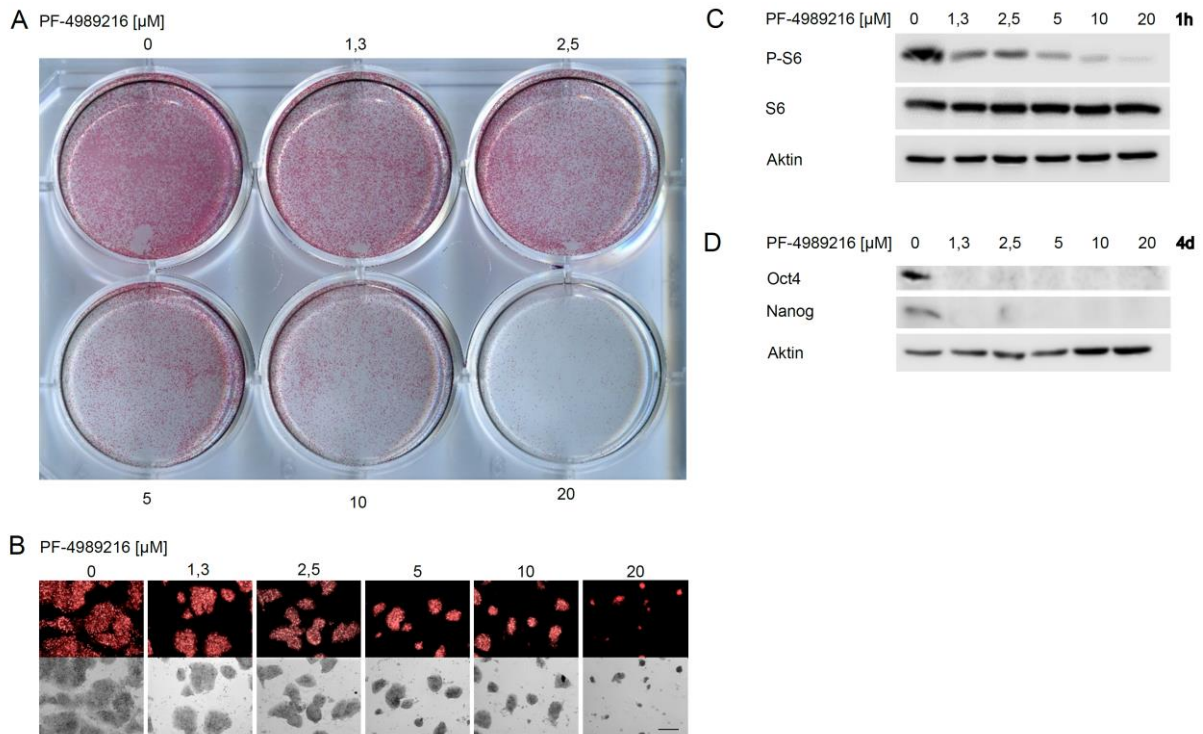


**Abbildung 4.1: Die Inhibition von PI3K mit LY294002 reduziert konzentrationsabhängig die Pluripotenz in Stammzellen.**

V6.4 Zellen wurden für 4 Tage in Anwesenheit von LIF und dem PI3K Inhibitor LY294002 (0 – 40  $\mu\text{M}$ ) auf Feederzellen kultiviert, anschließend fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität mit dem Vector *FastRed* Kit nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden gescannt (A) und unter dem Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv, Laser: 560 nm) fotografiert (B). Der Größenbalken entspricht 250  $\mu\text{m}$ . Auf Gelatine kultivierte V6.4 ES Zellen wurden 24 h ohne LIF kultiviert. Nach einer Vorinkubation mit dem PI3K Inhibitor LY294002 von 1 h, wurden die Zellen mit 1000 U/ml LIF für weitere 15 min kultiviert und geerntet. Mittels Western Blot wurde die Herunterregulation der PI3K abhängigen Phosphorylierung von S6, sowie auch die Expression und die Aktivierung LIF abhängiger Proteine nachgewiesen (C). V6.4 mES Zellen wurden für 4 Tage mit LY294002 kultiviert und anschließend die Expression der pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog ebenfalls mittels Western Blot detektiert (D). Es wurden jeweils 20  $\mu\text{g}$  Gesamtzelllysate aufgetragen und als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

Um die Ergebnisse, die eine Abnahme des Selbsterneuerungspotentials von Stammzellen in Abhängigkeit der PI3K Inhibition zeigen, zu validieren, wurden die Zellen zusätzlich mit einem weiteren PI3K Inhibitor kultiviert. Nach einer Kultivierung der mES Zellen mit PF-4989216 (0 – 20  $\mu\text{M}$ ), konnte mittels Nachweis der Alkalischen Phosphatase übereinstimmend mit den vorherigen Ergebnissen gezeigt werden, dass die Zellkolonien ebenfalls bei höheren Inhibitorkonzentrationen deutlich kleiner waren und Alkalische Phosphatase ebenfalls nur von den innenliegenden Zellen der Kolonien exprimiert wurde (Abbildung 4.2 A, B). Als Nachweis der Funktionsfähigkeit von PF-4989216 diente die konzentrationsabhängige Abnahme der Phosphorylierung von S6. Dafür wurden die auf Gelatine kultivierten Stammzellen für einen

Tag ohne LIF kultiviert, mit PF-4989216 für eine Stunde vorinkubiert und anschließend die Phosphorylierung von S6 mit LIF für 15 Minuten induziert (Abbildung 4.2 C). Die Expression der Kernpluripotenzfaktoren Oct4 und Nanog nahm bei einer Kultivierung der Zellen mit diesem PI3K Inhibitor für 4 Tage konzentrationsabhängig ebenfalls stark ab (Abbildung 4.2 D).



**Abbildung 4.2: Die Inhibition von PI3K mit PF-4989216 reduziert konzentrationsabhängig die Pluripotenz in Stammzellen.**

V6.4 Zellen wurden für 4 Tage in Anwesenheit von LIF und dem PI3K Inhibitor PF-4989216 auf Feederzellen kultiviert, anschließend fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität mit Vector *FastRed* nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden gescannt (A) und unter dem Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv, Laser: 560 nm) fotografiert (B). Der Größenbalken entspricht 250  $\mu\text{m}$ . V6.4 mES Zellen wurden 24 h ohne LIF kultiviert. Nach einer Vorinkubation mit dem PI3K Inhibitor PF-4989216 von 1h, wurden die Zellen mit 1000 U/ml LIF für weitere 15 min kultiviert und geerntet. Mittels Western Blot wurde die Herunterregulation der PI3K abhängigen Phosphorylierung von S6 Protein nachgewiesen (C). V6.4 Zellen wurden für 4 Tage mit PF-4989216 kultiviert und anschließend die Expression der pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog detektiert (D). Es wurden jeweils 20  $\mu\text{g}$  Gesamtzelllysat aufgetragen und als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

## 4.2 Stammzellen behalten bei Herunterregulation von Akt ihre Fähigkeit der Selbsterneuerung bei

Aufgrund der Beobachtung, dass die Inhibition von PI3K eindeutig das Selbsterneuerungspotential von Stammzellen beeinflusst und der Aussage von der Gruppe von Watanabe, dass Stammzellen bei einer Überexpression von aktivem Akt auch bei einer Kultivierung ohne LIF ihren pluripotenten Zustand beibehalten (S. Watanabe et al., 2006), sollte als nächster Schritt die Rolle der Akt Isoformen im Zusammenhang mit der Pluripotenzhaltung genauer untersucht werden.

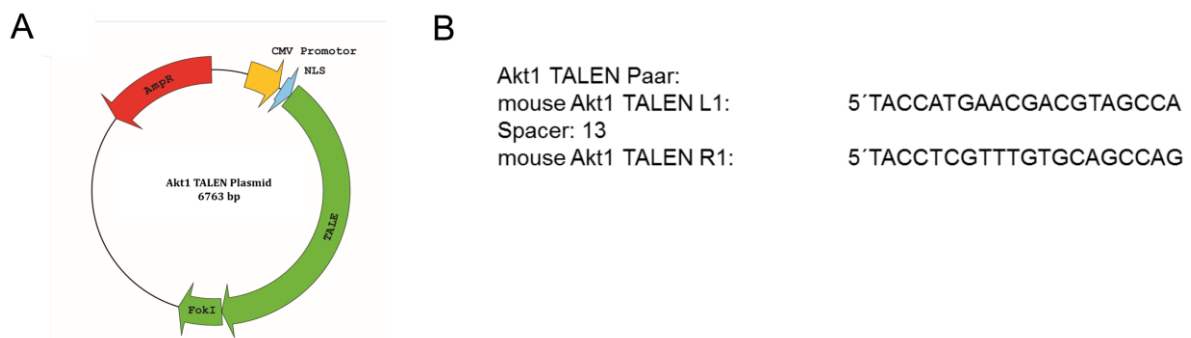
### 4.2.1 Generierung von Akt1 defizienten mES Zellen mittels TALEN Technologie

Um die Rolle von Akt1 in Stammzellen genauer zu analysieren, wurden mittels der TALEN Technologie Akt1 defiziente mES Zellen generiert. Zur Ausschaltung des Akt1 Gens in den V6.4 Zellen wurde die TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nuclease*) Technologie (Miller et al., 2011) verwendet. TALEN Konstrukte enthalten eine Kernlokalisierungssequenz, eine spezifische DNA-Bindedomäne und eine Fok I Nuklease. Nach der Bindung der DNA Bindedomäne an die entsprechende Zielsequenz des betreffenden Gens, erzeugt die Nukleaseaktivität von Fok I einen DNA Doppelstrangbruch, der anschließend durch DNA-Reparaturmechanismen der Zelle behoben wird. Aufgrund einer häufig fehlerhaften Reparatur des Doppelstrangbruchs kann dies folgend zu einer Leserasterverschiebung und somit zu einem verfrühten Stopp-Codon führen. Durch ein verfrühtes Stopp-Codon kann keine RNA als Vorlage für ein funktionelles Protein mehr exprimiert werden. Da die Fok I Nuklease ausschließlich paarweise funktionsfähig ist, werden zur Erhöhung der Spezifität zwei TALEN Konstrukte eingesetzt, die an zwei gegenüberliegenden DNA-Bindesequenzen liegen, so dass bei gleichzeitiger Bindung die Fok I dimerisieren und somit aktiv werden kann. Die für murines Akt1 spezifischen TALEN Konstrukte wurden von dem Unternehmen ToolGen Genome Engineering erworben (H. Kim et al., 2011). Die Zielsequenz des Akt1 TALEN Konstrukts liegt im Exon 1 des Akt1 Gens (Abbildung 4.3 B). Bei erfolgreichem Doppelstrangbruch in Exon 1 beider Allele und einer nachfolgenden fehlerhaften Reparatur ist also zu erwarten, dass die mit den Konstrukten transfizierten Zellen kein funktionelles Akt1 Protein mehr exprimieren.

In V6.4 Zellen wurden die Akt1 TALEN Konstrukte (Abbildung 4.3 A) mit den spezifischen Erkennungssequenzen für das Akt1 Gen im Exon1 (Akt1 TALEN Bindedomänen) (Abbildung 4.3 B), sowie auch ein entsprechendes Reporterplasmid mittels Nukleofektion eingebracht. Das Reporterplasmid dient der Selektion von Zellen, die erfolgreich alle drei Plasmide aufgenommen haben. Es exprimiert RFP (*red fluorescent protein*) und enthält die spezifische Akt1 TALEN Bindedomäne, so dass es bei Bindung der beiden TALEN Konstrukte zu einem



Doppelstrangbruch und Reparatur kommen kann. Aufgrund einer möglichen folgenden Leserasterverschiebung kommt es zu Expression von EGFP, welches zuvor außerhalb des Leserasters lag. Die Expression von EGFP wird genutzt, um die Zellen mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) zu sortieren. 48 Stunden nach der Transfektion der mES Zellen mit den TALEN Konstrukten und dem Reporterplasmid wurden die Zellen mittels FACS sortiert und in 48-Well Platten mit Feederzellen und vorgelegtem Medium einzeln ausgebracht. Aufgrund der geringen Transfektionseffizienz der mES Zellen waren unter 0,1 % der Zellen EGFP positiv (Daten nicht gezeigt).

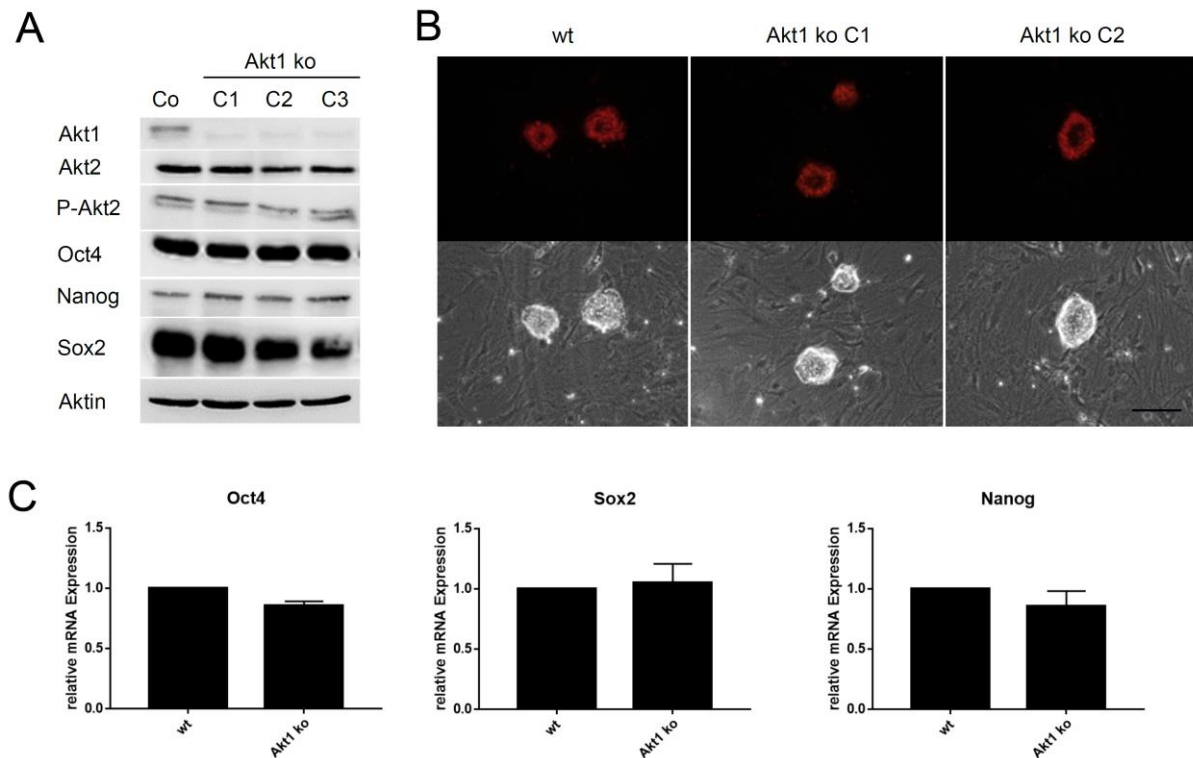


**Abbildung 4.3: Generierung einer Akt1 knockout Zelllinie mittels TALEN Technologie**

Vereinfachte schematische Darstellung des Akt1 TALEN kodierenden Plasmids (NLS = Kernlokalisierungssequenz, TALE = *Transcription Activator-like Effector*) (A) mit der Akt1 TALEN Bindungsstelle (B).

#### 4.2.2 Akt1 knockout Zellen sind pluripotent und weisen im Vergleich zu wildtyp Zellen keine Veränderungen bezüglich Morphologie und Proliferation auf

Die mit FACSs sortierten Einzelklone wurden kultiviert und vermehrt. Mittels Western Blot wurden die erhaltenen Klone auf die Akt1 Proteinexpression getestet. Drei der Akt1 defizienten Klone (Akt1<sup>-/-</sup>) wurden für weitere Analysen verwendet. Die Zellen wurden zunächst auf Feederzellen kultiviert und mittels Western Blot die Proteinexpression der Akt Isoform 2 sowie auch die Expression der Kernpluripotenzfaktoren Oct4, Nanog und Sox2 analysiert. Weder die Akt2 Expression noch die der Transkriptionsfaktoren Oct4, Nanog und Sox2 war gegenüber wildtyp (wt) Zellen verändert (Abbildung 4.4 A).

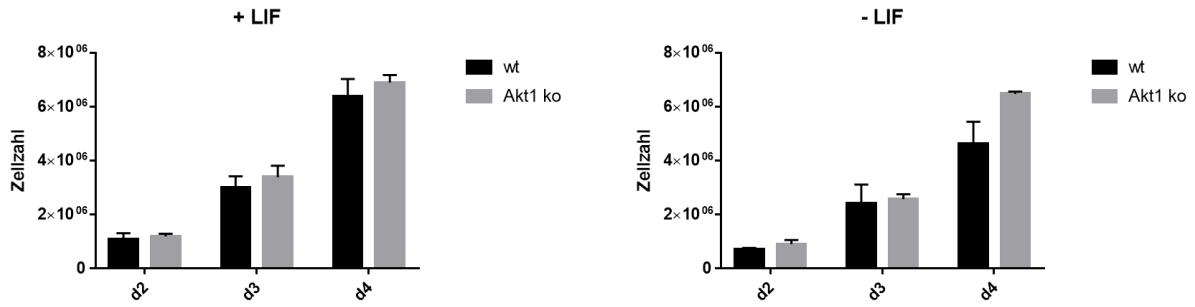


**Abbildung 4.4: Akt1 knockout mES Zellen sind pluripotent.**

Mit der TALEN Technologie generierte Akt1 ko ES Zellen wurden wie wt V6.4 Zellen auf Feederzellen kultiviert. Mittels Western Blot wurde die Expression von Akt2 und der pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktoren Oct4, Nanog und Sox2 nachgewiesen. Es wurden 20 µg Gesamtzelllysat aufgetragen und als Ladekontrolle diente β-Aktin (A). Wt und Akt1 ko Zellen wurden fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität mit Vector *FastRed* nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv, Laser: 560 nm) fotografiert (B). Der Größenbalken entspricht 250 µm. Die mRNA Expression von Oct4, Nanog und Sox2 in wt und Akt1 ko mES Zellen wurde relativ zu GAPDH und β-Aktin bestimmt. Normalisiert wurde auf die relative mRNA Expression von wt ES Zellen (C).

Die Alkalische Phosphatase Expression in Akt1<sup>-/-</sup> Zellen war ebenfalls vergleichbar mit der Expression in wildtyp Zellen. Ebenso zeigten die Akt1 knockout mES Zellen keine morphologischen Unterschiede zu wt Zellen auf (Abbildung 4.4 B). Es konnten auch keine Unterschiede bei der mit qRT-PCR analysierten Genexpression der pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog festgestellt werden (Abbildung 4.4 C).

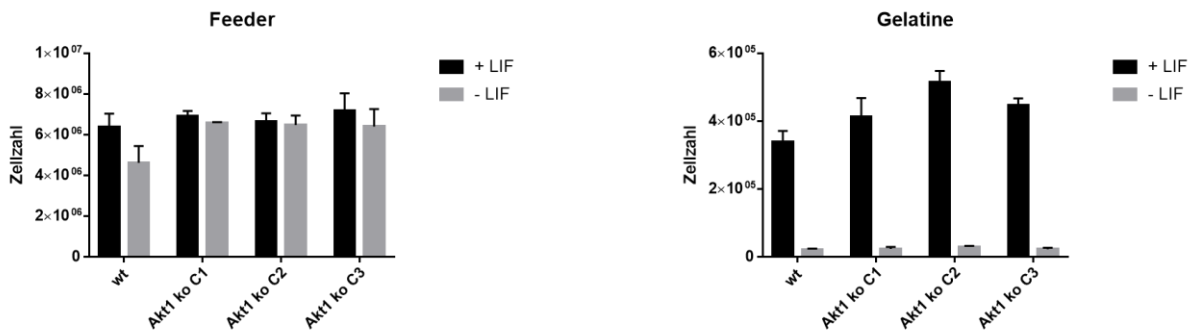
Da Akt1 in vielen Zellen einen Einfluss auf die Zellproliferation hat (Manning & Cantley, 2007), wurden die Akt1<sup>-/-</sup> Zellen in Bezug auf ihr Proliferationsverhalten analysiert. Dafür wurden 50 000 Zellen auf Feederzellen ausgebracht und in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von LIF kultiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde jeweils die Zellzahl bestimmt. Die Akt1 defizienten mES Zellen zeigten unabhängig von LIF ein mit wt Zellen vergleichbares Proliferationsverhalten (Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.5: Akt1<sup>-/-</sup> ES Zellen zeigen dasselbe Proliferationsverhalten wie wt Zellen.**

50 000 wt und Akt1<sup>-/-</sup> ES Zellen wurden jeweils auf Feederzellen ausgebracht, in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von LIF kultiviert und nach 2, 3 bzw. 4 d geerntet und gezählt.

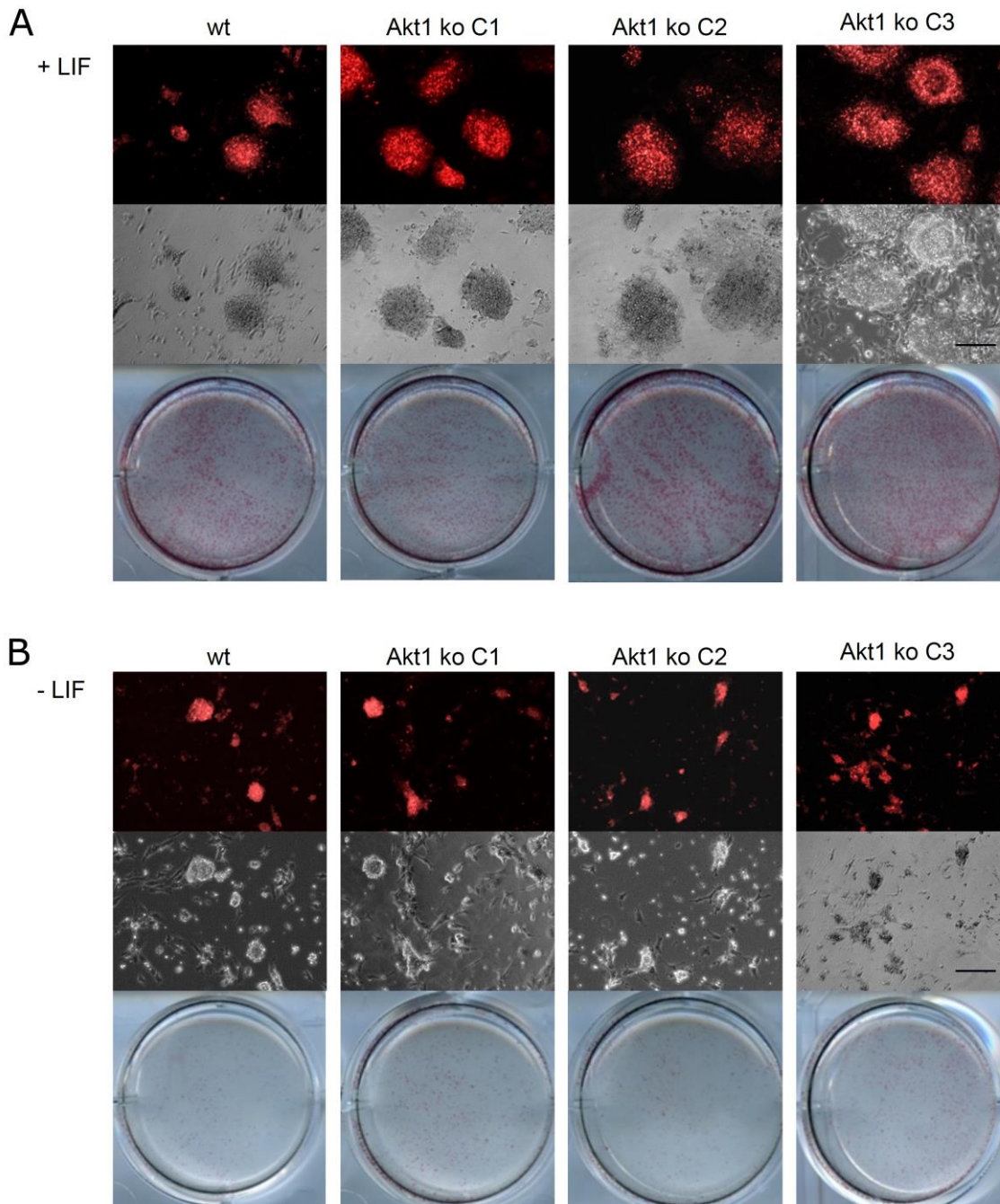
Da Feederzellen ebenfalls LIF exprimieren, wurden die Stammzellen zusätzlich zu der Kultivierung auf Feederzellen auf Gelatine kultiviert, um LIF freie Bedingungen zu gewährleisten. Nach 4 Tagen wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurde festgestellt, dass die Akt1 knockout mES Zellen dasselbe LIF abhängige Proliferationsmuster aufweisen wie wt Zellen (Abbildung 4.6).



**Abbildung 4.6: Akt1 ko ES Zellen zeigen dieselbe LIF abhängige Proliferation wie wt Zellen.**

50 000 wt und Akt1 ko ES Zellen wurden jeweils auf Feederzellen bzw. auf Gelatine ausgebracht, in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von LIF kultiviert und nach 4 d geerntet und gezählt.

Zusätzlich zum Nachweis der LIF abhängigen Proliferation der Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen wurden die Zellen auf Gelatine mit (Abbildung 4.7 A) und ohne LIF (Abbildung 4.7 B) kultiviert und nach 4 Tagen die Alkalische Phosphatase Aktivität nachgewiesen.



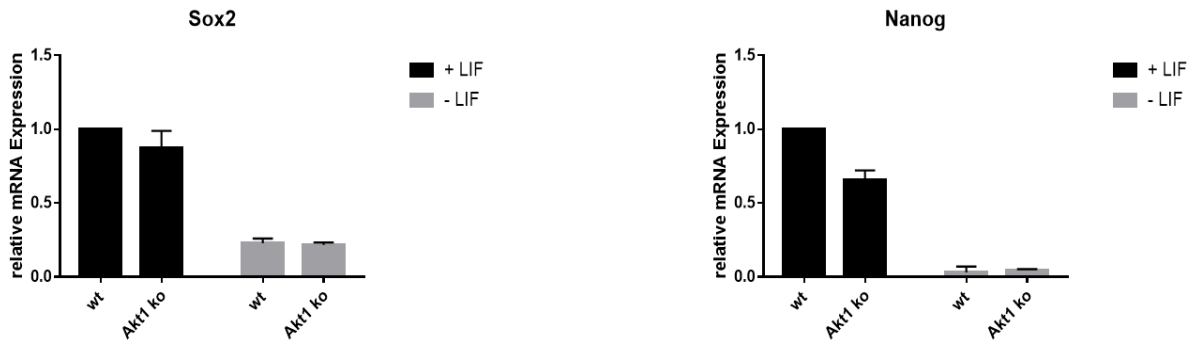
**Abbildung 4.7: Akt1 ko mES Zellen zeigen dieselbe LIF abhängige Fähigkeit der Selbsterneuerung wie wt Zellen.**

100 000 wt und Akt1 ko mES Zellen wurden auf Gelatine ausgebracht, in Anwesenheit (A) bzw. Abwesenheit (B) von LIF kultiviert und nach 4 d fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität mit Vector *FastRed* nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv, Laser: 560 nm) fotografiert (der Größenbalken entspricht 250  $\mu\text{m}$ ) bzw. gescannt.

Die Akt1 knockout Stammzellen zeigten wie wt Zellen LIF abhängige Proliferation und Selbsterneuerung.

Zusätzlich wurde die relative Genexpression der Kernpluripotenzfaktoren Sox2 und Nanog mittels qRT-PCR bestimmt. In den Zellen, die auf Gelatine ohne LIF kultiviert wurden, wurden

die Transkriptionsfaktoren in allen Stammzellen vergleichbar stark vermindert exprimiert. Folglich weisen die Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen dieselbe LIF abhängige Fähigkeit der Selbsterneuerung auf (Abbildung 4.8).

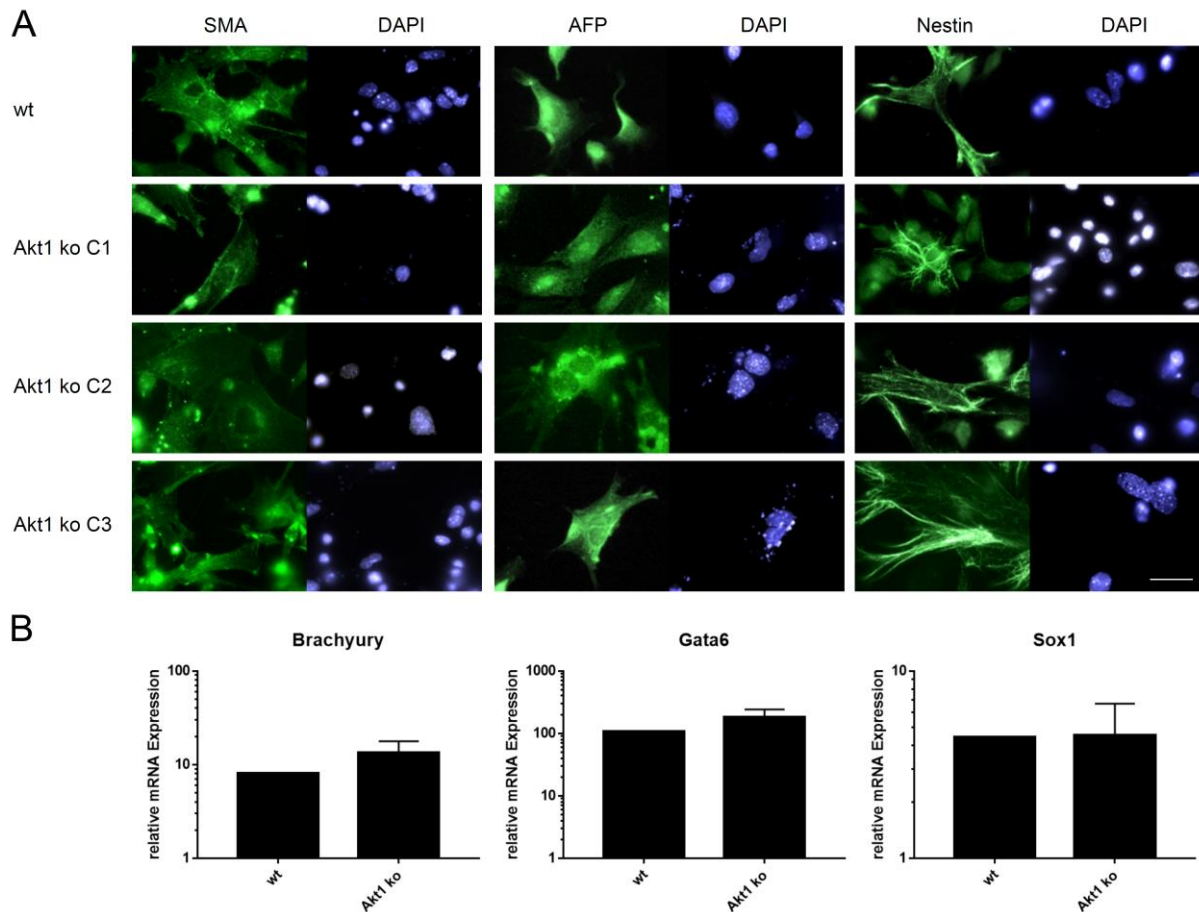


**Abbildung 4.8: Relative mRNA Expression von Sox2 und Nanog in mES Zellen auf Gelatine in Anwesenheit und Abwesenheit von LIF.**

V6.4 mES Zellen wurden für 4 Tage auf Gelatine in Anwesenheit und Abwesenheit von LIF kultiviert. Die relative mRNA Expression der pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktoren Nanog und Sox2 relativ zu GAPDH und  $\beta$ -Aktin bestimmt. Normiert wurde auf die relative mRNA Expression von mit LIF kultivierten wt mES Zellen.

Ein weiteres Pluripotenzmerkmal von Stammzellen ist die Fähigkeit, in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren (Hirai et al., 2011). Um die Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen in Bezug auf die Differenzierungsfähigkeit zu analysieren, wurden die Zellen über *embryoid bodies* (EBs) in verschiedenen Differenzierungsmedien in Zellen der drei Keimblätter differenziert. Nach der Differenzierung wurden die Zellen fixiert und die keimblattspezifische Proteinexpression mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. SMA (*Smooth Muscle Actin*) wird in mesodermal, AFP (*Alpha Fetoprotein*) in endodermal und Nestin in ektodermal differenzierten Vorläuferzellen exprimiert. Sowohl die Akt1 defizienten als auch die wt Stammzellen konnten in Zellen der drei Keimblätter differenzieren (Abbildung 4.9 A). Zusätzlich zu der Immunfluoreszenzfärbung wurden die differenzierten Zellen per qRT-PCR bezüglich der relativen Genexpression Keimblattspezifischer Gene untersucht. Brachyury wird in mesodermal, Gata6 in endodermal und Sox1 in ektodermal differenzierten Vorläuferzellen exprimiert (Abbildung 4.9 B)





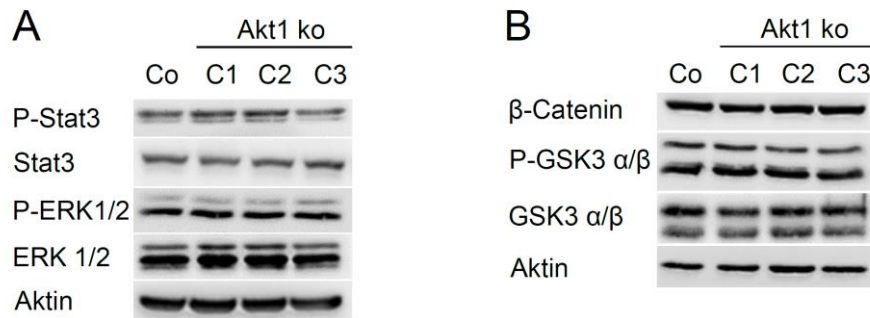
**Abbildung 4.9: Differenzierte Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen exprimieren keimblattspezifische Proteine.**

Akt1<sup>-/-</sup> und wt V6.4 Zellen wurden über *embryoid bodies* in Zellen der drei Keimblätter differenziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit entsprechenden GFP-gekoppelten Primärantikörpern inkubiert. Darstellung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (63x Immersionsobjektiv) über Alexa Fluor 488 gekoppelte Sekundärantikörper. DAPI-Färbung: Lokalisation der Zellkerne. Der Größenbalken entspricht 50  $\mu$ m (A). Von analog differenzierten Zellen wurde die mRNA Expression von Brachyury, GATA6 und Sox1 relativ zu GAPDH und  $\beta$ -Aktin bestimmt. Normiert wurde auf undifferenzierte V6.4 mES Zellen und Akt1 ko ES Zellen anschließend auf die jeweiligen undifferenzierten Kontrollzellen (B). SMA und Brachyury wird in mesodermalen, AFP und GATA6 in endodermalen und Nestin und Sox1 in ektodermalen Vorläuferzellen exprimiert.

#### 4.2.3 Sowohl wt als auch Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen zeigen LIF-abhängige Phosphorylierung von Stat3 und ERK1/2

Da in Stammzellen LIF nicht nur den PI3K/Akt Signalweg, sondern auch den JAK/STAT und MAPK Signalweg beeinflusst, wurden mittels Western Blot Analysen die Lysate von Akt1 knockout und wt mES Zellen bezüglich der Aktivierung der beiden anderen Signalwege getestet. Dazu wurde in Zelllysaten von Zellen, die auf Feederzellen in Anwesenheit von LIF kultiviert wurden, der Phosphorylierungsstatus von Stat3 und ERK1/2 analysiert. Die Daten zeigten, dass im Grundzustand der Zellen keine unterschiedliche Phosphorylierung und somit Aktivierung von Stat3 und ERK1/2 vorlagen (Abbildung 4.10 A).

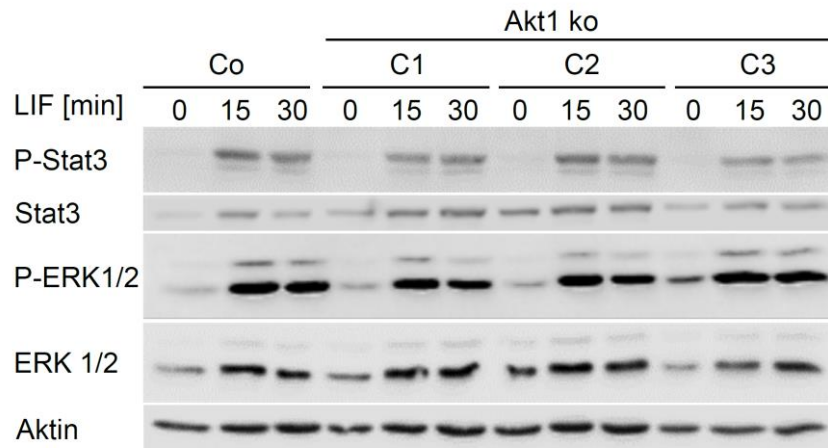
Außerdem spielt in Stammzellen der WNT/ $\beta$ -Catenin eine Rolle bei der Pluripotenzhaltung und Differenzierung. Im Western Blot konnte im Grundzustand der Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen im Vergleich zu wt Zellen jedoch keine Änderung der  $\beta$ -Catenin Expression bzw. der GSK3 $\beta$  Phosphorylierung detektiert werden (Abbildung 4.10 B).



**Abbildung 4.10: In Akt1 ko mES Zellen sind weder die  $\beta$ -Catenin Expression noch die Phosphorylierung von Stat3 und ERK1/2 verändert.**

Akt1 ko mES Zellen und wt V6.4 Zellen wurden auf Feederzellen kultiviert. Mittels Western Blot wurde die LIF abhängige Phosphorylierung von Stat3 und ERK1/2 detektiert (A). Zusätzlich wurde die Expression von  $\beta$ -Catenin und die Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenin Targets GSK3  $\beta$  nachgewiesen (B). Es wurden 20  $\mu$ g Gesamtzelllysate aufgetragen und als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

Des Weiteren wurden die Akt1 defizienten und wt mES Zellen getestet, ob Stat3 und ERK1/2 dasselbe LIF induzierbare Phosphorylierungsmuster aufweisen. Dafür wurden die Zellen für 3 Tage in Anwesenheit von LIF auf Gelatine kultiviert, anschließend für weitere 24 Stunden ohne LIF kultiviert und danach für 15 Minuten mit LIF stimuliert und geerntet. Sowohl Akt1<sup>-/-</sup> als auch wt Stammzellen wiesen dieselbe LIF-abhängige Phosphorylierung von Stat3 und ERK1/2 auf (Abbildung 4.11).



**Abbildung 4.11: Stat3 und ERK1/2 werden in Akt1 ko mES Zellen gleichermaßen phosphoryliert wie in wt Zellen.**

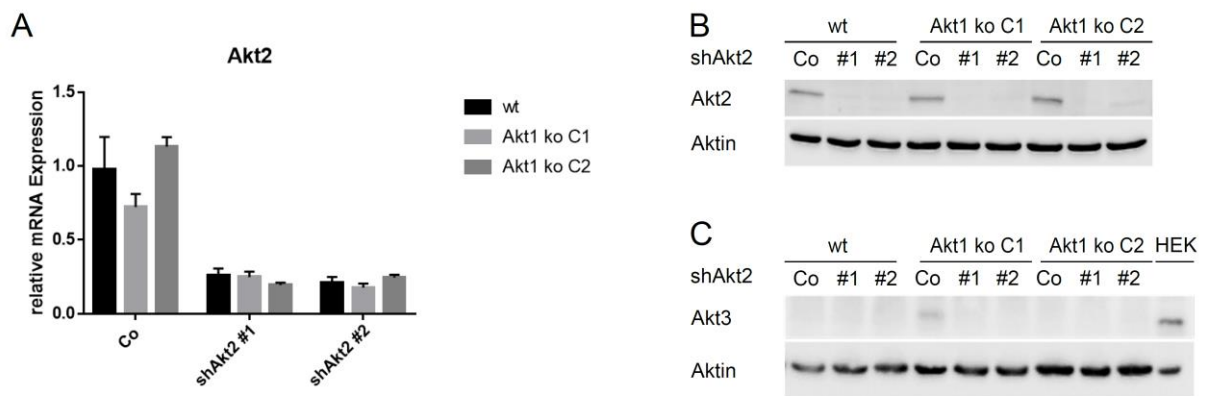
V6.4 ES und Akt1 ko Zellen wurden 24h ohne LIF kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 15 bzw. 30 min mit 1000 U/ml LIF stimuliert und geerntet. Mittels Western Blot wurde die LIF abhängige Phosphorylierung von Stat3 und ERK1/2 nachgewiesen. Es wurden 20 µg Gesamtzelllysate aufgetragen und als Ladekontrolle diente β-Aktin.

#### **4.2.4 Stammzellen behalten ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowohl bei einem knockdown von Akt2 als auch bei einem Doppelknockdown von Akt1 und Akt2 bei**

Aufgrund der vorangegangenen Experimente, bei denen festgestellt wurde, dass ein Verlust von Akt1 keinen Einfluss auf die Pluripotenzerhaltung in Stammzellen hat, obwohl eine Inhibition von PI3K die Pluripotenz der Zellen beeinflusst, wurde Akt2 in V6.4 wt und Akt1 defizienten Zellen mittels shRNA (*short hairpin RNA*) herunterreguliert. Die Generierung von shRNA exprimierenden Zellpools erfolgte durch Transduktion der wt und Akt1 knockout mES Zellen mit Lentiviren. Durch eine anschließende Selektion der shRNA exprimierenden Zellen mit Puromycin wurden nicht oder wenig transduzierte Zellen aus dem jeweiligen Zellpool entfernt.

Die erfolgreiche Herunterregulation von Akt2 in den transduzierten Zellen wurde mittels qRT-PCR und Western Blot analysiert. Bei der qRT-PCR Analyse konnte gezeigt werden, dass die relative mRNA Expression in den transduzierten und selektionierten shAkt2 exprimierenden Zellen um mindestens 75% reduziert vorlag (Abbildung 4.12 A). Im Western Blot wurde bei den selektionierten Zellen kein Akt2 detektiert. Um auszuschließen, dass die Akt Isoform 3 eventuell die Funktion von Akt1 bzw. Akt2 in den Stammzellen übernimmt, wurde im Western Blot eine gleichbleibende Akt3 Expression in den selektionierten Akt defizienten mES Zellen gezeigt. Als Kontrolle für eine positive Akt3 Expression wurden Lysate von HEK 293 FT Zellen verwendet (Abbildung 4.12 B).

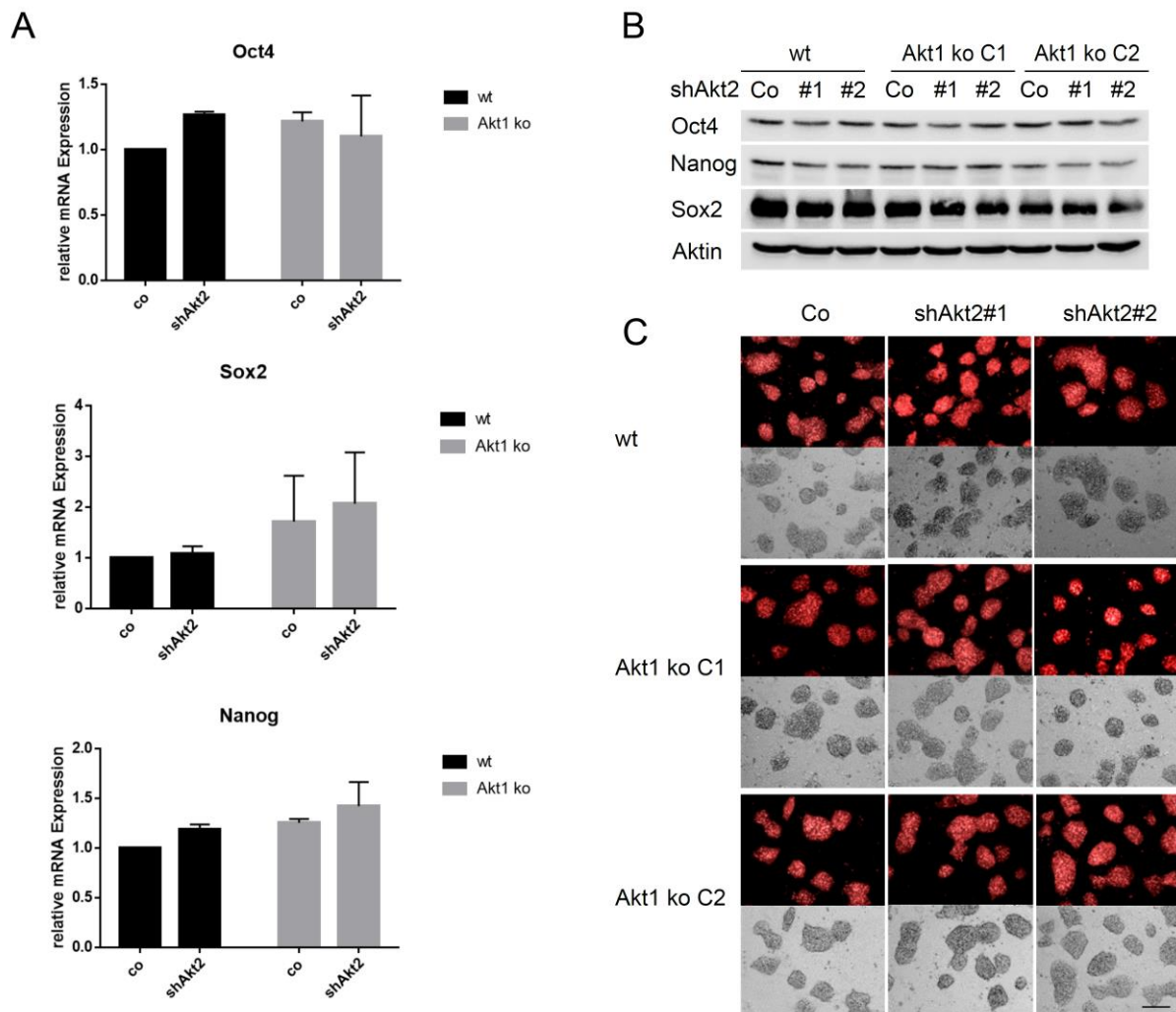




**Abbildung 4.12: Die Expression von Akt3 bleibt bei einer Herunterregulation von Akt2 in Akt1 ko mES Zellen unverändert.**

V6.4 mES Zellen und Akt1 ko mES Zellen wurden mit lentiviralen shRNA Konstrukten für Akt2 transduziert und shRNA exprimierende Zellen mit Puromycin selektioniert. Die mRNA Expression von Akt2 in den mit Puromycin selektionierten Zellen wurde relativ zu GAPDH und  $\beta$ -Aktin bestimmt. Normalisiert wurde auf die relative mRNA Expression von wt ES Zellen (A). Mittels Western Blot wurde in den selektionierten Zellen die Herunterregulation von Akt2 (B) und die Expression von Akt3 (C) nachgewiesen. Als Positivkontrolle für die Akt3 Expression wurde zusätzlich das Lysat von HEK Zellen aufgetragen. Es wurden jeweils 20  $\mu$ g Gesamtzelllysate aufgetragen und als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

Die Akt2 shRNA exprimierenden wt und Akt1<sup>-/-</sup> Stammzellen wurden anschließend auf deren Fähigkeit der Pluripotenzhaltung untersucht. Dazu wurden die mES Zellen auf Feederzellen in Anwesenheit von LIF und Puromycin kultiviert. Mittels qRT-PCR wurde die relative mRNA Expression der Kernpluripotenzfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog analysiert. Sowohl die Akt2 knockdown als auch die Akt1/Akt2 doppelknockdown Zellen exprimierten die Transkriptionsfaktoren in vergleichbarem Maß bzw. leicht erhöht im Vergleich zu wt Zellen (Abbildung 4.13 A). Diese gleichbleibende Expression von Oct4, Sox2 und Nanog konnte mit einer Western Blot Analyse der entsprechenden Zelllysate bestätigt werden (Abbildung 4.13 B). Zusätzlich wurden die Zellen fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität detektiert. Alle Zellpopulationen zeigten eine vergleichbare Morphologie und Alkalische Phosphatase Expression (Abbildung 4.13 C).



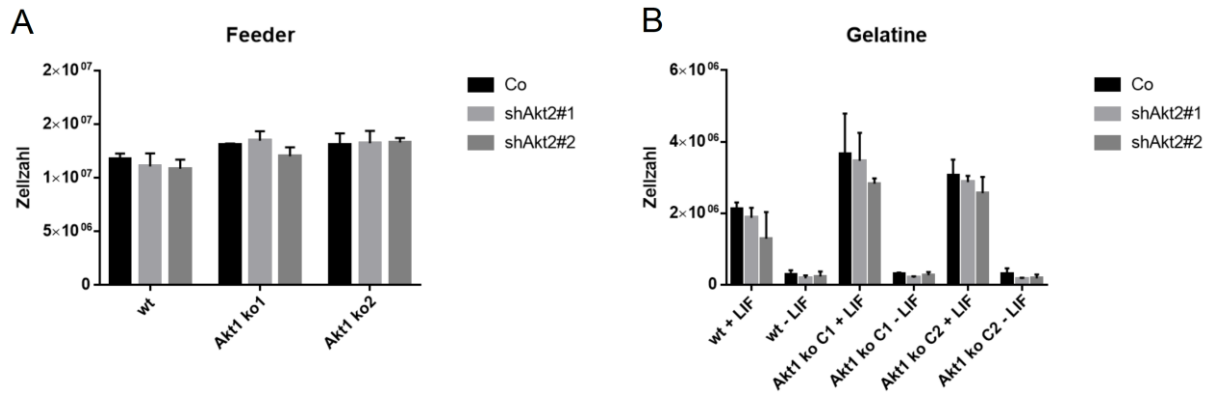
**Abbildung 4.13: mES Zellen mit einem Akt2 bzw. einem Akt1/Akt2 knockdown bleiben pluripotent**

V6.4 mES Zellen und Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen wurden mit shRNA Konstrukten für Akt2 transduziert und shRNA exprimierende Zellen mit Puromycin selektioniert. Die mRNA Expression von Oct4, Nanog und Sox2 wurde relativ zu GAPDH und β-Aktin bestimmt. Normalisiert wurde auf die relative mRNA Expression von wt ES Zellen (A). Mittels Western Blot wurde in den selektionierten Zellen die Expression der pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktoren Oct4, Nanog und Sox2 nachgewiesen. Es wurden 20 µg Gesamtzelllysate aufgetragen und als Ladekontrolle diente β-Aktin (B). Die selektionierten Zellen wurden außerdem fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität mit Vector *FastRed* nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv, Laser: 560 nm) fotografiert (C). Der Größenbalken entspricht 250 µm.

#### 4.2.5 Akt2 knockdown und Akt1/Akt2 knockdown mES Zellen zeigen das selbe LIF-abhängige Proliferationsverhalten wie wt Zellen

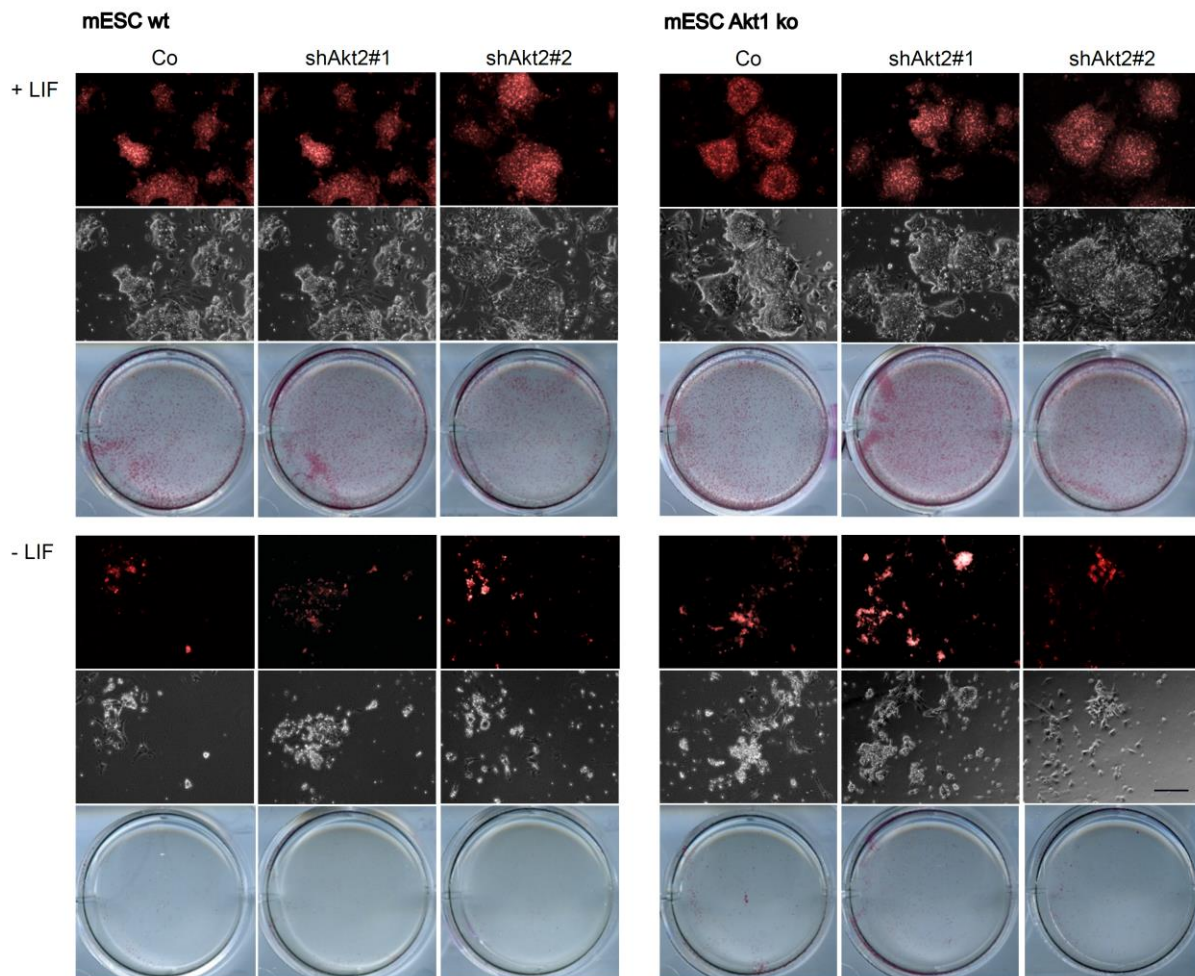
Wie zuvor bei den Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen wurde das Proliferationsverhalten der wt und der Akt1 knockdown mES Zellen mit einem zusätzlichen Akt2 knockdown bestimmt. Dazu wurden jeweils 50 000 Zellen auf Feederzellen bzw. Gelatine ausgebracht und nach 4 Tagen Kultivierung in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von LIF geerntet und gezählt. Wie schon bei den Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen gezeigt wurde, wiesen auch die Zellen, bei denen zusätzlich Akt2 herunterreguliert war,

die selbe LIF abhängige Proliferation wie entsprechende wt Zellen, wobei die Akt1 defizienten Zellen eine tendenziell leicht höhere Teilungsrate aufwiesen (Abbildung 4.14)



**Abbildung 4.14: Akt1/2 knockdown mES Zellen zeigen dieselbe LIF abhängige Proliferation wie wt Zellen.** 50 000 wt mES Zellen, Akt1 ko mES Zellen mit und ohne Akt2 knockdown wurden jeweils auf Feederzellen bzw. auf Gelatine ausgebracht, in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von LIF kultiviert und nach 4 d geerntet und gezählt.

Zusätzlich zum Nachweis der LIF abhängigen Proliferation der Akt2 knockdown und Akt1/Akt2 doppelknockdown mES Zellen wurden die Zellen auf Gelatine mit und ohne LIF kultiviert und nach 4 Tagen die Alkalische Phosphatase Aktivität nachgewiesen. Die Akt2 bzw. Akt1/Akt2 defizienten Stammzellen zeigten wie wt und Akt1 knockout Zellen ein vergleichbares LIF abhängiges Pluripotenzverhalten (Abbildung 4.15).

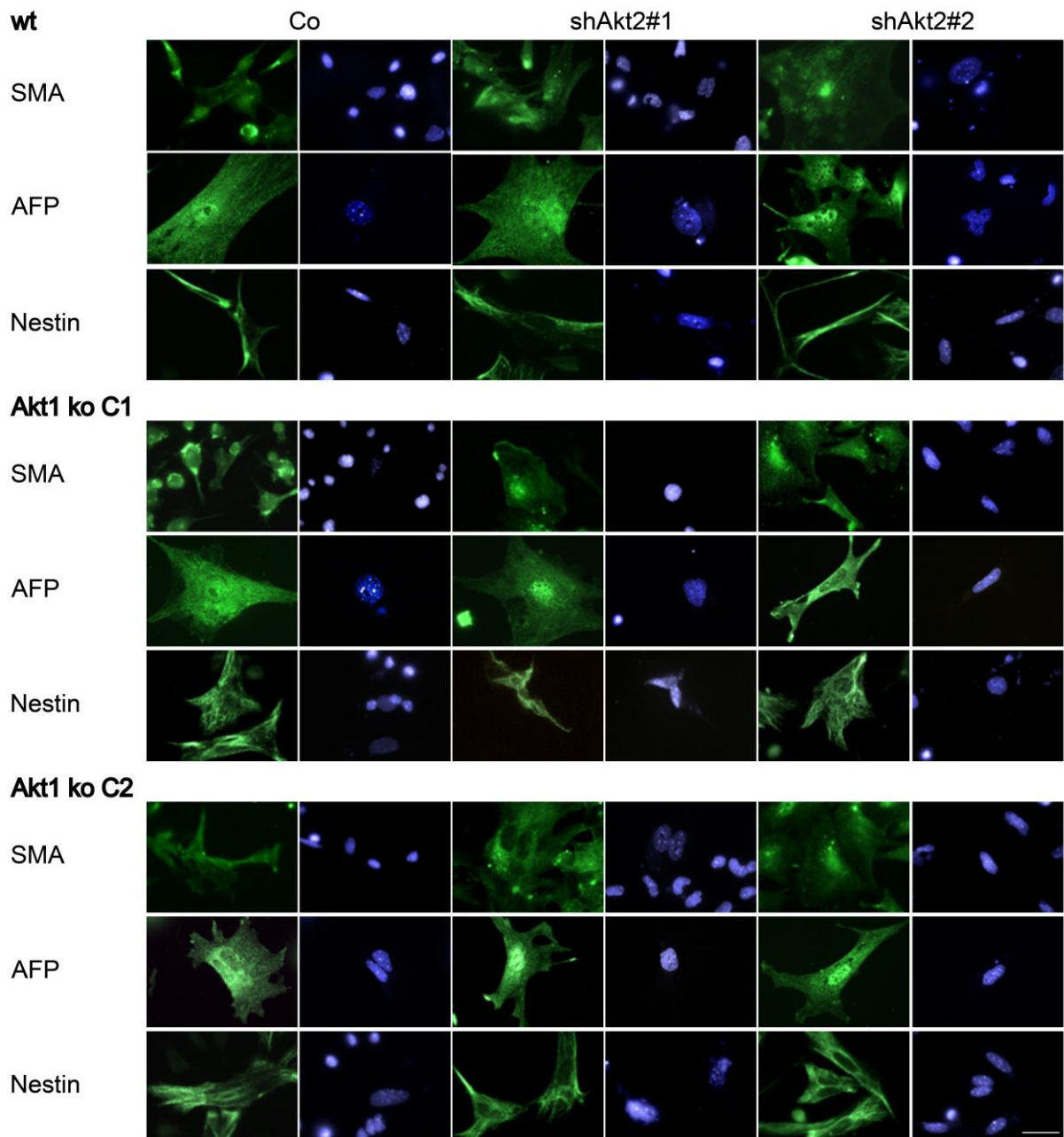


**Abbildung 4.15: Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen mit zusätzlichem Akt2 knockdown zeigen dieselbe LIF abhängige Fähigkeit der Selbsterneuerung und Proliferation wie wt Zellen.**

100 000 wt, Akt1 ko und Akt2 shRNA exprimierende mES Zellen wurden jeweils auf Gelatine ausgebracht, in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von LIF kultiviert, nach 4 d fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität mit Vector *FastRed* nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv, Laser: 560 nm) fotografiert (der Größenbalken entspricht 250  $\mu$ m) bzw. gescannt.

#### **4.2.6 Akt2 und Akt1/Akt2 defiziente mES Zellen können in Zellen der drei Keimblätter differenzieren**

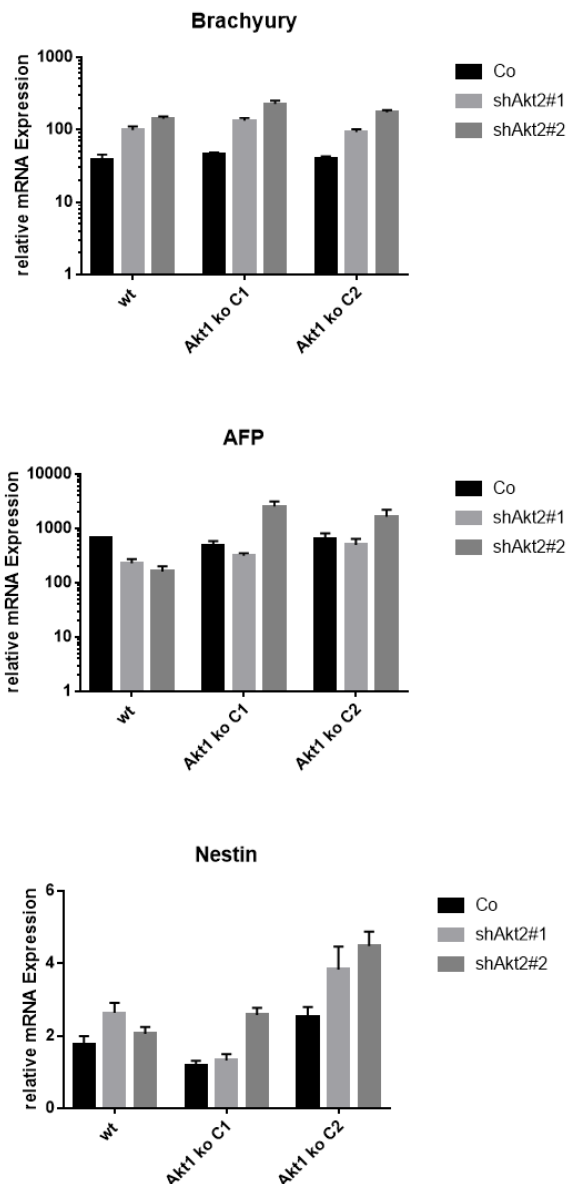
Um die Akt2 bzw. Akt1/Akt2 defizienten mES Zellen in Bezug auf die Differenzierungsfähigkeit zu analysieren, wurden die Zellen über EBs in verschiedenen Differenzierungsmedien in Zellen der drei Keimblätter differenziert. Nach der Differenzierung wurden die Zellen fixiert und die keimblattspezifische Proteinexpression mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. SMA wird in mesodermal, AFP in endodermal und Nestin in ektodermal differenzierten Vorläuferzellen exprimiert. Sowohl die shAkt2 exprimierenden Akt1<sup>-/-</sup> als auch wt Stammzellen konnten in Zellen der drei Keimblätter differenzieren (Abbildung 4.16).



**Abbildung 4.16: Differenzierte Akt1/Akt2 defiziente mES Zellen exprimieren keimblattspezifische Proteine.** Akt1<sup>-/-</sup> und wt V6.4 Zellen mit zusätzlichem Akt2 knockdown wurden über *embryoid bodies* in Zellen der drei Keimblätter differenziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit entsprechenden GFP-gekoppelten Primärantikörpern inkubiert. Darstellung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (63x Immersionsobjektiv) über Alexa Fluor 488 gekoppelte Sekundärantikörper. DAPI-Färbung: Lokalisation der Zellkerne. Der Größenbalken entspricht 50 µm. SMA wird in mesodermalen, AFP in endodermalen und Nestin in ektodermalen Vorläuferzellen exprimiert.



Zusätzlich zu der Immunfluoreszenzfärbung wurden die differenzierten Zellen per qRT-PCR bezüglich der Expression Keimblattspezifischer Gene untersucht. Brachyury wird in mesodermal differenzierten Vorläuferzellen exprimiert (Abbildung 4.17).



**Abbildung 4.17: Differenzierte Akt1/Akt2 defiziente mES Zellen exprimieren keimblatt-spezifische Gene.**

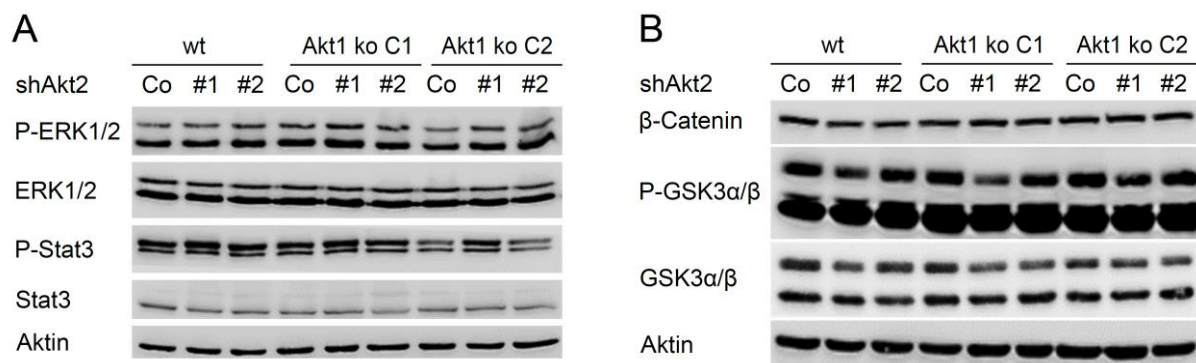
Akt1<sup>-/-</sup> (Akt1 ko) und wt V6.4 Zellen mit zusätzlichem Akt2 knockdown (shAkt2) wurden über *embryoid bodies* in Zellen der drei Keimblätter differenziert. Die mRNA Expression von Brachyury, AFP und Nestin wurde relativ zu GAPDH und  $\beta$ -Aktin bestimmt. Normiert wurde auf undifferenzierte V6.4 mES Zellen und anschließend auf die jeweiligen undifferenzierten Kontrollzellen. Brachyury wird in mesodermalen, AFP in endodermalen und Nestin in ektodermalen Vorläuferzellen exprimiert.

#### 4.2.7 Akt2 und Akt1/Akt2 defiziente mES Zellen zeigen die selbe LIF-abhängige Phosphorylierung von Stat3 und ERK1/2

Wie zuvor bei den mit TALEN generierten Akt1 defizienten mES Zellen, wurden diese und wt Zellen, bei denen zusätzlich Akt2 herunterreguliert war, mittels Western Blot bezüglich der Aktivierung des JAK/STAT und MAPK Signalwegs untersucht. Dafür wurde in den entsprechenden Zelllysaten von Stammzellen, die auf Feederzellen in Anwesenheit von LIF kultiviert wurden, der Phosphorylierungsstatus von Stat3 und ERK1/2 analysiert. Die Daten

zeigten, dass im Grundzustand der Zellen keine unterschiedliche Phosphorylierung und somit keine unterschiedliche Aktivierung von Stat3 und ERK1/2 in den analysierten Zellen vorlag (Abbildung 4.18 A).

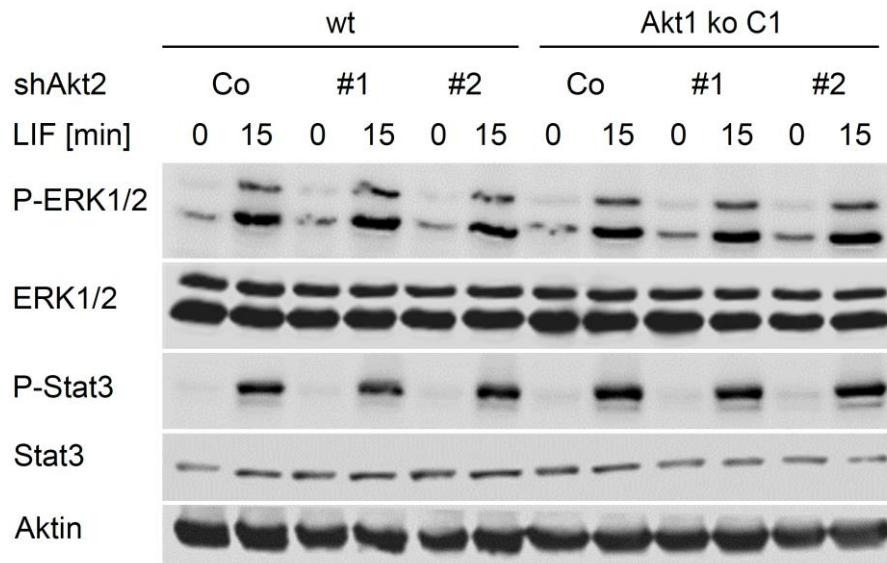
Zusätzlich zu der Phosphorylierung von Stat3 und ERK1/2 wurde die Expression von  $\beta$ -Catenin bzw. die GSK3 $\beta$  Phosphorylierung analysiert. Im Grundzustand der Zellen konnte sowohl keine Änderung in der  $\beta$ -Catenin Expression als auch bei der GSK3 $\beta$  Phosphorylierung festgestellt werden (Abbildung 4.18 B).



**Abbildung 4.18:** In Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen mit zusätzlichem Akt2 knockdown sind weder die Phosphorylierung von Stat3 und ERK1/2 noch die  $\beta$ -Catenin Expression verändert.

Wt und Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen mit und ohne Akt2 knockdown wurden auf Feederzellen kultiviert. Mittels Western Blot wurde die LIF abhängige Phosphorylierung von Stat3 und ERK1/2 detektiert (A). Zusätzlich wurde die Expression von  $\beta$ -Catenin und die Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenin Targets GSK3 $\beta$  nachgewiesen (B). Es wurden jeweils 20  $\mu$ g Gesamtzelllysate aufgetragen und als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

Des Weiteren wurden die shAkt2 exprimierenden, Akt1<sup>-/-</sup> und wt mES Zellen getestet, ob Stat3 und ERK1/2 dasselbe LIF induzierbare Phosphorylierungsmuster von Stat3 und ERK1/2 aufweisen. Dafür wurden die Zellen für 3 Tage in Anwesenheit von LIF auf Gelatine kultiviert, anschließend für weitere 24 Stunden ohne LIF kultiviert und danach für 15 Minuten mit LIF stimuliert. Alle untersuchten Stammzellen zeigten dieselbe LIF-abhängige Phosphorylierung von Stat3 und ERK1/2 (Abbildung 4.19).



**Abbildung 4.19: Stat3 und ERK1/2 werden in Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen mit zusätzlichem Akt2 knockdown gleichermaßen phosphoryliert wie in wt Zellen.**

V6.4 mES und Akt1<sup>-/-</sup> Zellen mit und ohne zusätzlichem Akt2 knockdown wurden 24h ohne LIF kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit 1000 U/ml LIF und geerntet. Mittels Western Blot wurde die LIF abhängige Phosphorylierung von Stat3 und ERK1/2 nachgewiesen. Es wurden 20 µg Gesamtzelllysate aufgetragen und als Ladekontrolle diente β-Aktin.

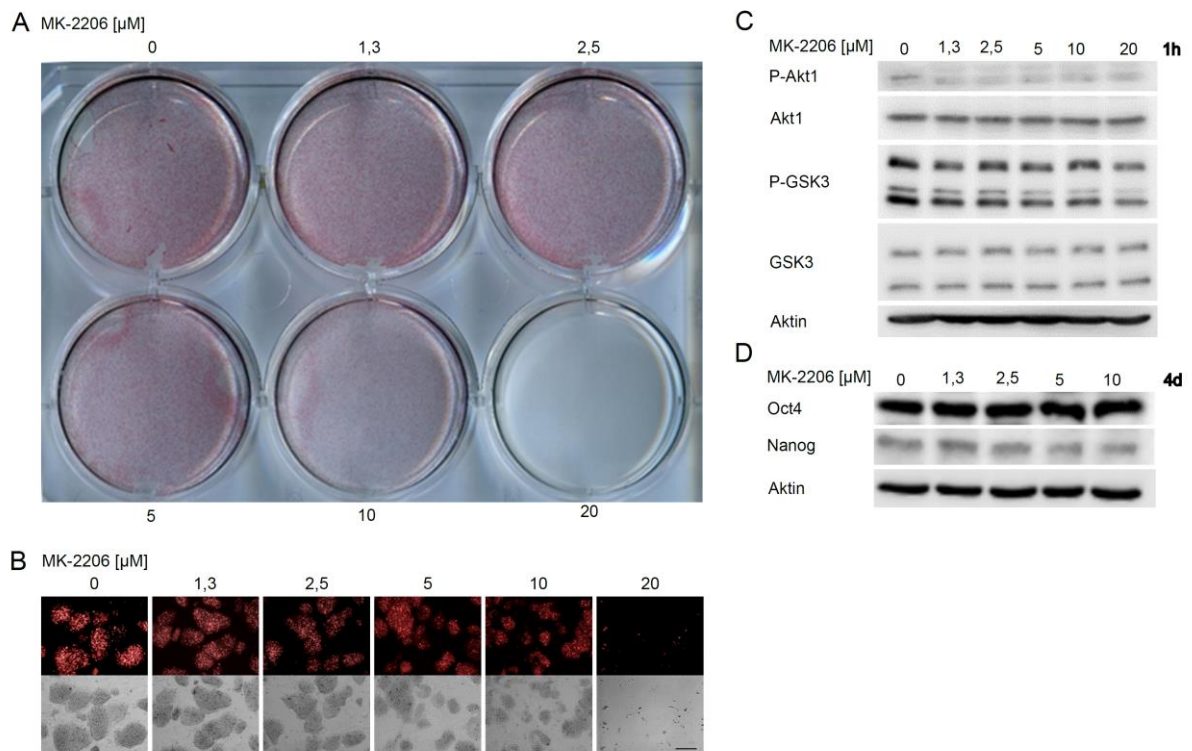
#### 4.2.8 Stammzellen behalten bei Inhibition von Akt mit MK-2206 ihre Fähigkeit der Pluripotenz

Aufgrund der erstaunlichen Ergebnisse, dass weder der Verlust von Akt1 oder Akt2 bzw. von beiden Isoformen gleichzeitig zu Änderungen der Pluripotenzfähigkeit in den V6.4 mES Zellen führt, sollte ausgeschlossen werden, dass die Akt Isoform 3 das Defizit der beiden anderen Isoformen kompensiert.

Daher wurden mES Zellen für 4 Tage mit dem Akt Inhibitor MK-2206 (0 – 20 µM), der alle drei Akt Isoformen inhibiert, auf Feederzellen kultiviert, anschließend fixiert und die Expression der Alkalischen Phosphatase detektiert. Erst mit hohen Konzentrationen des Inhibitors (ab 5 µM) nahm die Größe der Zellkolonien leicht ab, die Zellen exprimierten jedoch trotzdem Alkalische Phosphatase vergleichbar zu Kontrollzellen (Abbildung 4.20 A, B). Ab einer Konzentration von 20 µM wirkte der Inhibitor zytotoxisch. Mittels Western Blot wurde gezeigt, dass nach einer 24 stündigen Kultivierung der mES Zellen auf Gelatine ohne LIF mit einer anschließenden Vorinkubation von einer Stunde mit MK-2206, die LIF induzierte Phosphorylierung von Akt1 deutlich geringer war als bei Kontrollzellen (Abbildung 4.20 C). In Übereinstimmung zu der gleichbleibenden Expression der Alkalischen Phosphatase bei einer Kultivierung der mES Zellen für 4 Tage mit dem Akt Inhibitor, wurde eine gleichbleibende Expression der Kernpluripotenzfaktoren Oct4 und Nanog im Western Blot detektiert (Abbildung 4.20 D).



Somit wurde gezeigt, dass die Inhibition von Akt mit MK-2206 über den Zeitraum von 4 Tagen ebenfalls keinen Einfluss auf die Pluripotenz der V6.4 Zellen hat. Die Zellen wurden daher über einen Zeitraum von 21 Tagen zusammen mit MK-2206 kultiviert, wobei es keinen auswertbaren Unterschied zu den Zellen, die 4 Tage mit dem Inhibitor kultiviert waren gab (Daten nicht gezeigt).



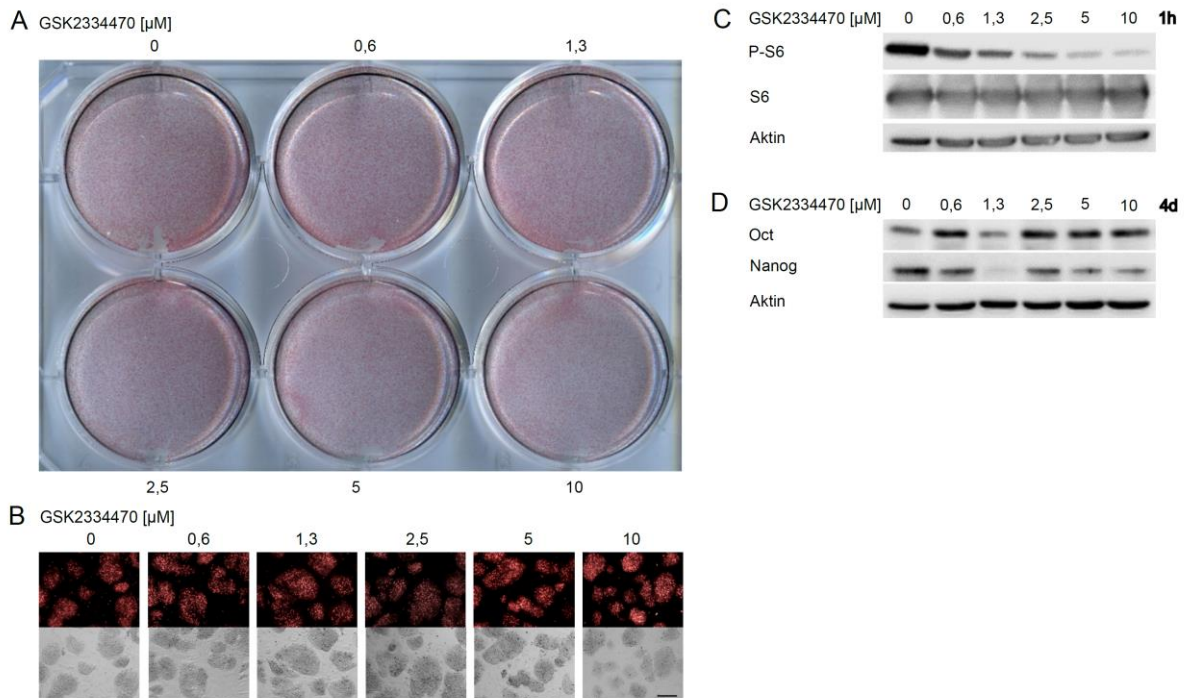
**Abbildung 4.20: Bei einer Inhibition von Akt bleiben V6.4 mES Zellen pluripotent.**

V6.4 mES Zellen wurden für 4 Tage in Anwesenheit von LIF und dem Akt Inhibitor MK-2206 auf Feederzellen kultiviert, anschließend fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität mit Vector *FastRed* nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden gescannt (A) und unter dem Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv, Laser: 560 nm) fotografiert (B). Der Größenbalken entspricht 250  $\mu\text{m}$ . Die Zellen wurden zudem 24 h ohne LIF kultiviert. Nach einer Vorinkubation mit MK-2206 von 1h, wurden die Zellen mit 1000 U/ml LIF für weitere 15 min kultiviert und geerntet. Mittels Western Blot wurde die Phosphorylierung Akt1 und GSK3 $\beta$  nachgewiesen (C). V6.4 mES Zellen wurden für 4 d mit MK-2206 kultiviert und anschließend die Expression der pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog mittels Western Blot detektiert (D). Es wurden jeweils 20  $\mu\text{g}$  Gesamtzelllysate aufgetragen und als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

### 4.3 Stammzellen behalten bei Inhibition von PDK1 ihr Selbsterneuerungspotential

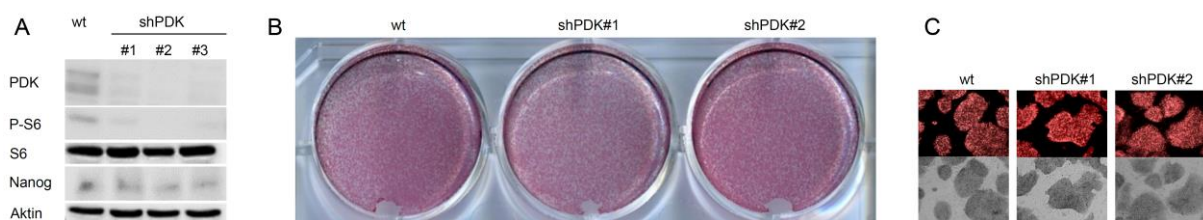
Da aktivierte PI3K zu einer Aktivierung von PDK1 führt und gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition von PI3K mit den Inhibitoren LY294002 und PF-4989216 das Selbsterneuerungspotential von Stammzellen negativ beeinflusst, wurde als nächstes die Rolle von PDK1 in Bezug auf die Selbsterneuerung in Stammzellen genauer untersucht. Dafür wurden mES Zellen für 4 Tage in Anwesenheit des PDK1 Inhibitors GSK2334470 in unterschiedlichen Konzentrationen (0 – 10  $\mu$ M) auf Feederzellen kultiviert, anschließend fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität der Zellen analysiert. Im Gegensatz zur Kultivierung der Stammzellen mit einem PI3K Inhibitor, waren die Zellkolonien auch bei Kultivierung mit hohen Inhibitorkonzentrationen nicht wesentlich im Vergleich zu Kontrollzellen bezüglich Größe, Morphologie und der Alkalische Phosphatase Aktivität verändert (Abbildung 4.21 A, B). Mittels Western Blot wurde die Funktion des PDK1 Inhibitors nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass der Inhibitor mit höheren Konzentrationen (ab 2,5  $\mu$ M) zu einer geringeren Phosphorylierung des Targetproteins S6 führt. Dazu wurden auf Gelatine kultivierte mES Zellen für 24h ohne LIF weiterkultiviert, anschließend mit GSK2334479 (0 – 10  $\mu$ M) für 1 Stunde inkubiert und danach für 15 Minuten die Phosphorylierung von S6 mit LIF für 15 Minuten induziert. Mit zunehmender Konzentration des Inhibitors nahm die Phosphorylierung von S6 sehr stark ab (Abbildung 4.21 C). Passend zu den Ergebnissen der Alkalischen Phosphatase Expression wurde mittels Western Blot gezeigt, dass bei einer Kultivierung mit dem Inhibitor für 4 Tage die Expression der pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog nicht beeinträchtigt wurde (Abbildung 4.21 D).

Aufgrund der erstaunlichen Tatsache, dass die Inhibition von PDK1 keinen Effekt auf die Pluripotenzerhaltung der Stammzellen hat, obwohl die Inhibition von PI3K einen eindeutigen Effekt zeigt, wurden die Zellen mit shRNA Konstrukten zur Herunterregulation von PDK1 transduziert, um unspezifische Effekte des PDK Inhibitors auszuschließen. Zur Erzeugung eines stabilen shRNA exprimierenden Zellpools, wurden zunächst mit HEK 293T Zellen entsprechende Lentiviren hergestellt. Mit diesen Lentiviren wurden die mES Zellen transduziert. Anschließend wurden die transduzierten Zellen mit Puromycin selektioniert. Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass PDK1 mit den shRNA Konstrukten effizient herunterreguliert wurde. In den selektionierten Zellen wurde außerdem das PDK1 Targetprotein S6 deutlich geringer phosphoryliert als in Kontrollzellen (Abbildung 4.22 A). In Übereinstimmung mit den mES Zellen, die mit dem PDK Inhibitor GSK2334470 kultiviert wurden, waren auch Zellen mit herunterregulierter PDK1 weder Änderungen der Alkalischen Phosphatase Expression noch in der Koloniemorphologie erkennbar (Abbildung 4.22 B, C).



**Abbildung 4.21: Stammzellen behalten bei Inhibition von PDK1 ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung.**

V6.4 mES Zellen wurden für 4 Tage in Anwesenheit von LIF und dem PDK1 Inhibitor GSK2334470 auf Feederzellen kultiviert, anschließend fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität mit Vector *FastRed* nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden gescannt (A) und unter dem Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv, Laser: 560 nm) fotografiert. Der Größenbalken entspricht 250 µm (B). Auf Gelatine kultivierte V6.4 mES Zellen wurden 24 h ohne LIF kultiviert. Nach einer Vorinkubation mit GSK2334470 von 1 h, wurden die Zellen mit 1000 U/ml LIF für weitere 15 min kultiviert und geerntet. Mittels Western Blot wurde die Herunterregulation der PDK1 abhängigen Phosphorylierung von S6 nachgewiesen (C). V6.4 mES Zellen wurden für 4 d mit GSK2334470 kultiviert und anschließend die Expression der pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog mittels Western Blot detektiert (D). Es wurden jeweils 20 µg Gesamtzelllysate aufgetragen und als Ladekontrolle diente β-Aktin.



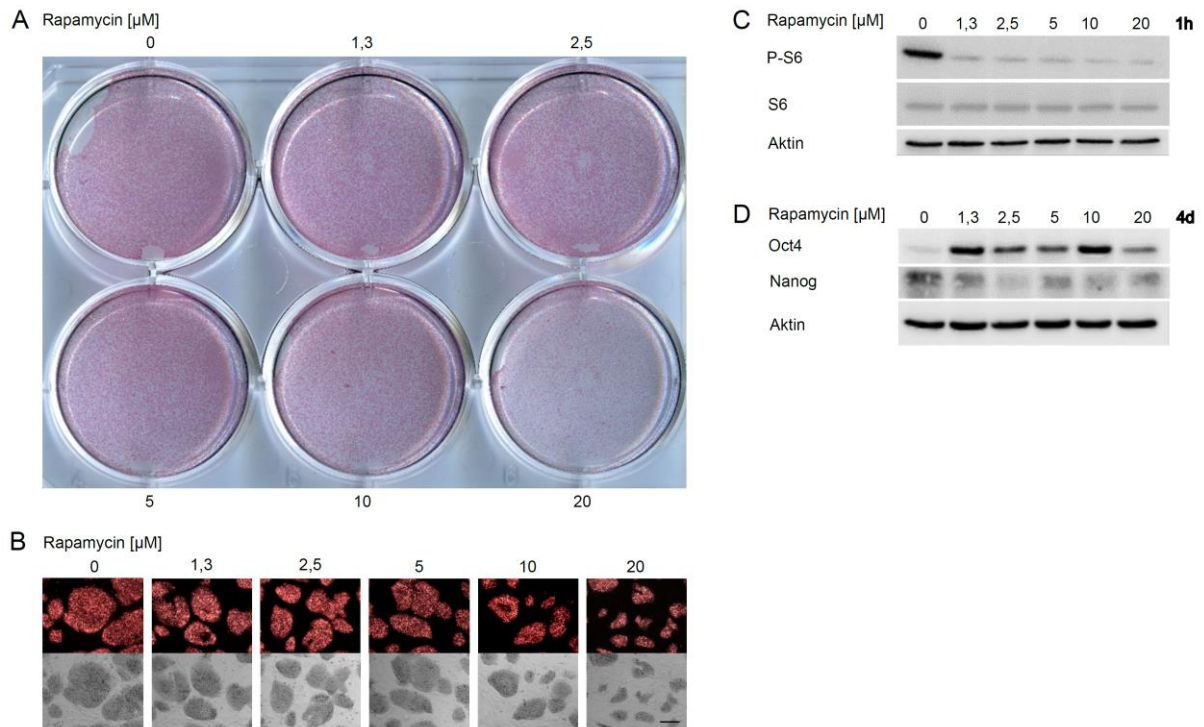
**Abbildung 4.22: Stammzellen behalten bei Herunterregulation von PDK1 ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung.**

Nach Transduktion mit shRNA Konstrukten für PDK1 und der anschließenden Selektion der shPDK1 exprimierenden Zellen mit Puromycin wurde mittels Western Blot die Herunterregulation von PDK1 und die damit einhergehende Herunterregulation der S6 Phosphorylierung, sowie auch die Expression des pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktors Nanog nachgewiesen. Es wurden jeweils 20 µg Gesamtzelllysate aufgetragen und als Ladekontrolle diente β-Aktin (A). Zusätzlich wurden für den Nachweis der Alkalischen Phosphatase Expression die mit Puromycin selektionierten V6.4 Zellen fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität mit Vector *FastRed* nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden gescannt (B) und unter dem Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv, Laser: 560 nm) fotografiert (C). Der Größenbalken entspricht 250 µm.

#### **4.4 Die Inhibition von mTOR führt zu einer geringeren Proliferation in wt und Akt defizienten Stammzellen**

Mit den vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass eine Inhibition bzw. Herunterregulation der unterhalb von PI3K liegenden Kinasen PDK1 und Akt keinen Einfluss auf die Pluripotenzerhaltung der untersuchten Stammzellen hat. Da die Gruppe von Imai 2012 gezeigt hatte, dass eine Inhibition von PI3K mit LY294002 zusätzlich auch mTOR hemmt (Imai, Yamagishi, Ono, & Ueda, 2012), sollte untersucht werden, ob der Verlust der Pluripotenz in den V6.4 mES Zellen unspezifisch über eine mTOR Inhibition induziert wird.

Daher wurden V6.4 Zellen unter Anwesenheit des mTOR Inhibitors Rapamycin (0 – 20  $\mu$ M) für 4 Tage auf Feederzellen kultiviert, anschließend die Zellen fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität bestimmt. Nach dieser Zeit wiesen die Zellen, die mit einer höheren Inhibitorkonzentration kultiviert worden waren, deutlich kleinere Kolonien auf. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde jedoch nicht beeinflusst (Abbildung 4.23 A, B). Mittels Western Blot wurde gezeigt, dass bei einer Kultivierung der mES Zellen auf Gelatine, anschließender LIF freien Kultivierung für 24 Stunden und einer Inkubation der Zellen für 1 Stunde mit Rapamycin, die Phosphorylierung von S6 nach einer 15-minütigen Stimulation mit LIF schon bei geringen Inhibitorkonzentrationen stark reduziert vorlag (Abbildung 4.23 C). Bei einer Kultivierung der Zellen für 4 Tage zusammen mit Rapamycin in unterschiedlichen Konzentrationen wurde ebenfalls mittels Western Blot die Proteinexpression der pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog nachgewiesen. Oct4 wurde in den mit dem Inhibitor kultivierten Zellen stärker als in Kontrollzellen exprimiert, Nanog nur geringfügig schwächer (Abbildung 4.23 D). Zusammen mit der gleichbleibenden Aktivität der Alkalischen Phosphatase und kleineren Kolonien, sieht es so aus als ob Rapamycin die Proliferation und nicht die Pluripotenz der Stammzellen beeinflusst.

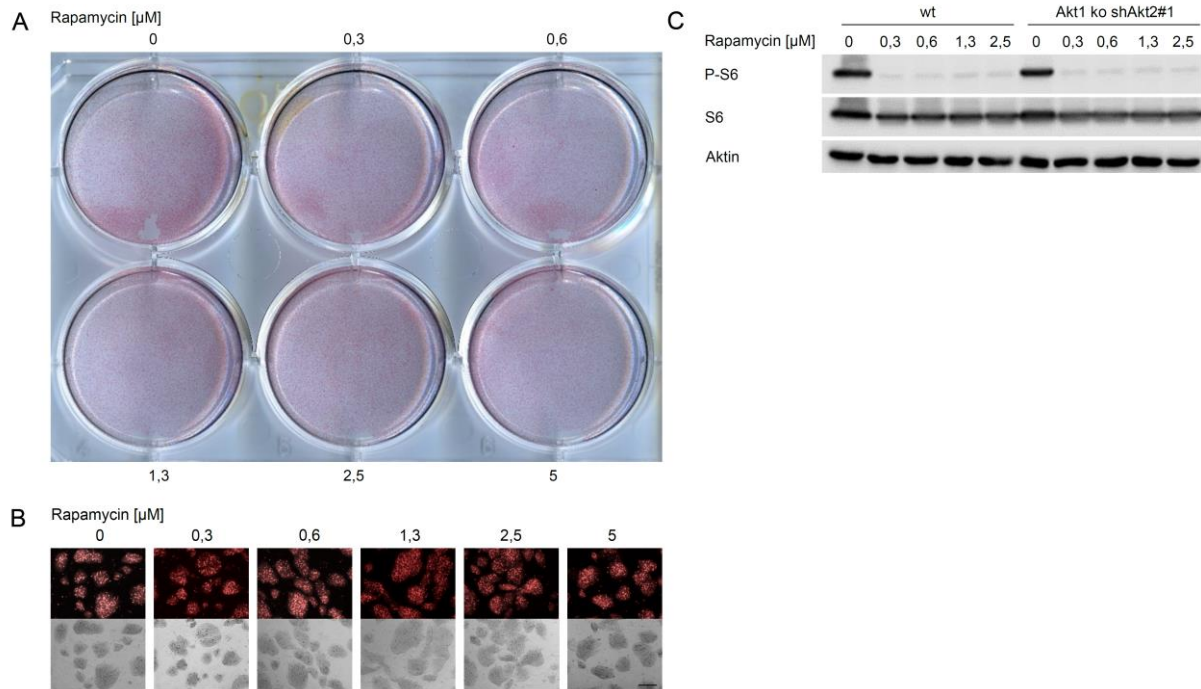


**Abbildung 4.23: Die Inhibition von mTOR reduziert die Proliferation von Stammzellen.**

V6.4 Zellen wurden für 4 Tage in Anwesenheit von LIF und dem mTOR Inhibitor Rapamycin auf Feederzellen kultiviert, anschließend fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität mit Vector *FastRed* nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden gescannt (A) und unter dem Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv, Laser: 560 nm) fotografiert. Der Größenbalken entspricht 250 µm (B). Auf Gelatine kultivierte V6.4 mES Zellen wurden für 24 h ohne LIF kultiviert. Nach einer Vorinkubation mit Rapamycin von 1h, wurden die Zellen mit 1000 U/ml LIF für 15 min stimuliert und geerntet. Mittels Western Blot wurde die Herunterregulation der PI3K abhängigen Phosphorylierung von S6 nachgewiesen (C). V6.4 mES Zellen wurden für 4 d auf Feederzellen mit Rapamycin kultiviert und anschließend die Expression der Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog mittels Western Blot detektiert (D). Es wurden jeweils 20 µg Gesamtzelllysate aufgetragen und als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

Um zu testen, ob die Akt defizienten Zellen stärker von Rapamycin beeinflusst werden als wt mES Zellen, wurden Akt1/Akt2<sup>-/-</sup> und wt Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Rapamycin für 4 Tage kultiviert und anschließend die Alkalische Phosphatase Aktivität der Zellen bestimmt. Die Akt1/Akt2 defizienten mES Zellen verhielten sich bezüglich der Aktivität der Alkalischen Phosphatase vergleichbar mit wt Zellen. Die Koloniengröße nahm bei Rapamycin kultivierten Akt1/Akt2<sup>-/-</sup> mES Zellen, wie bei wt Zellen ebenfalls ab. In Abbildung 4.24 A und B sind Akt1/Akt2 defiziente mES Zellen abgebildet (wt Zellen nicht gezeigt, sahen morphologisch gleich aus). Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass nach einer Kultivierung der Zellen ohne LIF für 24 Stunden und einer anschließenden Vorinkubation für 1 Stunde mit Rapamycin, die LIF induzierte Phosphorylierung von S6 nur noch sehr schwach war (Abbildung 4.24 C).





**Abbildung 4.24: Die Inhibition von mTOR reduziert ebenfalls die Proliferation in Akt1/Akt2<sup>-/-</sup> Stammzellen.**

V6.4 wt und Akt1<sup>-/-</sup> Zellen mit zusätzlichem knockdown von Akt2 mittels shRNA, wurden für 4 d in Anwesenheit von LIF und dem mTOR Inhibitor Rapamycin auf Feederzellen kultiviert, anschließend fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität mit Vector *FastRed* nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden gescannt (A) und unter dem Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv, Laser: 560 nm) fotografiert (B). Die Zellen wurden ebenfalls 24 h ohne LIF kultiviert. Nach einer anschließenden Vorinkubation mit Rapamycin von 1 h, wurden die Zellen mit 1000 U/ml LIF für weitere 15 min kultiviert und geerntet. Mittels Western Blot wurde die Herunterregulation der PI3K abhängigen Phosphorylierung von S6 nachgewiesen (C). Es wurden jeweils 20  $\mu\text{g}$  Gesamtzelllysate aufgetragen. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

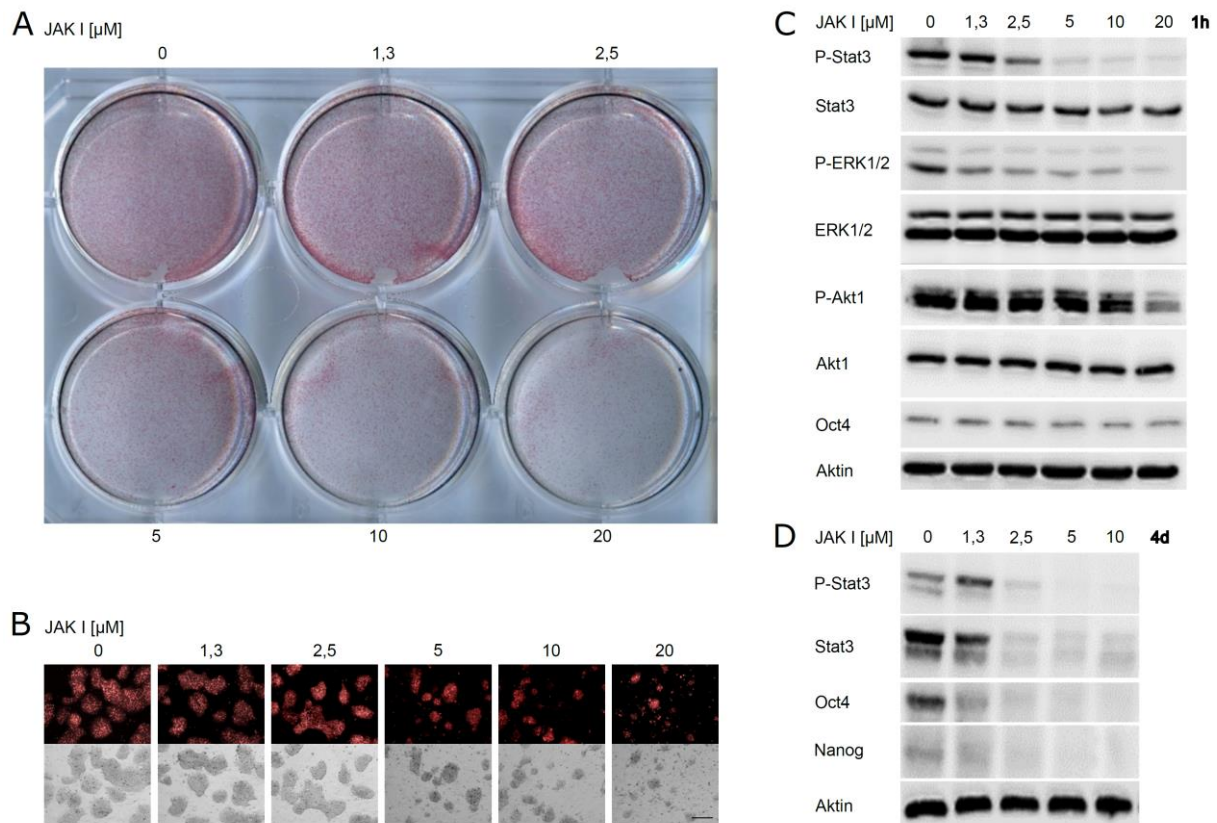
#### **4.5 Die Inhibition des JAK Signalweges führt zu einem geringeren Selbsterneuerungspotential in wt und Akt defizienten Stammzellen**

Aufgrund der unerwarteten Ergebnisse, dass weder die Herunterregulation von PDK1 noch von Akt1/Akt2 den pluripotenten Zustand der V6.4 Zellen beeinflussen, wurden die Stammzellen mit einem JAK Inhibitor (JAK I) kultiviert. Damit sollte geprüft werden, ob die Pluripotenzerhaltung der verwendeten Stammzellen, wie in der Literatur beschrieben abhängig vom JAK/STAT Signalweg ist (Niwa et al., 2009).

Dafür wurden V6.4 Zellen für 4 Tage mit JAK I (0 – 20  $\mu$ M) kultiviert, anschließend fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität bestimmt. Mit zunehmender JAK I Konzentration wurden die Zellkolonien deutlich kleiner und nur noch der innere Teil der Zellkolonien exprimierte aktive Alkalische Phosphatase. Die Größe der Kolonien und die Aktivität der Alkalischen Phosphatase nahm dabei schon bei einer Konzentration von 2,5  $\mu$ M JAK I leicht, bei höheren Konzentrationen stark ab (Abbildung 4.25 A, B). Mittels Western Blot wurde gezeigt, dass nach einer 24 stündigen Kultivierung der mES Zellen auf Gelatine ohne LIF mit einer anschließenden Vorinkubation von einer Stunde mit zunehmenden JAK I Konzentrationen, die LIF induzierte Phosphorylierung von Stat3 deutlich geringer war als bei Kontrollzellen. Die Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt1 wurde dabei nicht beeinträchtigt. Ebenso gab es bei einer Kultivierung der Zellen für 1 Stunde mit dem Inhibitor keine veränderte Expression der Kernpluripotenzfaktoren Oct4 und Nanog (Abbildung 4.25 C). In Übereinstimmung zu der verminderten Expression der Alkalischen Phosphatase bei einer Kultivierung der mES Zellen für 4 Tage mit dem JAK Inhibitor, wurde bei höheren JAK I Konzentrationen eine verminderte Expression der Kernpluripotenzfaktoren Oct4 und Nanog im Western Blot sowie auch eine geringere Expression und Phosphorylierung von Stat3 detektiert (Abbildung 4.25 D).

Somit konnte gezeigt werden, dass das Pluripotenzenverhalten der in dieser Arbeit verwendeten V6.4 mES Zellen abhängig vom JAK/STAT Signalweg ist.

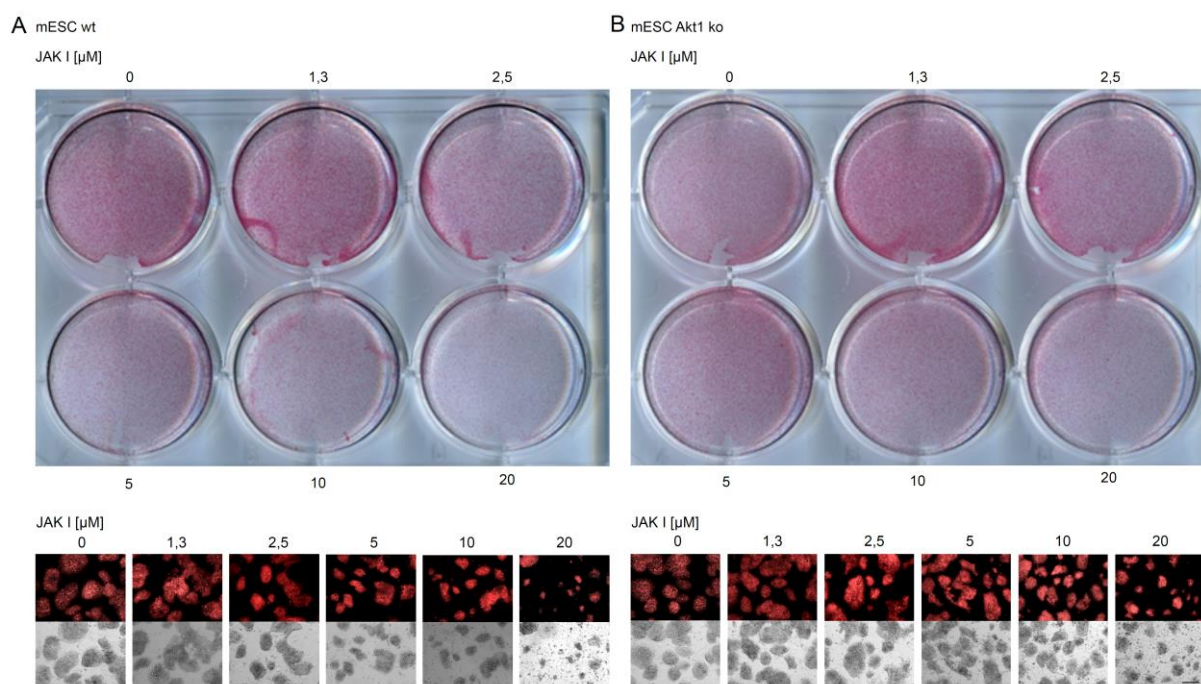
Des Weiteren wurden Akt1<sup>-/-</sup>, Akt2<sup>-/-</sup> und Akt1/Akt2<sup>-/-</sup> mES Zellen ebenfalls für 4 Tage mit dem JAK Inhibitor kultiviert, fixiert und anschließend die Alkalische Phosphatase Aktivität bestimmt. Die Größe der jeweiligen Akt defizienten mES Zellkolonien nahm wie bei wt mES Zellkolonien ebenfalls mit zunehmender Konzentration an JAK I ab, wobei beobachtet werden konnte, dass die Abnahme der Koloniegröße bei den Akt1 knockout mES Zellen geringer war als in wt Zellen (Abbildung 4.26 A, B). Ebenso wie die Akt1 defizienten Stammzellen, zeigten Akt1/Akt2<sup>-/-</sup> Zellen eine geringere Abnahme der Koloniegröße als wt und Akt2<sup>-/-</sup> mES Zellen (Abbildung 4.27 A, B)



**Abbildung 4.25: Die Inhibition von JAK reduziert konzentrationsabhängig die Fähigkeit der Pluripotenzhaltung in Stammzellen.**

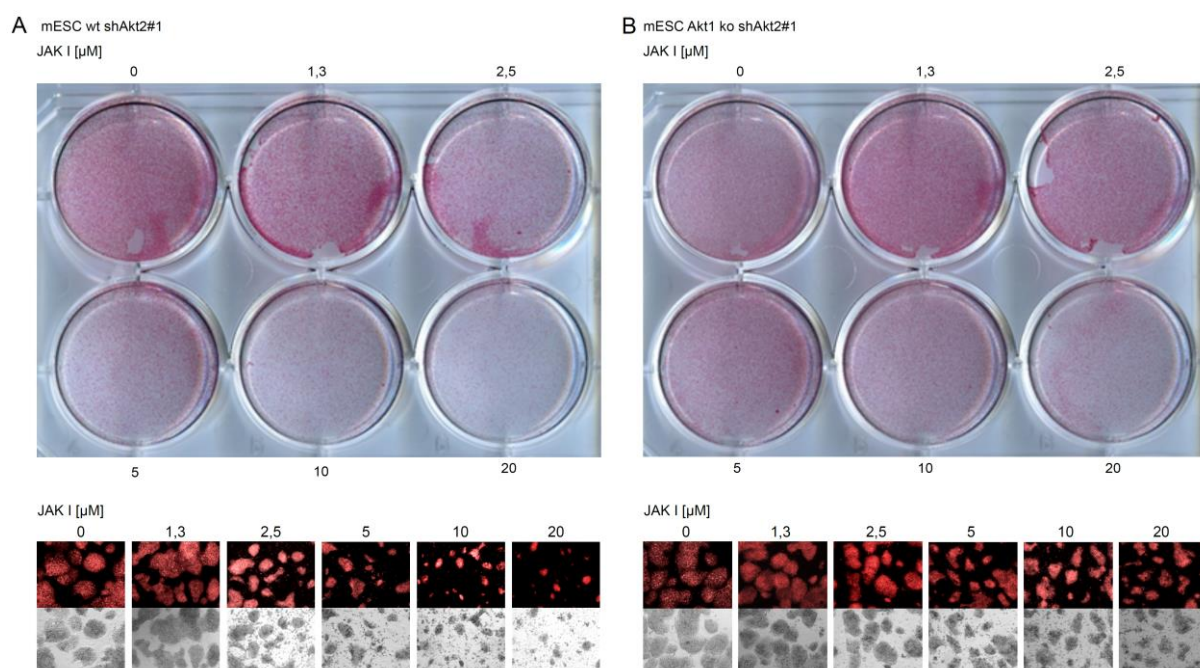
V6.4 Zellen wurden für 4 Tage in Anwesenheit von LIF und dem JAK Inhibitor JAK I auf Feederzellen kultiviert, anschließend fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität mit Vector *FastRed* nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden gescannt (A) und unter dem Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv, Laser: 560 nm) fotografiert (B). V6.4 mES Zellen wurden 24 h ohne LIF kultiviert. Nach einer Vorinkubation mit dem JAK I von 1 h, wurden die Zellen mit 1000 U/ml LIF für weitere 15 min kultiviert und geerntet. Mittels Western Blot wurde die Herunterregulation der JAK abhängigen Phosphorylierung von Stat3, sowie auch die Expression und die Aktivierung LIF abhängiger Proteine nachgewiesen (C). V6.4 mES Zellen wurden für 4 d mit JAK I kultiviert und anschließend die Expression der pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktoren Stat3, Oct4 und Nanog ebenfalls mittels Western Blot detektiert (D). Es wurden jeweils 20  $\mu\text{g}$  Gesamtzelllysate aufgetragen und als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.





**Abbildung 4.26: Die Inhibition von JAK reduziert konzentrationsabhängig die Fähigkeit der Pluripotenzhaltung in Akt1 knockout mES Zellen.**

V6.4 Zellen (A) und Akt1 defiziente Zellen (B) wurden für 4 d in Anwesenheit von LIF und dem JAK Inhibitor JAK I auf Feederzellen kultiviert, anschließend fixiert und die Alkalische Phosphatase Aktivität mit Vector *FastRed* nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden gescannt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv, Laser: 560 nm) fotografiert.

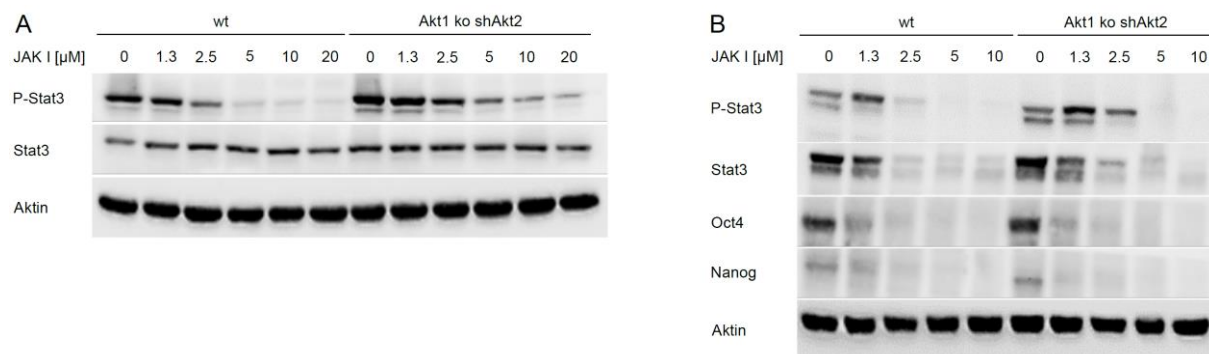


**Abbildung 4.27: Die Inhibition von JAK reduziert konzentrationsabhängig Fähigkeit der Pluripotenzhaltung in wt und Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen mit einem Akt2 knockdown.**

V6.4 wt (A) und V6.4 Akt1<sup>-/-</sup> (B) Zellen mit zusätzlichem knockdown von Akt2 mittels shRNA, wurden für 4 d in Anwesenheit von LIF und dem PI3K Inhibitor LY294002 auf Feederzellen kultiviert, anschließend fixiert und die

Alkalische Phosphatase Aktivität mit Vector *FastRed* nachgewiesen. Die gefärbten Zellen wurden gescannt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (10x Objektiv, Laser: 560 nm) fotografiert.

Da bei der Analyse der Alkalischen Phosphatase Aktivität und bei morphologischen Betrachtung der Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen zu sehen war, dass die Enzymaktivität und die Koloniegröße im Vergleich zu wt mES Zellen nicht so stark von JAK I beeinflusst wurde, wurden mittels Western Blot die JAK I vermittelte Herunterregulation der Stat3 Phosphorylierung in Akt1/Akt2 knockdown mES Zellen und wt Zellen getestet. Dafür wurden auf Gelatine kultivierte Zellen für 24 Stunden ohne LIF kultiviert, für 1 Stunde mit JAK I vorinkubiert und anschließend die LIF abhängige Phosphorylierung von Stat3 für 15 Minuten stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Stat3 in den Akt defizienten nicht so stark herunterreguliert war, wie in wt Zellen (Abbildung 4.28 A). Zusätzlich wurden die Akt1/Akt2 knockdown und wt mES Zellen für 4 Tage auf Feederzellen kultiviert und mit Western Blot die Stat3 Phosphorylierung und die Expression der pluripotenzassoziierten Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog detektiert. Die Phosphorylierung von Stat3 in den Akt defizienten Zellen nahm erst bei einer höheren Inhibitorkonzentration ab als bei wt Zellen. Die Expression von Oct4 und Nanog war in Akt1/Akt2 knockdown mES Zellen und wt Zellen vergleichbar (Abbildung 4.28 B).

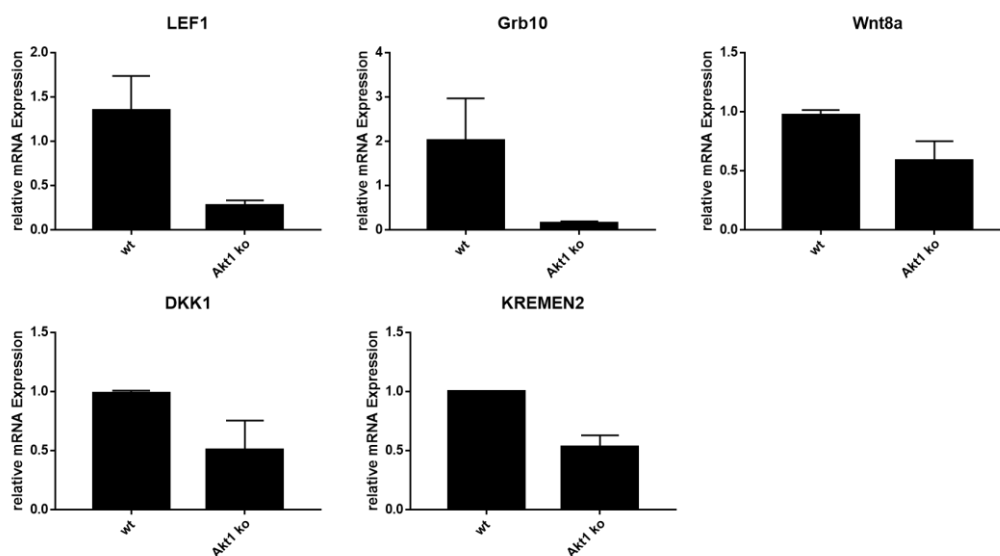


**Abbildung 4.28: Die Inhibition von JAK reduziert konzentrationsabhängig die LIF vermittelte Phosphorylierung von STAT3 und reduziert die Expression von Oct4 und Nanog in wt und in Akt1/Akt2<sup>-/-</sup> Stammzellen.**

Auf Gelatine kultivierte wt mES Zellen und Akt1<sup>-/-</sup> Zellen mit einem zusätzlichen Akt2 knockdown wurden 24 h ohne LIF kultiviert. Nach einer Vorinkubation mit JAK I von 1 h, wurden die Zellen mit 1000 U/ml LIF für weitere 15 min kultiviert und geerntet. Mittels Western Blot wurde die Herunterregulation der JAK abhängigen Phosphorylierung von Stat3 nachgewiesen (A). Dieselben Zellen wurden für 4 d mit JAK I auf Feederzellen kultiviert und anschließend die Phosphorylierung von Stat3 und die Expression der Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog ebenfalls mittels Western Blot detektiert (B). Es wurden jeweils 20 μg Gesamtzelllysate aufgetragen und als Ladekontrolle diente β-Aktin.

## 4.6 Der knockout von Akt1 in V6.4 mES Zellen führt zu einer Herunterregulation verschiedener Gene im WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg

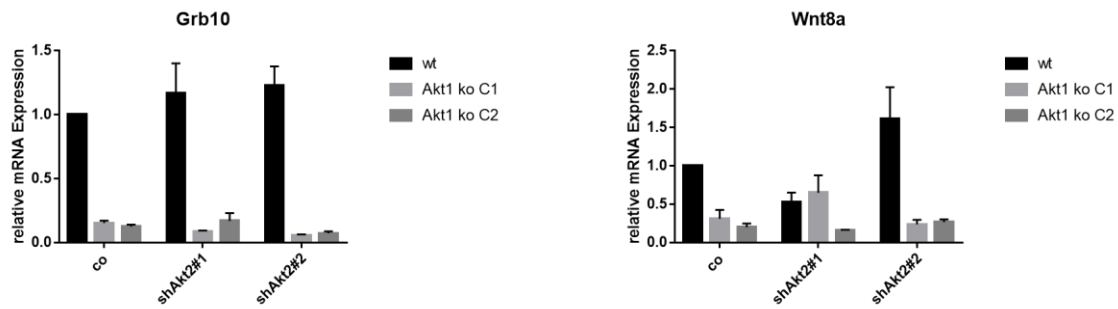
Obwohl weder die  $\beta$ -Catenin Expression noch die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  in den Stammzellen mit einer Akt1 bzw. Akt2 Defizienz per Western Blot gezeigt werden konnte, führt der knockout von Akt1 zu einer Herunterregulation von einigen Genen im WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg. Von auf Feederzellen kultivierten Akt1<sup>-/-</sup> und wt mES Zellen wurde mittels qRT-PCR gezeigt, dass die mRNA Expression von LEF1, Grb10, Wnt8a, DKK1 und KREMEN2 in Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen im Vergleich zu wt Zellen herunterreguliert wurde (Abbildung 4.29).



**Abbildung 4.29: Der knockout von Akt1 in V6.4 mES Zellen führt zu einer Herunterregulation verschiedener Gene im WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg.**

Relative mRNA Expression ausgewählter Targetgene im WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg in wt und Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen. Relativiert wurde auf die Expression von GAPDH und  $\beta$ -Aktin, normalisiert wurde auf die mRNA Expression in V6.4 Zellen.

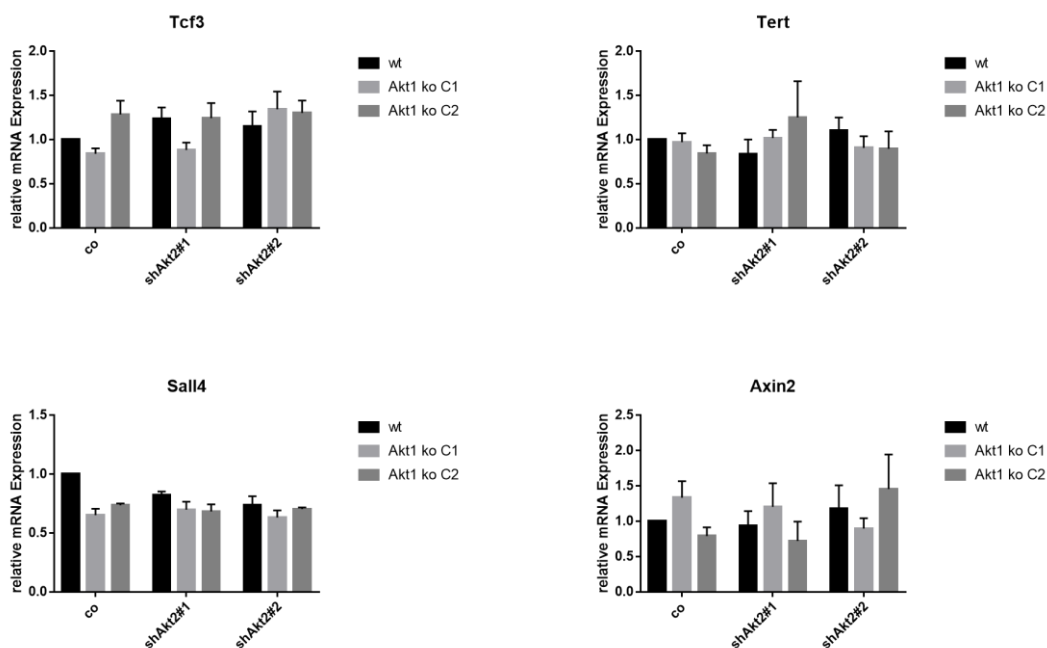
Um zu testen, ob die Expression der entsprechenden Gene auch in Stammzellen mit herunterreguliertem Akt2 verändert vorliegt, wurden wt und Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen mit einem zusätzlichen Akt2 knockdown ebenfalls auf Feederzellen kultiviert und die Expression einiger WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg per qRT-PCR bestimmt. Beispielfhaft an Grb10 und Wnt8a wurde festgestellt, dass im Vergleich zu wt mES Zellen die beide Gene bei einem Akt1 knockout herunterreguliert wurden, nicht aber bei Akt2<sup>-/-</sup> Zellen (Abbildung 4.30).



**Abbildung 4.30: Der knockout von Akt1, nicht aber der knockdown von Akt2 in mES Zellen führt zu einer Herunterregulation verschiedener Gene im WNT/β-Catenin Signalweg.**

Relative mRNA Expression ausgewählter Targetgene im WNT/β-Catenin Signalweg in wt und Akt1<sup>-/-</sup> Zellen mit zusätzlichem Akt2 knockdown. Relativiert wurde auf die Expression von GAPDH und β-Aktin, normalisiert wurde auf die mRNA Expression in V6.4 Zellen.

Viele Gene im WNT/β-Catenin Signalweg wurden aber bei einem knockout von Akt1 bzw. einem knockdown von Akt2 im Vergleich zu wt mES Zellen unverändert exprimiert. Dafür sind beispielhaft die Gene von Tcf3, Tert, Sall4 und Axin2 gezeigt (Abbildung 4.31).

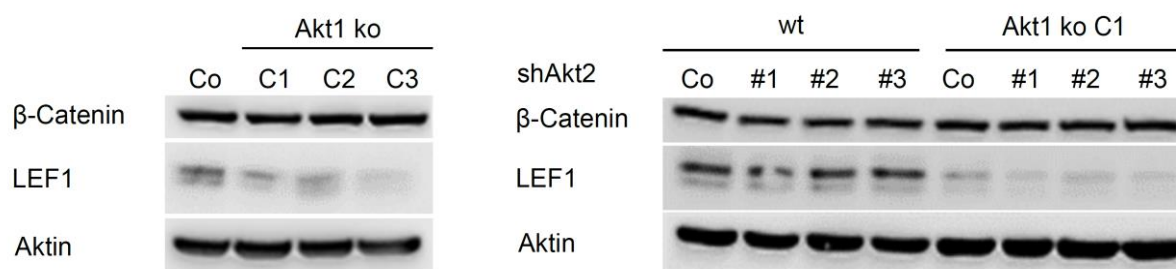


**Abbildung 4.31: Die Expression von Tcf3, Tert, Sall4 und Axin2 wird durch die Herunterregulation von Akt1 und Akt2 nicht beeinflusst.**

Relative mRNA Expression ausgewählter Targetgene im WNT/β-Catenin Signalweg in wt und Akt1<sup>-/-</sup> Zellen mit zusätzlichem Akt2 knockdown. Relativiert wurde auf die Expression von GAPDH und β-Aktin, normalisiert wurde auf die mRNA Expression in V6.4 Zellen.

Die Herunterregulation der Proteinexpression von LEF1 wurde zusätzlich mittels Western Blot getestet. Dafür wurden Akt1<sup>-/-</sup> und wt mES Zellen mit zusätzlichem Akt2 knockdown auf Feederzellen kultiviert und die Expression von LEF1 detektiert. Wie zuvor schon auf mRNA Ebene gezeigt wurde, wurde auch auf Proteinebene eine geringere LEF1 Expression bei Akt1 knockout Zellen nachgewiesen. Der knockdown von Akt2 zeigte keinen Effekt in Bezug auf die Proteinexpression von LEF1 (Abbildung 4.32).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass PI3K, aber weder PDK1 noch Akt für die Pluripotenzhaltung der V6.4 mES Zellen relevant ist.



**Abbildung 4.32: In Akt1 knockout mES Zellen ist die Expression von LEF1 herunterreguliert**

Akt1 ko mES Zellen mit wurden wie wt V6.4 Zellen auf Feederzellen kultiviert. Mittels Western Blot wurde die Expression von β-Catenin und LEF1 nachgewiesen (A). Außerdem wurde die Expression von β-Catenin und LEF1 in wt Akt1 ko mES Zellen mit zusätzlichem Akt2 knockdown detektiert (B). Es wurden 20 µg Gesamtzelllysat aufgetragen und als Ladekontrolle diente β-Aktin.

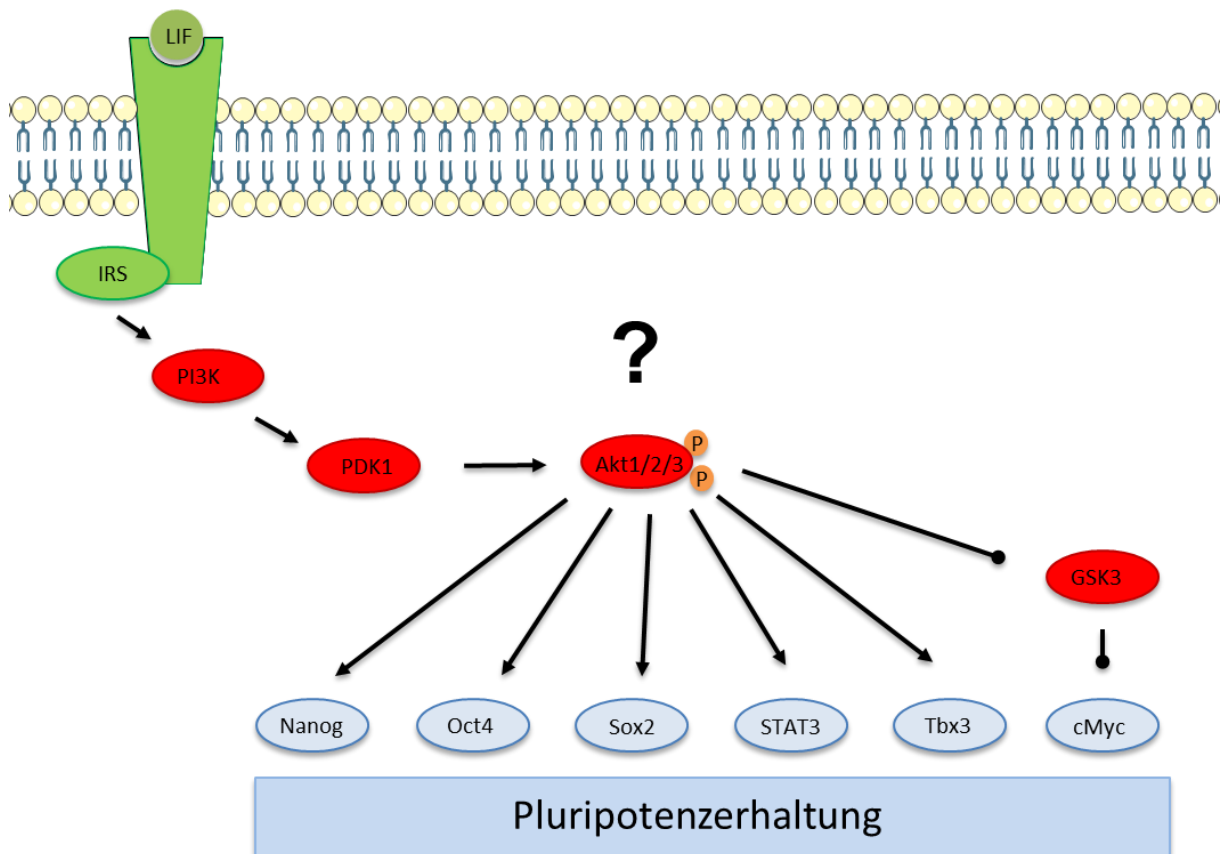
## 5 Diskussion

Stammzellen haben das Potential *in vitro* unbegrenzt zu proliferieren, ohne dabei ihr Selbsterneuerungspotential zu verlieren. Zudem besitzen sie die Fähigkeit, in alle Zelltypen differenzieren zu können. Aufgrund dieser Merkmale könnten Stammzellen somit in Zukunft einen großen Beitrag zur Regenerativen Medizin leisten. Das Differenzierungspotential der Zellen ist die Grundlage für den Ersatz von zerstörtem oder abgestorbenem Gewebe, beispielsweise bedingt durch degenerativen Erkrankungen. Hinsichtlich der rechtlichen Einschränkungen und ethisch bedenklichen Verwendung von humanen Stammzellen und des noch nicht ausgereiften Verständnisses der induzierten pluripotenten Stammzellen, bietet sich für die Forschung das murine Modellsystem für die Erforschung grundlegender Stammzeleigenschaften an.

Charakteristisch für mES Zellen, die *in vitro* kultiviert werden, ist die kugelförmige Koloniebildung der Zellen und eine deutliche definierte äußere Umrandung der Kolonien. Unter dem Mikroskop sind die Zellmembranen der Einzelzellen kaum erkennbar. Außerdem können sie über EBs (*embryoid bodies*) durch Zugabe von bestimmten Wachstumsfaktoren in Zellen der drei Keimblätter differenzieren. Ein weiteres Merkmal von Stammzellen ist die Expression der Alkalischen Phosphatase, die bei einer Differenzierung der Zellen herunterreguliert wird (Stefkova, Prochazkova, & Pachernik, 2015). Für die Kultivierung von mES Zellen ist ein aktiver LIF Signalweg von Bedeutung, da er die Expression der Kernpluripotenzfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog reguliert. Der LIF Signalweg führt neben der Aktivierung des MAPK Signalwegs, der die Pluripotenzerhaltung in Stammzellen negativ reguliert, zur Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs und des PI3K/Akt Signalwegs. Die Aktivierung von Akt führt unter anderem zur Inhibition von GSK3 $\beta$  und außerdem zu einer Hochregulation des pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktors Tbx3, welcher wiederum die Expression von Nanog hochreguliert (Niwa et al., 2009). Außerdem stabilisiert aktives Akt STAT3 über eine CREB vermittelte Acetylierung (Niwa et al., 1998). Zudem werden die Transkriptionsfaktoren Oct4 und Sox2 durch die Akt vermittelte Phosphorylierung zum einen stabilisiert und deren transkriptionelle Aktivität erhöht (Brumbaugh et al., 2012; Jeong et al., 2010; Y. Lin et al., 2012) (Abbildung 5.1). Bei einer Inaktivierung des PI3K/Akt Signalwegs durch eine Inhibition von PI3K mit dem Inhibitor LY294002 führt dies nach drei bis vier Tagen zu einem Verlust der Pluripotenz in Stammzellen (Storm et al., 2007; Storm et al., 2009). Wird hingegen hyperaktives PDK1 bzw. Akt exprimiert, behalten die Zellen ihr Selbsterneuerungspotential auch ohne Zusatz von LIF bei (Ling et al., 2013; S. Watanabe et al., 2006). Des Weiteren können Stammzellen bei einer Kultivierung mit einem GSK3 $\beta$  Inhibitor ohne zusätzliches LIF



ihren pluripotenten Charakter beibehalten. Durch die Inaktivierung von GSK3 $\beta$  wird zum einen cMyc nicht mehr abgebaut und kann transkriptionell aktiv sein und zum anderen wird die Expression von Nanog hochreguliert (Niwa et al., 2009). Bei der Kultivierung von Stammzellen mit einem Akt Inhibitor, der alle Akt Isoformen betrifft, hatte die Gruppe von Ling festgestellt, dass trotz der Expression hyperaktiver PDK1, die Akt Inhibition zu einem Verlust der Pluripotenz führt (Ling et al., 2013).



**Abbildung 5.1: Die Aktivierung des PI3K Signalwegs durch LIF führt zu einer Hochregulation pluripotenzrelevanter Transkriptionsfaktoren.**

LIF bindet an den LIF Rezeptor, woraufhin PI3K aktiviert wird. Dies führt wiederum zur Aktivierung von Akt und der Akt vermittelten Inaktivierung von GSK3 $\beta$ . Nachfolgend werden pluripotenzrelevante Transkriptionsfaktoren wie Tbx3 und Nanog verstärkt exprimiert bzw. stabilisiert (STAT3, Oct4, Sox2 und cMyc). Kinasen sind rot, Transkriptionsfaktoren blau dargestellt. Die schematische Darstellung wurde mit Hilfe von *Servier Medical Art* erstellt.

Bisher war noch nicht bekannt, welche der Akt Isoformen bedeutend für die Pluripotenzhaltung in Stammzellen ist. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden, über welche der drei Akt Isoformen die Inhibition von PI3K zu einem Verlust der Pluripotenz führt.

## 5.1 Die Inhibition von PI3K beeinflusst die Pluripotenz von Stammzellen

In dieser Arbeit sollte zuerst untersucht werden, ob die Pluripotenzhaltung der verwendeten mES Zellen V6.4 wie in der Literatur für andere mES Zellen beschrieben, abhängig von der PI3K Aktivierung ist. Übereinstimmend mit der Arbeit von Storm (Storm et al., 2009), nahm die Pluripotenz der mit dem PI3K Inhibitor LY294002 kultivierten Stammzellen konzentrationsabhängig ab. Der negative Einfluss des Inhibitors auf die Pluripotenz wurde über die abnehmende Größe der Stammzellkolonien sowie die verringerte Expression der Alkalischen Phosphatase und der pluripotenzassoziierten Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog gezeigt. Die Western Blot Analyse zeigte eine deutlich verminderte Phosphorylierung von Akt1, GSK3 und S6, welche unterhalb von PI3K im Signalweg liegen. Die Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2, die wichtige Mediatoren der anderen beiden LIF induzierten Signalwege sind, wurde hingegen nicht durch die Kultivierung mit LY294002 beeinflusst (Abbildung 4.1).

Da durch den PI3K Inhibitor auch andere Kinasen wie mTOR, DNA-PK, CK2 und Pim-1 inhibiert werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dadurch oder durch die Inhibition unbekannter Kinasen der Inhibitor nicht direkt über PI3K zu einem Verlust der Pluripotenz in mES Zellen führt. Beispielsweise wurde LY294002 bereits direkt mit der Inhibition des Kalziumsignalwegs und Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B in Verbindung gebracht (Gharbi et al., 2007).

Um unspezifische Effekte von LY294002 in Bezug auf das Pluripotenzpotential in den Stammzellen auszuschließen, sollten die Ergebnisse mit einem weiteren PI3K Inhibitor, PF-4989216, validiert werden. Wie bei den mES Zellen, die mit LY294002 kultiviert wurden, nahm die Expression von Oct4 und Nanog schon bei geringen Konzentrationen von PF-4989216 und die Größe der Stammzellkolonien und die Expression der Alkalischen Phosphatase mit zunehmender Inhibitorkonzentration stark ab. Die beobachteten negativen Effekte von PF-4989216 auf die Pluripotenz von Stammzellen sind somit mit denen von LY294002 vergleichbar. Es scheint daher unwahrscheinlich, dass der Pluripotenzverlust von Stammzellen bei einer Kultivierung mit LY294002 auf einen unspezifischen Effekt des Inhibitors zurück zu führen ist.

Zusammenfassend mit der Literatur, lassen diese Daten darauf schließen, dass PI3K ein Hauptregulator der Pluripotenz in mES Zellen ist.



## 5.2 Stammzellen behalten bei Inhibition von Akt ihren pluripotenten Zustand bei

Bisherige Studien deuten darauf hin, dass PI3K das Pluripotenzpotential von Stammzellen durch die Aktivierung von Akt reguliert. Die Beobachtungen der Gruppe von Watanabe suggerieren, dass bei einer Expression von hyperaktivem Akt die Pluripotenz in Stammzellen bei einer Kultivierung ohne LIF erhalten bleiben kann (S. Watanabe et al., 2006). Weitere Studien von Ling *et al.* zeigten, dass die Inhibition von Akt auch bei einer Expression von hyperaktiver PDK1 zu einem Verlust der Pluripotenz im Stammzellen führt (Ling et al., 2013). Bisher gibt es keine Daten über die Expression der verschiedenen Akt Isoformen in mES Zellen. Um zu untersuchen, welche der Akt Isoformen bei einer Inhibition verantwortlich für den Verlust der Pluripotenz der Stammzellen ist, sollten zunächst mES Zellen mit einem knockout einer Isoform generiert werden. Aufgrund der Überlegung, dass Ling *et al.* mit einem Akt1 Expressionskonstrukt gearbeitet hatten (in der Veröffentlichung von Watanabe wird nicht erläutert, welche Isoform von Akt überexprimiert wurde), Akt1 ubiquitär exprimiert wird und zudem in den V6.4 mES Zellen die am stärksten exprimierte Isoform ist, wurden zuerst Akt1 knockout mES Zellen hergestellt.

### 5.2.1 Akt1 defiziente Stammzellen erneuern sich selbst und zeigen dasselbe Proliferationsverhalten wie wt Zellen

Für die Herstellung von Akt1 knockout mES Zellen wurde die TALEN Technologie verwendet. Der Vorteil dieser Technologie beispielsweise gegenüber CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) ist die hohe Spezifität der Konstrukte, da zweimal 20 Basenpaare der DNA spezifisch erkannt werden müssen, damit die Konstrukte binden und die Fok I Nuklease aktiv werden kann. Nachteile sind, dass 3 Plasmide gleichzeitig in die Zellen eingebracht werden müssen und die verwendeten Stammzellen relativ schlecht zu transfizieren sind. Außerdem ist die Generierung der knockout Zellen langwierig, da die Einzelklone nach dem Sortieren der positiven Zellen für weitere Analysen zuerst vermehrt werden müssen. Die TALEN Konstrukte wurden zuerst in HEK 293T Zellen auf ihre Funktion getestet. Die Transfektionseffizienz war hoch und beinahe alle der GFP positiven Zellen waren auch RFP positiv, was zeigte, dass ein hoher Anteil der Zellen alle drei Konstrukte aufgenommen hatte und die Dimerisierung und Aktivierung der Fok I erfolgte (Daten nicht gezeigt). Um die Transfektionseffizienz in den mES Zellen zu verbessern, wurden die Plasmide mittels Nukleofektion in die Zellen eingebracht. Bei der Sortierung mES Zellen mittels FACS waren unter 1% der Zellen GFP positiv (Abbildung 4.3). Es wurden GFP und nicht RFP positive Zellen sortiert, da es für RFP keinen entsprechenden Laser gab. Das Problem, dass GFP positive Zellen nicht unbedingt alle drei Plasmide aufgenommen haben und so ein

knockout vorliegen kann, wurde durch die Validierung des Akt1 knockout durch den Nachweis des Verlusts von Akt1 in den Lysaten der vermehrten Klone im Western Blot umgangen. Es konnten mehrere mES Zellklone, die kein Akt1 mehr exprimieren detektiert werden (Abbildung 4.4). Um auszuschließen, dass sich die Akt1 defizienten Klone bezüglich der Pluripotenzerhaltung unterschiedlich verhalten oder die Einbringung der TALEN Konstrukte zu unspezifischen *off-target* Effekten führt, wurden für nachfolgende Analysen immer drei der Klone verwendet. Mittels Western Blot wurde gezeigt, dass der Verlust von Akt1 nicht zu einer verstärkten Expression oder zu einer erhöhten Phosphorylierung von Akt2 führt. Es sieht demnach so aus, als ob der Verlust von Akt1 in den mES Zellen nicht durch eine veränderte Aktivierung von Akt2 kompensiert wird.

Die Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen zeigten im Vergleich zu wt Zellen weder eine veränderte mRNA Expression von Oct4, Sox2 und Nanog noch Änderungen der Proteinexpression dieser Transkriptionsfaktoren. Des Weiteren war in Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen im Vergleich zu wt Zellen keine Änderungen bezüglich ihrer Morphologie und der Aktivität der Alkalischer Phosphatase detektierbar (Abbildung 4.4). Der Verlust von Akt1 scheint demnach die Pluripotenz der Stammzellen nicht zu beeinflussen. Zusätzlich zu diesem unerwarteten Ergebnis bezüglich der Pluripotenzerhaltung konnte außerdem gezeigt werden, dass der knockout von Akt1 auch keinen Einfluss auf die Proliferation der Stammzellen in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von LIF hat (Abbildung 4.5 und 4.6). Die Akt defizienten mES Zellen wiesen zudem dieselbe Aktivität der Alkalischen Phosphatase, sowie auch mRNA Expression der pluripotenzassoziierten Transkriptionsfaktoren Sox2 und Nanog wie wt Zellen auf (Abbildung 4.7). Die LIF abhängige Pluripotenz wird daher nicht durch den Verlust von Akt1 beeinflusst.

Ein weiteres Merkmal von pluripotenten Zellen ist die Fähigkeit, in Zellen der drei Keimblätter (mesodermal, endodermal und ektodermal) differenzieren zu können. Daher wurde untersucht, ob der Verlust von Akt1 einen Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit in den mES Zellen hat. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und mRNA Expressionsanalyse wurde nachgewiesen, dass Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen wie wt Zellen erfolgreich über EBs erfolgreich in Zellen der drei Keimblätter differenziert werden konnten (Abbildung 4.9).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Verlust von Akt1 weder einen Einfluss auf die Pluripotenzerhaltung, die Proliferation und die Differenzierungsfähigkeit der in dieser Arbeit verwendeten Stammzellen hat.

### **5.3 Der Verlust von Akt1 in mES Zellen beeinflusst weder den JAK/STAT noch den MAPK Signalweg**

Um zu untersuchen, ob der Akt1 knockout einen Einfluss auf den ebenfalls durch LIF aktivierten JAK/STAT bzw. MAPK Signalweg hat, wurde in Akt1<sup>-/-</sup> und wt mES Zellen die Aktivierung dieser beiden Signalwege untersucht. Weder unter Standardbedingungen noch bei einer kurzzeitigen Induktion der Signalwege durch LIF wurden Unterschiede bezüglich der relativen Mengen an phosphoryliertem STAT3 bzw. ERK1/2 in Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen im Vergleich zu wt Zellen im Western Blot detektiert (Abbildung 4.10 und 4.11).

Der Verlust von Akt1 hat somit keine Auswirkung auf die LIF induzierte Aktivierung der beiden anderen bedeutenden pluripotenzrelevanten Signalwege in den Stammzellen. Dies stimmt mit der Beobachtung der Gruppe von Watanabe (S. Watanabe et al., 2006) überein, die festgestellt hatte, dass eine Überexpression von aktivem Akt in Stammzellen die Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 und somit den JAK/STAT und MAPK Signalweg nicht beeinflusst.

Ein weiterer pluripotenzrelevanter Signalweg, der WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg wurde durch den Verlust von Akt1 ebenfalls nicht beeinflusst. Die Phosphorylierung von GSK3 $\alpha/\beta$  (Ser9/Ser21) und die  $\beta$ -Catenin Expression war in den Akt1 defizienten mES Zellen gegenüber wt Zellen nicht verändert (Abbildung 4.10 B). Die Akt1 Defizienz hat somit keine Auswirkungen auf die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin. Diese Beobachtung wird durch die Arbeit von Nicholas Paling bestätigt, in der ebenfalls festgestellt wurde, dass eine Kultivierung von mES Zellen mit LY294002 keine Auswirkung auf die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin hat (Paling, Wheadon, Bone, & Welham, 2004). In der Studie von Ling *et al.* wird ebenfalls gezeigt, dass eine Änderung des PI3K Signalwegs in mES Zellen durch eine Expression von hyperaktiver PDK1 bzw. Akt zu keiner veränderten  $\beta$ -Catenin Stabilisierung führt (Ling et al., 2013).

### **5.4 Stammzellen behalten ihre Fähigkeit der Pluripotenzerhaltung bei einem gleichzeitigen Verlust von Akt1 und Akt2 bei**

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse, die zeigen, dass eine Inhibition von PI3K eindeutig die Pluripotenz in den in dieser Arbeit verwendeten Mausstammzellen beeinflusst, ist es erstaunlich, dass ein Verlust von Akt1 keine Auswirkungen auf die Erhaltung der Pluripotenz der Stammzellen zeigt. Obwohl bei den Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen die Akt2 Expression und die Aktivierung der Kinase im Vergleich zu wt Zellen unverändert waren, kann so noch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Isoform das Fehlen von Akt1 kompensiert. Deshalb wurde in wt und Akt1 defizienten mES Zellen mittels shRNA die Akt2 Expression

herunterreguliert. Die Herunterregulation führte zu einer um mindestens 75 % reduzierten mRNA Expression von Akt2 und im Western Blot konnte in den mit shRNA behandelten Zellen kein Akt2 mehr detektiert werden. Um eine Kompensation der Akt2 bzw. Akt1/Akt2 Defizienz durch Akt3 auszuschließen, wurde im Western Blot gezeigt, dass die Akt Isoform 3 in allen aufgetragenen Zelllysaten nicht detektierbar exprimiert wurde (Abbildung 4.12).

Der Verlust von Akt2 bzw. von Akt1/Akt2 in V6.4 mES Zellen beeinflusste weder die mRNA Expression der Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog noch die Proteinexpression bzw. die Stabilität dieser Proteine. Des Weiteren wiesen die Zellen, die kein Akt2 bzw. kein Akt1 und Akt2 exprimierten, dieselbe Morphologie und Alkalische Phosphatase Aktivität wie wt Zellen auf (Abbildung 4.13). Zusätzlich konnte auch keine negative Auswirkung des knockout von Akt2 bzw. des gleichzeitigen knockout beider Akt Isoformen bezüglich der Proliferation unter verschiedenen Bedingungen festgestellt werden. Wie schon zuvor beobachtet, teilten sich die mES Zellen mit einem Akt1 knockout tendenziell stärker als wt Zellen (Abbildung 4.14).

Um zu testen, ob die Stammzellen, die kein Akt2 bzw. gleichzeitig kein Akt1 und Akt2 exprimieren, sich bei einer Kultivierung auf Gelatine unter LIF freien Bedingungen bezüglich der Pluripotenz anders verhalten als wt Zellen, wurden diese auf ihre Alkalische Phosphatase Aktivität untersucht. Die Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen mit zusätzlich herunterreguliertem Akt2 zeigten denselben Mangel an Enzymaktivität und Veränderungen der Morphologie in Richtung differenzierte Zellen wie die entsprechende Kontrollen (Abbildung 4.15).

Des Weiteren wurden die Akt2 bzw. Akt1/Akt2 defizienten mES Zellen in Bezug auf ihre Differenzierungsfähigkeit in Zellen der drei Keimblätter analysiert. Wie zuvor schon die Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen konnten Zellen mit einer zusätzlichen Herunterregulation von Akt2 erfolgreich differenziert werden, was ein weiterer Hinweis auf den uneingeschränkten pluripotenten Zustand der Zellen darstellt (Abbildung 4.16 und 4.17).

Wie bei den Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen sollte in den Akt1/Akt2 defizienten Zellen analysiert werden, ob der Verlust der beiden Akt Isoformen zu einer veränderten Aktivierung der beiden anderen LIF induzierten Signalwege führt. Die Herunterregulation von Akt2 in wt sowie auch in Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen beeinflusste weder die Aktivierung des JAK/STAT noch des MAPK Signalwegs. Dies wurde durch eine mit wt mES Zellen vergleichbare Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung 4.18A und 4.19).

Außerdem konnten in den mES Zellen, die kein Akt2 bzw. kein Akt1 und Akt2 exprimieren, keine Unterschiede bei der Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  und bei der Expression von  $\beta$ -Catenin im Vergleich zu wt Zellen festgestellt werden (Abbildung 4.18 B). Die Aktivität des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs wurde durch den zusätzlichen Verlust von Akt2 in wt und Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen daher ebenfalls nicht verändert.

Aufgrund der unerwarteten Ergebnisse, dass weder Akt1 noch Akt2 die Pluripotenz in den V6.4 mES Zellen beeinflusst, sollte ausgeschlossen werden, dass das Fehlen beider Isoformen eventuell doch durch Akt3 kompensiert werden kann. Daher wurden die mES Zellen mit dem Akt Inhibitor MK-2206, der alle drei Akt Isoformen hemmt, kultiviert. Die Größe der Stammzellkolonien nahm mit zunehmender InhibitorKonzentration stark ab. Die Kolonien exprimierten jedoch auch bei zunehmender Konzentration von MK-2206 aktive Alkalische Phosphatase und wiesen auch im Western Blot eine mit Kontrollzellen vergleichbare Expression von Oct4 und Nanog auf (Abbildung 4.20). Dies deutet darauf hin, dass eine höhere Konzentration des Inhibitors eher die Proliferation oder Apoptose der Zellen als deren pluripotentes Potential beeinflusst. Abweichend zu dieser Überlegung hierzu hatte die Gruppe von Ling gezeigt, dass eine Inhibition von Akt zu einem Rückgang der Pluripotenz in Stammzellen führt (Ling et al., 2013).

Unerwarteter Weise konnte also gezeigt werden, dass obwohl eine Inhibition von PI3K einen eindeutigen Effekt auf die Pluripotenzhaltung der mES Zellen hat, aber weder eine Herunterregulation der beiden Akt Isoformen 1 und 2 noch die Inhibition von Akt mit MK-2206 die Pluripotenz der V6.4 mES Zellen beeinflusst.

## **5.5 Stammzellen behalten ihren pluripotenten Zustand bei der Herunterregulation von PDK1 bei**

In der Literatur wird ein positiver Effekt der Expression von hyperaktiver PDK1 auf den Pluripotenzhalt von Stammzellen bei einer Kultivierung der Zellen ohne LIF beschrieben (Ling et al., 2013). Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen zeigte die Gruppe von Williams jedoch, dass die Herunterregulation von PDK1 keinen Einfluss auf die Proliferation von Stammzellen hat (Williams et al., 2000). Um zu testen, ob die Reduktion des Selbsterneuerungspotentials der in dieser Arbeit verwendeten Stammzellen V6.4 durch LY294002 über PDK1 vermittelt wird, wurden die Zellen für vier Tage auf Feederzellen in Anwesenheit von LIF zusammen mit dem PDK1 Inhibitor GSK2334470 kultiviert. Weder die Größe und Morphologie der Zellkolonien noch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase durch die Inhibition von PDK1 im Vergleich zu Kontrollzellen war jedoch verringert. Zudem wurde mittels Western Blot eine gleichbleibende Expression von Oct4 und Nanog nachgewiesen (Abbildung 4.21). Diese Ergebnisse bestätigen daher die Beobachtungen von Williams *et al.*, dass aktive PDK1 nicht für den Erhalt der Pluripotenz in mES Zellen benötigt wird (Jung, Kim, & Williams, 2013). Um unspezifische Effekte des PDK1 Inhibitors auszuschließen, wurde PDK1 in den V6.4 mES Zellen mit shRNA Konstrukten herunterreguliert. Die Herunterregulation von PDK1 war sehr effizient, da das Protein im Western Blot nicht mehr

detektiert werden konnte. Außerdem wurde das im Signalweg weiter unterhalb liegende Protein S6 ebenfalls nicht mehr detektierbar phosphoryliert. Wie zuvor bei der Kultivierung mit dem Inhibitor GSK2334470 war die Größe der Stammzellkolonien, die Aktivität der Alkalischen Phosphatase und die Expression von Nanog gegenüber Kontrollzellen nicht verändert (Abbildung 4.22). Dies bestätigt sowohl die Ergebnisse der Kultivierung der Stammzellen mit dem Inhibitor GSK2334470 als auch die Beobachtungen der Gruppe von Williams, dass die Inhibition von PDK1 die Pluripotenzerhaltung in Stammzellen nicht beeinflusst.

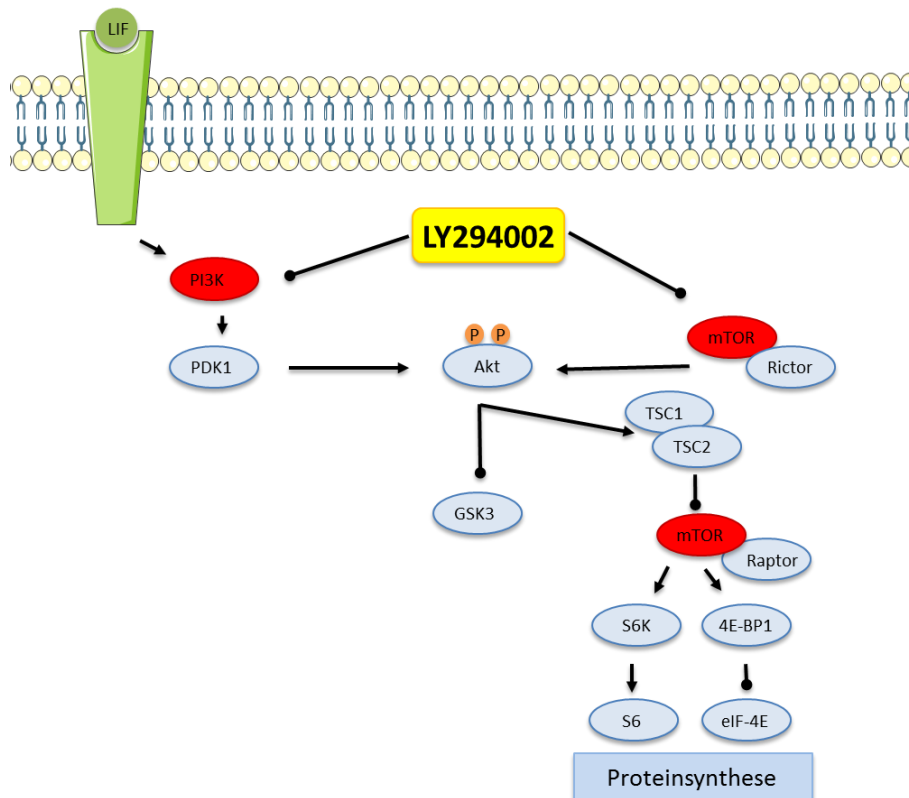
## **5.6 Die Inhibition von mTOR beeinflusst die Proliferation von V6.4 mES Zellen**

mTOR gehört zur Klasse IV der PI3K Superfamilie (Liu, Cheng, Roberts, & Zhao, 2009). Daher erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass der Komplex ebenfalls durch den PI3K Inhibitor LY294002 gehemmt wird (Abbildung 5.2), was von der Gruppe von Brunn 1996 auch nachgewiesen wurde (Brunn et al., 1996). mTORC1 reguliert die für das Zellwachstum notwendige Proteinsynthese hauptsächlich durch Phosphorylierung von 4E-BP1 und S6K. Phosphoryliertes 4E-BP1 bindet an eIF4E (*eucaryotic initiation factor 4E*), welches dadurch die Translation fördert. Die Phosphorylierung von S6K aktiviert die Kinase, die wiederum die Aktivität vieler Proteine im Signalweg aktiviert, was die Ribosomenbiogenese und Transkription ribosomaler RNA antreibt (Laplante und Sabatini 2009).

Eine Hemmung von mTOR führt indirekt wiederum auch zu einer Hemmung von Akt, da dieses an Ser473 hauptsächlich durch mTOR zur vollständigen Aktivierung der Kinaseaktivität phosphoryliert wird (McDonald et al., 2008).

Um also auszuschließen, dass der negative Effekt der PI3K Inhibitoren auf die Pluripotenzerhaltung von Stammzellen auf eine parallele Suppression von mTOR zurück zu führen ist, wurden mES Zellen mit dem mTOR Inhibitor Rapamycin kultiviert. Schon bei einer kurzzeitigen Exposition der Zellen mit geringen Rapamycin Konzentrationen war die LIF induzierte Phosphorylierung des mTOR Targetproteins S6 stark reduziert. Die langfristige Kultivierung der Stammzellen mit Rapamycin hatte zur Folge, dass mit zunehmender Konzentration des Inhibitors die Zellkolonien kleiner waren als die Kolonien von Kontrollzellen. Alle Zellen der Kolonien exprimierten dennoch Alkalische Phosphatase. Zusammen mit den Ergebnissen des Western Blot, dass weder die Oct4 noch die Nanog Expression in den mit Rapamycin kultivierten Zellen mit steigender Inhibitorkonzentration verändert war, deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass Rapamycin hauptsächlich einen Einfluss auf die Proliferation, nicht aber auf den Pluripotenzerhalt der Stammzellen hat (Abbildung 4.23). Dies wird durch die Beobachtungen der Gruppe von Murakami bestätigt, die ebenfalls gezeigt hat,

dass die Inhibition von mTOR die Proliferation von Stammzellen beeinflusst (Murakami et al., 2004).



**Abbildung 5.2: Der PI3K Inhibitor LY294002 inhibiert in mES Zellen auch mTOR.**

Durch die LIF induzierte Aktivierung des PI3K Rezeptors und somit PI3K, wird Akt an die Membran rekrutiert und dort an T308 initial phosphoryliert. Zur vollständigen Aktivierung der Kinase von Akt wird dieses an Ser473 durch beispielsweise mTOR phosphoryliert. Der PI3K Inhibitor LY294002 hemmt zusätzlich auch mTOR in mES Zellen (Brunn et al., 1996). Die schematische Darstellung wurde mit Hilfe von *Servier Medical Art* erstellt.

Somit kann ausgeschlossen werden, dass der negative Effekt der PI3K Inhibitoren auf den Pluripotenzerhalt von Stammzellen nicht über die gleichzeitige Inhibition von mTOR induziert wird.

Um zu testen, ob Stammzellen, die kein Akt1 und Akt2 exprimieren, eine veränderte Sensitivität bei einer Inhibition von mTOR bezüglich ihrer Pluripotenz aufweisen, wurden die Zellen sowie entsprechende Kontrollen in Anwesenheit von Rapamycin kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von mTOR mit Rapamycin in Stammzellen mit herunterreguliertem Akt1 und Akt2 die Proliferation in gleichem Maße wie in wt Zellen beeinflusst und das Pluripotenzpotential wie in wt Zellen nicht beeinträchtigt wird. Zudem liegt S6 in den Stammzellen ohne Akt1 und Akt2 ähnlich phosphoryliert wie in wt Zellen vor (Abbildung 4.24). Außerdem ist die Inhibierung der Proliferation durch Rapamycin nicht durch Akt1/Akt2 beeinflusst.

## **5.7 Die Inhibition des JAK/STAT Signalwegs beeinflusst die Pluripotenz in V6.4 mES Zellen**

Aufgrund der unerwarteten Ergebnisse, dass weder die Herunterregulation von PDK1 noch von Akt den pluripotenten Zustand der mES Zellen beeinflussen, sollte in den verwendeten V6.4 mES Zellen geprüft werden, ob die Pluripotenz dieser Zellen, wie es in der Literatur beschrieben wird, abhängig von einem aktivem JAK/STAT Signalweg ist (Hall et al., 2009; Matsuda et al., 1999; Niwa et al., 1998; Niwa et al., 2009).

Die Koloniegröße der Zellen, die mit dem JAK Inhibitor JAK I kultiviert wurden, sowie die Aktivität der Alkalischen Phosphatase nahmen mit zunehmender Inhibitorkonzentration stark ab. Bei hohen Inhibitorkonzentrationen wuchsen die mES Zellen auch nicht mehr in stammzelltypischen Kolonien mit klar definierten Rändern. Mittels Western Blot wurde gezeigt, dass der Inhibitor zu einer stark reduzierten Expression von Oct4 und Nanog in Zellen führte. Steigende Konzentrationen des Inhibitors führten nicht nur zu einer geringeren Phosphorylierung von Stat3, sondern auch zu einer geringeren Expression des Proteins. Die Inhibition von JAK hatte somit einen eindeutigen Einfluss auf die Proliferation und die Pluripotenz der V6.4 mES Zellen.

Unerwarteter Weise hatte die Inhibition von JAK mit JAK I in Akt1 bzw. Akt1 und Akt2 defizienten Zellen im Gegensatz zu wt Stammzellen eine geringere Abnahme der Größe der Zellkolonien und der Aktivität der Alkalischen Phosphatase zur Folge (Abbildung 4.26 und 4.27). Mittels Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass bei einer kurzzeitigen Kultivierung der mES Zellen mit JAK I einen geringeren Einfluss auf die Phosphorylierung von STAT3 in Akt1<sup>-/-</sup> Zellen als in wt Zellen aufwies. Bei einer langzeitigen Kultivierung der Zellen mit dem Inhibitor war der protektive Effekt des fehlenden Akt1 auf die STAT3 Phosphorylierung jedoch geringer und die Expression der Pluripotenzfaktoren Oct4 und Nanog nahm in den Stammzellen ohne Akt1 gleichermaßen ab wie in wt Zellen (Abbildung 4.28).

Bei einer langfristigen Kultivierung der Stammzellen, die kein Akt1 und Akt2 exprimieren, glich sich der Effekt des JAK Inhibitors auf die Expression der pluripotenzrelevanten Transkriptionsfaktoren in den wt Zellen wieder an.

## **5.8 Herunterregulation von Genen im WNT Signalweg bei einem Akt1 knockout**

Der WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg beeinflusst nicht nur die Entscheidung, ob Stammzellen differenzieren oder ihren pluripotenten Zustand beibehalten, sondern spielt auch bei der Reprogrammierung somatischer Zellen zu iPS Zellen eine Rolle. Beispielsweise ist der



pluripotenzassoziierte Transkriptionsfaktor cMyc ein WNT/ $\beta$ -Catenin Targetgen. Außerdem können WNT Moleküle, GSK3 Inhibitoren und TCF3 Repressoren die Reprogrammierungseffizienz erhöhen (Lluis et al., 2011; Lluis, Pedone, Pepe, & Cosma, 2008; Marson et al., 2008). In Stammzellen wurde gezeigt, dass eine kurzzeitige Kultivierung mit einem GSK Inhibitor oder WNT Molekülen die Selbsterneuerung stimuliert und somit die Pluripotenz der Zellen erhält, eine langfristige Kultivierung mit WNT3a hingegen zur Differenzierung der Zellen führt. Eine weitere Studie weist darauf hin, dass die Blockierung des WNT Signalwegs in Stammzellen zu einem Expressionsprofil führt, das eher dem Epiblastenstadium der Zellen entspricht (ten Berge et al., 2011). Ein vollständiger Verlust von  $\beta$ -Catenin in Stammzellen führt aber zu einer unvollständigen Differenzierbarkeit der Zellen (Lyashenko et al., 2011).

Einige Studien postulierten, dass der PI3K Signalweg den WNT/ $\beta$ -Catenin über Inaktivierung von GSK3 beeinflusst (Desbois-Mouthon et al., 2001; Maes et al., 2010). Die Gruppe von Ling hatte 2013 in diesem Zusammenhang ebenfalls festgestellt, dass eine Überexpression von aktiver PDK1 bzw. aktivem Akt weder zu einer Änderung der  $\beta$ -Catenin Proteinexpression noch zu Änderungen der Lokalisierung des Proteins führt und somit die Aktivität des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg nicht beeinflusst (Ling et al., 2013).

Obwohl weder die  $\beta$ -Catenin Expression noch die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  in den Stammzellen mit einer Akt1 bzw. Akt2 Defizienz gegenüber wt Zellen verändert war, führte der Verlust von Akt1 zu einer geringeren mRNA Expression von einigen Genen des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs wie LEF1, Grb10, Wnt8a, DKK1 und KREMEN2 (Abbildung 4.29).

LEF1 bindet zusammen mit transkriptionell aktivem  $\beta$ -Catenin und p300 an regulatorische Elemente der DNA (Lien & Fuchs, 2014). Die Herunterregulation von LEF1 in den Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen konnte mittels Western Blot auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Der Verlust von Akt2 hingegen hatte keine Auswirkungen auf die Expression von LEF1 (Abbildung 4.32). Die Beobachtung, dass die Expression von LEF1 stark reduziert ist, obwohl die Pluripotenz der Akt1<sup>-/-</sup> Stammzellen nicht beeinflusst ist, steht im Widerspruch zu der Feststellung von der Gruppe von Huang, dass bei einer Herunterregulation von LEF1 mit siRNA in mES Zellen, Oct4 und Nanog geringer exprimiert werden und die Zellen differenzieren. Im Gegensatz zu in dieser Arbeit wurden andere mES Zellen verwendet. Und in der Studie wurde die Herunterregulation von LEF1 nur auf mRNA, nicht aber auf Protein Ebene gezeigt. Die Gruppe zeigte zudem, dass LEF1 zusammen mit  $\beta$ -Catenin den Oct4 Promotor aktiviert. Außerdem soll LEF1 direkt mit Nanog interagieren. In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass eine Überexpression von LEF1 den pluripotenten Zustand der Stammzellen bei einer Kultivierung der Zellen ohne LIF erhalten kann (Huang & Qin, 2010).

Wnt8a aktiviert durch die Interaktion mit dem Frizzled Rezeptor den WNT Signalweg. Die anderen Gene, die bei den Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen herunterreguliert sind, verhindern eine Aktivierung des WNT Signalwegs. Grb10 verhindert aufgrund der intrazellulären Interaktion mit LRP6 die Bindung von Axin an den Rezeptor und inhibiert so den WNT Signalweg (Tezuka, Brown, & Yanagawa, 2007). DKK1 und KREMEN bilden zusammen einen Komplex, der zu einer Internalisierung von LRP5/6 führt und so die Interaktion mit WNT verhindert (Causeret, Sumia, & Pierani, 2016).

Ein zusätzlicher Verlust von Akt2 in den mES Zellen hatte keinen Effekt auf die mRNA Expression der Gene im WNT Signalweg, die in Akt1<sup>-/-</sup> Zellen verändert vorlagen. Beispielhaft sind die mRNA Expression von Grb10 und Wnt8a gezeigt (Abbildung 4.30). Viele Wnt Signalweg relevante Gene sind jedoch in den mES Zellen, die kein Akt1 bzw. Akt2 exprimieren gegenüber wt Zellen unverändert. Beispielhaft hierfür sind die mRNA Expressionen von Tcf3, Tert, Sall4 und Axin2 gezeigt (Abbildung 4.31).

Die Herunterregulation auf mRNA Ebene der genannten Gene im WNT Signalweg beeinflusst aufgrund der Interpretation der vorherigen Ergebnisse bezüglich der Akt1<sup>-/-</sup> Zellen weder die Proliferation noch die Pluripotenzhaltung in den mES Zellen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Angaben in der Literatur, dass der WNT Signalwegs bedeutender für die Differenzierung von Stammzellen als für deren Pluripotenzhaltung ist (Davidson et al., 2012; Lindsley, Gill, Kyba, Murphy, & Murphy, 2006). Es gibt jedoch auch Studien, die zeigen, dass der WNT Signalweg essentiell für die Pluripotenzhaltung in Stammzellen ist (Sato, Meijer, Skaltsounis, Greengard, & Brivanlou, 2004; ten Berge et al., 2011).

## 5.9 Abschließende Bemerkungen und Ausblick

Im Hinblick auf eine veränderte Regulation des PI3K/Akt Signalwegs in vielen Tumorarten, die auch teilweise mit einer erhöhten Tumoraggressivität in Verbindung gebracht wird, werden zur Zeit auch verschiedene PI3K Inhibitoren einzeln sowie auch in Kombination mit anderen Chemotherapeutika in der Klinischen Anwendung getestet. Verschiedene Studien haben jedoch gezeigt, dass bei der Behandlung mit einem PI3K Inhibitor viele Tumorzellen Resistenzen entwickeln. Dies geschieht beispielsweise durch eine Hochregulation von Rezeptortyrosinkinasen oder führt nach einer verringerten Glucoseaufnahme der Zellen zu einer verstärkten Insulinsekretion und somit wiederum zu einer Hochregulation von Insulin- und Wachstumsfaktorrezeptoren (Mayer & Arteaga, 2016). Es gibt auch viele verschiedene Akt Inhibitoren, die *in vitro* und *in vivo* Modellen verwendet werden, aber nur wenige davon werden in Einzel- oder Kombinationstherapie klinisch getestet. Studien mit MK-2206 weisen

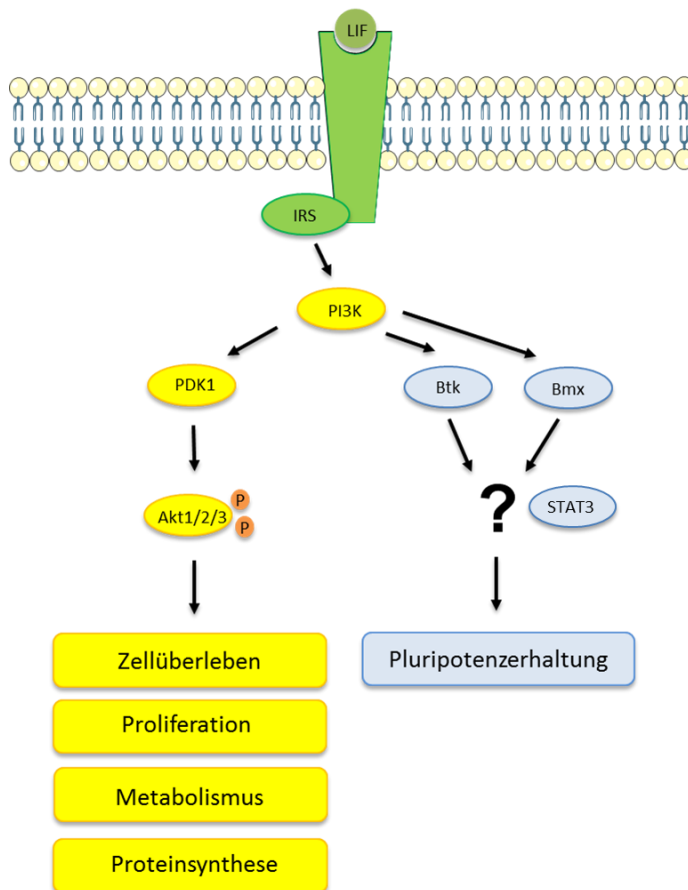
darauf hin, dass Akt Inhibitoren bei Tumoren mit einer PTEN Defizienz oder PIK3CA (Gen für PI3K $\alpha$ ) Mutationen eingesetzt werden könnten. Bisher wurde jedoch noch kein Akt Inhibitor für die Klinische Anwendung zugelassen. Ein Problem stellen hierbei eine zu geringe Spezifität der Inhibitoren aufgrund der strukturellen Gemeinsamkeiten der Isoformen und der Analogie von Akt zu anderen Kinasen der AGC Kinase Familie dar (Niturescu et al., 2016).

Immer mehr Studien implizieren neben Schlüsselsignalwegen wie WNT/ $\beta$ -Catenin, STAT3 und TGF- $\beta$ , eine durch die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signalwegs assoziierte Erhaltung von stammzellähnlichen Krebszellen (*cancer stem-like cells*, CSCs) (Xia & Xu, 2015). CSCs werden als eine Tumorsubpopulation definiert, die eine sich selbst erneuernde Quelle an Tumorzellen darstellen und eine bedeutende Rolle in der Tumoresistenz einnehmen, die wiederum zu einem verstärkten Wiederauftreten, Metastasenbildung und Progression führt (Dubrovskaja et al., 2009). Da einige Tumormodelle Ähnlichkeiten zwischen den sogenannten Tumorstammzellen bzw. Tumoriitierenden Zellen zu embryonalen Stammzellen aufzeigen (Ben-Porath et al., 2008; J. Kim & Orkin, 2011; Wong et al., 2008), könnte es sein, dass basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit die Verwendung von Akt Inhibitoren wie bei den Mausstammzellen sich eher auf die Proliferation oder das Überleben der Zellen, nicht aber auf die Pluripotenz der Zellen auswirkt. Aufgrund der großen Unterschiede der Tumore, die von Patient zu Patient und Tumor zu Tumor variieren, können ohne genauere Analysen keine Aussagen zu einer generellen Wirksamkeit von Inhibitoren, die den PI3K/Akt Signalweg betreffen, gemacht werden. Beispielsweise zeigte die Gruppe von Schäfer in diesem Zusammenhang, dass die Inhibition von Akt in Brustkrebszellen das Wachstum von Sox2 exprimierenden Krebsstammzellen effizient reduziert und Akt Inhibitoren für Sox2 positive Brusttumore daher einen vielversprechenden Therapieansatz darstellen könnten (Schaefer et al., 2015). Im Gegensatz zu der Studie von Schäfer mit humanen Brustkrebszellen wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Expression von Sox2 durch die Inhibition von Akt mit MK-2206 bzw. durch die Herunterregulation von Akt1 und Akt2 in mES Zellen nicht beeinträchtigt wird. Dies könnte zum Beispiel auf Unterschiede zwischen den Spezies, Unterschiede zwischen Tumorstammzellen und Stammzellen oder generelle Unterschiede innerhalb von verschiedenen Krebsstammzellpopulationen zurück zu führen sein.

Im Gegensatz zu den vorherigen Publikationen über den PI3K Signalweg in mES Zellen, in denen vorwiegend mit PI3K Inhibitoren und Überexpressionsstudien gearbeitet wurde, wurden in der vorliegenden Arbeit Akt1 komplett mittels TALEN aus dem Zellsystem entfernt und Akt2 ebenso erfolgreich herunterreguliert. Der Vorteil hierbei liegt in einer geringeren Fehleranfälligkeit der Methode als bei der Expression hyperaktiver Kinasen, die zudem weit stärker als endogene Proteinlevel exprimiert werden. Bei der Studie, in der gezeigt wurde, dass hyperaktives Akt die Selbsterneuerung der mES Zellen erhalten kann, wurde

beispielsweise phosphoryliertes Akt sehr viel stärker detektiert als endogenes in entsprechenden Kontrollen (S. Watanabe et al., 2006). Der Problematik von Überexpressionsstudien liegt in der möglichen Generierung von off-Target Effekten der entsprechenden Kinase. Hyperaktives Akt, könnte so möglicherweise auch andere Signalwege, die nicht durch LIF induziert werden, aktivieren oder deregulieren. Zudem wurde von Watanabe *et al.* für die Expression von aktivem Akt ein humanes Konstrukt verwendet. Dies könnte ebenfalls für Effekte bezüglich der Pluripotenzerhaltung in den Mauszellen verantwortlich sein. Eine andere Erklärung für die gegensätzlichen Aussagen zu dieser Arbeit könnte auch die Verwendung eines anderen mES Zellstammes (E14tg2a) sein (S. Watanabe et al., 2006). Bei der Studie von Ling *et al.* wurde hyperaktive PDK1 im Vergleich zum endogenen Proteinlevel ebenfalls weitaus stärker exprimiert, was möglicherweise denselben unspezifischen Effekt auf die Pluripotenzerhaltung der Stammzellen wie bei der starken Expression von hyperaktivem Akt zur Folge haben könnte. Zudem besitzt das myrPDK1 Konstrukt einen N-terminalen *myc-His-tag* und einen C-terminalen *V5-tag*, was die Proteinaktivität ebenfalls verändern könnte. Auch in der Studie von Ling wurde ein humanes Konstrukt für die Expression von hyperaktiver Akt1 verwendet. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit wurde von der Gruppe von Ling zudem ein anderer Zellstamm (R1) und ein anderer Akt Inhibitor (PKBi) verwendet (Ling et al., 2013).

Aktive PI3K phosphoryliert PIP2 in der Membran zu PIP3, an welches Proteine mit einer PH Domäne binden können. Neben PDK1 und Akt dient PIP3 auch als Bindestelle für Tyrosinkinase der Btk (Bruton's Tyrosinkinase) Familie, zu der Btk, Itk, Bmx und Tec gehören (Miao et al., 2010). Die Btk Kinasen enthalten ebenfalls eine PH, SH2, SH3 und eine Kinase Domäne (Qiu & Kung, 2000). Der durch die Inhibition von PI3K resultierende Verlust der Pluripotenz in Stammzellen könnte somit auch statt über PDK und Akt beispielsweise über Btk vermittelt werden. Bmx wird in der Literatur schon mit der Aktivierung von STAT3 in Verbindung gebracht. Bmx phosphoryliert STAT3 an Tyr705 und führt somit zu einer Aktivierung der Kinase (Vogt & Hart, 2011). Des Weiteren zeigte die Gruppe von Guryanova, dass BMX die Selbsterneuerung und das Tumorpotential von Glioblastomstammzellen durch die Aktivierung von STAT3 aufrechterhält (Guryanova et al., 2011). Btk und Bmx Inhibitoren werden beispielsweise schon in der Therapie von Prostatakrebs, Chronischer Lymphatischer Leukämie, Mantelzell-Lymphomen und Morbus Waldenström eingesetzt (Guo et al., 2014; Wu, Liu, Tsui, & Liu, 2016). Die Btk Kinasen sind neben der postulierten Aktivität in Tumoren an weiteren zellulären Prozessen wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Qiu & Kung, 2000).



**Abbildung 5.3: Die Aktivierung von PI3K führt zu einer Aktivierung der Btk Kinasen.**

Die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3 durch PI3K ermöglicht neben der Rekrutierung von Akt die Bindung der Mitglieder Btk Kinase Familie, die an mehreren zellulären Prozessen, wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose beteiligt sind, an die Zellmembran. Zu den Btk Kinasen zählen beispielsweise Btk und Bmx, die teilweise in Tumoren eine erhöhte Aktivität aufweisen. Bmx phosphoryliert und aktiviert STAT3, was zum Beispiel zur Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung in Glioblastomzellen beiträgt. Die schematische Darstellung wurde mit Hilfe von *Servier Medical Art* erstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Akt bei der Pluripotenzerhaltung in Stammzellen nicht die in der Literatur postulierte bedeutende Rolle zukommt. Weder Akt1 noch Akt2 ist für die Pluripotenzerhaltung der mES Zellen in Anwesenheit des Zytokins LIF notwendig. Auch der in der Arbeit verwendete Akt Inhibitor MK-2206 führt nicht zu einem Pluripotezverlust in den Zellen, sondern in höheren Konzentrationen zu einer verminderten Proliferation oder Apoptose. Der PI3K vermittelte Verlust der Pluripotenz in V6.4 mES Zellen scheint daher nicht Akt vermittelt abzulaufen. Ein weiterer Hinweis darauf, dass der Pluripotenzverlust nicht Akt vermittelt abläuft, ist der fehlende Effekt bei der Inhibition bzw. Herunterregulation von PDK1 auf die Pluripotenz der mES Zellen. Dies wurde nicht nur in dieser Arbeit, sondern ebenso von Williams *et al.* gezeigt (Williams *et al.*, 2000).

Um die Bedeutung und Funktion des PI3K Signalwegs in Stammzellen genauer zu untersuchen, könnten beispielsweise Phosphoproteomanalysen von mit PI3K Inhibitoren kultivierten Zellen zur Identifizierung neuer PI3K Targets, durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang könnte eine Alternative zu der Inhibition der PI3K eine Herunterregulation

der Kinase mit shRNA oder die Generierung von PI3K knockout Zellen durch Genome Editing mittels der TALEN oder CRISPR/Cas darstellen. Hierbei könnte jedoch zum Problem werden, dass es zahlreiche Varianten der Untereinheiten p85 und p110 gibt (Liu et al., 2009) und eine Deletion in einer Variante nicht zu einem vollständigen Verlust der PI3K Aktivität führen würde.

Kurz vor der Fertigstellung dieser Arbeit wurde von Wang *et al.* publiziert, dass nicht Akt1 und Akt2 sondern Akt3 für das Überleben und die Proliferation von mES Zellen verantwortlich ist. Sie gehen davon aus, dass aktives Akt3 zu einer reduzierten p53 Aktivität führt und somit die Proliferation der Zellen reguliert. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich die Proliferation und die Apoptose in den mES Zellen und nicht deren Pluripotenzverhalten untersucht. Die Gruppe verwendete zudem einen anderen mES Zellstamm (R1), in dem Akt3 im Gegensatz zu den V6.4 Zellen deutlich exprimiert wird. Außerdem bestätigt die Studie, dass mES Zellen mit zunehmender Konzentration des Akt Inhibitors MK-2206 apoptotisch werden (Wang et al., 2017).

In Bezug auf die Überlegung, welches Target von PI3K wichtig für die Pluripotenzerhaltung der mES Zellen ist, könnte es daher sein, dass es sich hierbei um Akt3 handelt. Um dies in den V6.4 mES Zellen zu untersuchen, könnte das möglicherweise sehr gering exprimierte Akt3 mit shRNA Konstrukten herunterreguliert werden. Es wäre jedoch auch möglich, dass es hierbei Unterschiede zwischen den mES Zellstämmen gibt. Um genauere Aussagen über die Funktion von Akt3 in Stammzellen treffen zu können, sollten zudem weitere mES Zelllinien in Bezug auf ihre Pluripotenz bei der Herunterregulation der 3 Akt Isoformen analysiert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Altomare, D. A., & Testa, J. R. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, *24*(50), 7455-7464. doi:10.1038/sj.onc.1209085
- Aoto, T., & Nakao, M. (2006). [Epigenetics and nuclear reprogramming: overview]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, *51*(14 Suppl), 2024-2026.
- Atlasi, Y., Noori, R., Gaspar, C., Franken, P., Sacchetti, A., Rafati, H., . . . Fodde, R. (2013). Wnt signaling regulates the lineage differentiation potential of mouse embryonic stem cells through Tcf3 down-regulation. *PLoS Genet*, *9*(5), e1003424. doi:10.1371/journal.pgen.1003424
- Bechard, M., & Dalton, S. (2009). Subcellular localization of glycogen synthase kinase 3beta controls embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell Biol*, *29*(8), 2092-2104. doi:10.1128/MCB.01405-08
- Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W., Regev, A., & Weinberg, R. A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*, *40*(5), 499-507. doi:10.1038/ng.127
- Boiani, M., & Scholer, H. R. (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(11), 872-884. doi:10.1038/nrm1744
- Brumbaugh, J., Hou, Z., Russell, J. D., Howden, S. E., Yu, P., Ledvina, A. R., . . . Thomson, J. A. (2012). Phosphorylation regulates human OCT4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(19), 7162-7168. doi:10.1073/pnas.1203874109
- Brunn, G. J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence, J. C., Jr., & Abraham, R. T. (1996). Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J*, *15*(19), 5256-5267.
- Burdon, T., Smith, A., & Savatier, P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends in Cell Biology*, *12*(9), 432-438. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02352-8
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., . . . Reed, J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, *282*(5392), 1318-1321.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., . . . Jove, R. (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, *10*(1), 105-115.
- Causeret, F., Sumia, I., & Pierani, A. (2016). Kremen1 and Dickkopf1 control cell survival in a Wnt-independent manner. *Cell Death Differ*, *23*(2), 323-332. doi:10.1038/cdd.2015.100
- Cho, H., Mu, J., Kim, J. K., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Crenshaw, E. B., 3rd, . . . Birnbaum, M. J. (2001). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*, *292*(5522), 1728-1731. doi:10.1126/science.292.5522.1728
- Cho, H., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Feng, F., & Birnbaum, M. J. (2001). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem*, *276*(42), 38349-38352. doi:10.1074/jbc.C100462200
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*, *149*(6), 1192-1205. doi:10.1016/j.cell.2012.05.012
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, *91*(2), 231-241.
- Davidson, K. C., Adams, A. M., Goodson, J. M., McDonald, C. E., Potter, J. C., Berndt, J. D., . . . Moon, R. T. (2012). Wnt/beta-catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(12), 4485-4490. doi:10.1073/pnas.1118777109

- Desbois-Mouthon, C., Cadoret, A., Blivet-Van Eggelpeel, M. J., Bertrand, F., Cherqui, G., Perret, C., & Capeau, J. (2001). Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3beta inhibition and Ras activation. *Oncogene*, *20*(2), 252-259. doi:10.1038/sj.onc.1204064
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, *399*(6736), 601-605. doi:10.1038/21224
- Doble, B. W., Patel, S., Wood, G. A., Kockeritz, L. K., & Woodgett, J. R. (2007). Functional redundancy of GSK-3alpha and GSK-3beta in Wnt/beta-catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. *Dev Cell*, *12*(6), 957-971. doi:10.1016/j.devcel.2007.04.001
- Dubrovskaya, A., Kim, S., Salamone, R. J., Walker, J. R., Maira, S. M., Garcia-Echeverria, C., . . . Reddy, V. A. (2009). The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(1), 268-273. doi:10.1073/pnas.0810956106
- Dummler, B., Tschopp, O., Hynx, D., Yang, Z. Z., Dirnhofer, S., & Hemmings, B. A. (2006). Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol Cell Biol*, *26*(21), 8042-8051. doi:10.1128/MCB.00722-06
- Easton, R. M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D. W., Mizrahi, M., Forman, M. S., . . . Birnbaum, M. J. (2005). Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol*, *25*(5), 1869-1878. doi:10.1128/MCB.25.5.1869-1878.2005
- Efroni, S., Duttagupta, R., Cheng, J., Dehghani, H., Hoepfner, D. J., Dash, C., . . . Meshorer, E. (2008). Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, *2*(5), 437-447. doi:10.1016/j.stem.2008.03.021
- Elstrom, R. L., Bauer, D. E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M. H., Plas, D. R., . . . Thompson, C. B. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res*, *64*(11), 3892-3899. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2904
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, *292*(5819), 154-156.
- Fayard, E., Tintignac, L. A., Baudry, A., & Hemmings, B. A. (2005). Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci*, *118*(Pt 24), 5675-5678. doi:10.1242/jcs.02724
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, *85*(8), 348-362.
- Ganat, Y. M., Calder, E. L., Kriks, S., Nelander, J., Tu, E. Y., Jia, F., . . . Studer, L. (2012). Identification of embryonic stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons for engraftment. *J Clin Invest*, *122*(8), 2928-2939. doi:10.1172/JCI58767
- Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E., & Ramalho-Santos, M. (2011). Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *12*(1), 36-47. doi:10.1038/nrm3036
- Gharbi, S. I., Zvelebil, M. J., Shuttleworth, S. J., Hancox, T., Saghir, N., Timms, J. F., & Waterfield, M. D. (2007). Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem J*, *404*(1), 15-21. doi:10.1042/BJ20061489
- Goldstein, S. (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*, *249*(4973), 1129-1133.
- Gonzalez, E., & McGraw, T. E. (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle*, *8*(16), 2502-2508. doi:10.4161/cc.8.16.9335
- Gonzalez, F., Boue, S., & Izpisua Belmonte, J. C. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet*, *12*(4), 231-242. doi:10.1038/nrg2937
- Gordan, J. D., & Simon, M. C. (2007). Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev*, *17*(1), 71-77. doi:10.1016/j.gde.2006.12.006
- Guguen-Guillouzo, C., Corlu, A., & Guillouzo, A. (2010). Stem cell-derived hepatocytes and their use in toxicology. *Toxicology*, *270*(1), 3-9. doi:10.1016/j.tox.2009.09.019



- Guo, W., Liu, R., Bhardwaj, G., Yang, J. C., Changou, C., Ma, A. H., . . . Kung, H. J. (2014). Targeting Btk/Etk of prostate cancer cells by a novel dual inhibitor. *Cell Death Dis*, *5*, e1409. doi:10.1038/cddis.2014.343
- Guryanova, O. A., Wu, Q., Cheng, L., Lathia, J. D., Huang, Z., Yang, J., . . . Bao, S. (2011). Nonreceptor tyrosine kinase BMX maintains self-renewal and tumorigenic potential of glioblastoma stem cells by activating STAT3. *Cancer Cell*, *19*(4), 498-511. doi:10.1016/j.ccr.2011.03.004
- Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L., . . . Smith, A. (2009). Oct4 and LIF/Stat3 Additively Induce Krüppel Factors to Sustain Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell*, *5*(6), 597-609. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2009.11.003
- Han, J., Yuan, P., Yang, H., Zhang, J., Soh, B. S., Li, P., . . . Lim, B. (2010). Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells. *Nature*, *463*(7284), 1096-1100. doi:10.1038/nature08735
- Hart, A. H., Hartley, L., Ibrahim, M., & Robb, L. (2004). Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev Dyn*, *230*(1), 187-198. doi:10.1002/dvdy.20034
- Hay, N. (2011). Akt isoforms and glucose homeostasis - the leptin connection. *Trends Endocrinol Metab*, *22*(2), 66-73. doi:10.1016/j.tem.2010.09.003
- Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *4*(9), a011189. doi:10.1101/cshperspect.a011189
- Hirai, H., Karian, P., & Kikyo, N. (2011). Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochem J*, *438*(1), 11-23. doi:10.1042/BJ20102152
- Huang, C., & Qin, D. (2010). Role of Lef1 in sustaining self-renewal in mouse embryonic stem cells. *J Genet Genomics*, *37*(7), 441-449. doi:10.1016/S1673-8527(09)60063-1
- Imai, Y., Yamagishi, H., Ono, Y., & Ueda, Y. (2012). Versatile inhibitory effects of the flavonoid-derived PI3K/Akt inhibitor, LY294002, on ATP-binding cassette transporters that characterize stem cells. *Clin Transl Med*, *1*(1), 24. doi:10.1186/2001-1326-1-24
- Jeong, C. H., Cho, Y. Y., Kim, M. O., Kim, S. H., Cho, E. J., Lee, S. Y., . . . Dong, Z. (2010). Phosphorylation of Sox2 cooperates in reprogramming to pluripotent stem cells. *Stem Cells*, *28*(12), 2141-2150. doi:10.1002/stem.540
- Jung, D.-W., Kim, W.-H., & Williams, D. R. (2013). Reprogram or Reboot: Small Molecule Approaches for the Production of Induced Pluripotent Stem Cells and Direct Cell Reprogramming. *ACS Chemical Biology*, *9*(1), 80-95. doi:10.1021/cb400754f
- Kim, H., Um, E., Cho, S. R., Jung, C., Kim, H., & Kim, J. S. (2011). Surrogate reporters for enrichment of cells with nuclease-induced mutations. *Nat Methods*, *8*(11), 941-943. doi:10.1038/nmeth.1733
- Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., & Orkin, S. H. (2008). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell*, *132*(6), 1049-1061. doi:10.1016/j.cell.2008.02.039
- Kim, J., & Orkin, S. H. (2011). Embryonic stem cell-specific signatures in cancer: insights into genomic regulatory networks and implications for medicine. *Genome Med*, *3*(11), 75. doi:10.1186/gm291
- Kim, S. H., Kim, M. O., Cho, Y. Y., Yao, K., Kim, D. J., Jeong, C. H., . . . Dong, Z. (2014). ERK1 phosphorylates Nanog to regulate protein stability and stem cell self-renewal. *Stem Cell Res*, *13*(1), 1-11. doi:10.1016/j.scr.2014.04.001
- Kim, Y., Kweon, J., Kim, A., Chon, J. K., Yoo, J. Y., Kim, H. J., . . . Kim, J. S. (2013). A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat Biotechnol*, *31*(3), 251-258. doi:10.1038/nbt.2517
- Koike, M., Sakaki, S., Amano, Y., & Kurosawa, H. (2007). Characterization of embryoid bodies of mouse embryonic stem cells formed under various culture conditions and estimation of differentiation status of such bodies. *J Biosci Bioeng*, *104*(4), 294-299. doi:10.1263/jbb.104.294
- Kumar, C. C., & Madison, V. (2005). AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene*, *24*(50), 7493-7501. doi:10.1038/sj.onc.1209087

- Kunath, T., Saba-El-Leil, M. K., Almousailleakh, M., Wray, J., Meloche, S., & Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development*, *134*(16), 2895-2902. doi:10.1242/dev.02880
- Laflamme, M. A., Chen, K. Y., Naumova, A. V., Muskheli, V., Fugate, J. A., Dupras, S. K., . . . Murry, C. E. (2007). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*, *25*(9), 1015-1024. doi:10.1038/nbt1327
- Lee, M. W., Kim, D. S., Lee, J. H., Lee, B. S., Lee, S. H., Jung, H. L., . . . Koo, H. H. (2011). Roles of AKT1 and AKT2 in non-small cell lung cancer cell survival, growth, and migration. *Cancer Sci*, *102*(10), 1822-1828. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02025.x
- Lien, W. H., & Fuchs, E. (2014). Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/beta-catenin signaling. *Genes Dev*, *28*(14), 1517-1532. doi:10.1101/gad.244772.114
- Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S. J., Murphy, M. E., Appella, E., & Xu, Y. (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol*, *7*(2), 165-171. doi:10.1038/ncb1211
- Lin, Y., Yang, Y., Li, W., Chen, Q., Li, J., Pan, X., . . . Wang, Y.-J. (2012). Reciprocal Regulation of Akt and Oct4 Promotes the Self-Renewal and Survival of Embryonal Carcinoma Cells. *Molecular Cell*, *48*(4), 627-640. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.030
- Lindsley, R. C., Gill, J. G., Kyba, M., Murphy, T. L., & Murphy, K. M. (2006). Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development*, *133*(19), 3787-3796. doi:10.1242/dev.02551
- Ling, L. S., Voskas, D., & Woodgett, J. R. (2013). Activation of PDK-1 maintains mouse embryonic stem cell self-renewal in a PKB-dependent manner. *Oncogene*, *32*(47), 5397-5408. doi:10.1038/onc.2013.44
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., & Zhao, J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, *8*(8), 627-644. doi:10.1038/nrd2926
- Lluis, F., Ombrato, L., Pedone, E., Pepe, S., Merrill, B. J., & Cosma, M. P. (2011). T-cell factor 3 (Tcf3) deletion increases somatic cell reprogramming by inducing epigenome modifications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(29), 11912-11917. doi:10.1073/pnas.1017402108
- Lluis, F., Pedone, E., Pepe, S., & Cosma, M. P. (2008). Periodic activation of Wnt/beta-catenin signaling enhances somatic cell reprogramming mediated by cell fusion. *Cell Stem Cell*, *3*(5), 493-507. doi:10.1016/j.stem.2008.08.017
- Lu, R., Yang, A., & Jin, Y. (2011). Dual functions of T-box 3 (Tbx3) in the control of self-renewal and extraembryonic endoderm differentiation in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*, *286*(10), 8425-8436. doi:10.1074/jbc.M110.202150
- Lyashenko, N., Winter, M., Migliorini, D., Biechele, T., Moon, R. T., & Hartmann, C. (2011). Differential requirement for the dual functions of beta-catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation. *Nat Cell Biol*, *13*(7), 753-761. doi:10.1038/ncb2260
- Maes, C., Goossens, S., Bartunkova, S., Drogat, B., Coenegrachts, L., Stockmans, I., . . . Haigh, J. J. (2010). Increased skeletal VEGF enhances beta-catenin activity and results in excessively ossified bones. *EMBO J*, *29*(2), 424-441. doi:10.1038/emboj.2009.361
- Mahla, R. S. (2016). Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. *Int J Cell Biol*, *2016*, 6940283. doi:10.1155/2016/6940283
- Maira, S. M., Galetic, I., Brazil, D. P., Kaech, S., Ingley, E., Thelen, M., & Hemmings, B. A. (2001). Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. *Science*, *294*(5541), 374-380. doi:10.1126/science.1062030
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, *129*(7), 1261-1274. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009

- Marson, A., Foreman, R., Chevalier, B., Bilodeau, S., Kahn, M., Young, R. A., & Jaenisch, R. (2008). Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 3(2), 132-135. doi:10.1016/j.stem.2008.06.019
- Martelli, A. M., Tabellini, G., Bressanin, D., Ognibene, A., Goto, K., Cocco, L., & Evangelisti, C. (2012). The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta*, 1823(12), 2168-2178. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.08.017
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., . . . Niwa, H. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 9(6), 625-635. doi:10.1038/ncb1589
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., & Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*, 18(15), 4261-4269. doi:10.1093/emboj/18.15.4261
- Mayer, I. A., & Arteaga, C. L. (2016). The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. *Annu Rev Med*, 67, 11-28. doi:10.1146/annurev-med-062913-051343
- McDonald, P. C., Oloumi, A., Mills, J., Dobрева, I., Maidan, M., Gray, V., . . . Dedhar, S. (2008). Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival. *Cancer Res*, 68(6), 1618-1624. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5869
- Miao, B., Skidan, I., Yang, J., Lugovskoy, A., Reibarkh, M., Long, K., . . . Degterev, A. (2010). Small molecule inhibition of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) binding to pleckstrin homology domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(46), 20126-20131. doi:10.1073/pnas.1004522107
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., . . . Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 29(2), 143-148. doi:10.1038/nbt.1755
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., . . . Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), 631-642.
- Muchkaeva, I. A., Dashinimaev, E. B., Terskikh, V. V., Sukhanov, Y. V., & Vasiliev, A. V. (2012). Molecular mechanisms of induced pluripotency. *Acta Naturae*, 4(1), 12-22.
- Muller, R., & Lengerke, C. (2009). Patient-specific pluripotent stem cells: promises and challenges. *Nat Rev Endocrinol*, 5(4), 195-203. doi:10.1038/nrendo.2009.18
- Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., . . . Yamanaka, S. (2004). mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 24(15), 6710-6718. doi:10.1128/MCB.24.15.6710-6718.2004
- Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., . . . Niwa, H. (2006). Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 26(20), 7772-7782. doi:10.1128/MCB.00468-06
- Ng, H. H., & Surani, M. A. (2011). The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nat Cell Biol*, 13(5), 490-496. doi:10.1038/ncb0511-490
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., . . . Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95(3), 379-391.
- Nitulescu, G. M., Margina, D., Juzenas, P., Peng, Q., Olaru, O. T., Saloustros, E., . . . Tsatsakis, A. M. (2016). Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *Int J Oncol*, 48(3), 869-885. doi:10.3892/ijo.2015.3306
- Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development*, 134(4), 635-646. doi:10.1242/dev.02787
- Niwa, H. (2011). Wnt: what's needed to maintain pluripotency? *Nat Cell Biol*, 13(9), 1024-1026. doi:10.1038/ncb2333
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., & Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, 12(13), 2048-2060.

- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., & Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, *460*(7251), 118-122. doi:10.1038/nature08113
- Paling, N. R., Wheadon, H., Bone, H. K., & Welham, M. J. (2004). Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem*, *279*(46), 48063-48070. doi:10.1074/jbc.M406467200
- Parisi, S., Passaro, F., Aloia, L., Manabe, I., Nagai, R., Pastore, L., & Russo, T. (2008). Klf5 is involved in self-renewal of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci*, *121*(Pt 16), 2629-2634. doi:10.1242/jcs.027599
- Peng, X. D., Xu, P. Z., Chen, M. L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., . . . Hay, N. (2003). Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev*, *17*(11), 1352-1365. doi:10.1101/gad.1089403
- Pesce, M., & Scholer, H. R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*, *19*(4), 271-278. doi:10.1634/stemcells.19-4-271
- Qiu, Y., & Kung, H. J. (2000). Signaling network of the Btk family kinases. *Oncogene*, *19*(49), 5651-5661. doi:10.1038/sj.onc.1203958
- Robinton, D. A., & Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, *481*(7381), 295-305. doi:10.1038/nature10761
- Roy, N. S., Cleren, C., Singh, S. K., Yang, L., Beal, M. F., & Goldman, S. A. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med*, *12*(11), 1259-1268. doi:10.1038/nm1495
- Saji, M., Narahara, K., McCarty, S. K., Vasko, V. V., La Perle, K. M., Porter, K., . . . Ringel, M. D. (2011). Akt1 deficiency delays tumor progression, vascular invasion, and distant metastasis in a murine model of thyroid cancer. *Oncogene*, *30*(42), 4307-4315. doi:10.1038/onc.2011.136
- Sanges, D., & Cosma, M. P. (2010). Reprogramming cell fate to pluripotency: the decision-making signalling pathways. *Int J Dev Biol*, *54*(11-12), 1575-1587. doi:10.1387/ijdb.103190ds
- Santi, S. A., & Lee, H. (2010). The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol*, *298*(3), C580-591. doi:10.1152/ajpcell.00375.2009
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., & Brivanlou, A. H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*, *10*(1), 55-63. doi:10.1038/nm979
- Saunders, A., Li, D., Faiola, F., Huang, X., Fidalgo, M., Guallar, D., . . . Wang, J. (2017). Context-Dependent Functions of NANOG Phosphorylation in Pluripotency and Reprogramming. *Stem Cell Reports*, *8*(5), 1115-1123. doi:10.1016/j.stemcr.2017.03.023
- Schaefer, T., Wang, H., Mir, P., Konantz, M., Pereboom, T. C., Paczulla, A. M., . . . Lengerke, C. (2015). Molecular and functional interactions between AKT and SOX2 in breast carcinoma. *Oncotarget*, *6*(41), 43540-43556. doi:10.18632/oncotarget.6183
- Schultze, S. M., Hemmings, B. A., Niessen, M., & Tschopp, O. (2012). PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis. *Expert Rev Mol Med*, *14*, e1. doi:10.1017/S1462399411002109
- Sekimoto, T., Fukumoto, M., & Yoneda, Y. (2004). 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1). *EMBO J*, *23*(9), 1934-1942. doi:10.1038/sj.emboj.7600198
- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., & Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, *336*(6200), 688-690. doi:10.1038/336688a0
- Spelat, R., Ferro, F., & Curcio, F. (2012). Serine 111 phosphorylation regulates OCT4A protein subcellular distribution and degradation. *J Biol Chem*, *287*(45), 38279-38288. doi:10.1074/jbc.M112.386755

- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., & Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 322(5903), 945-949. doi:10.1126/science.1162494
- Stahl, J. M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J. Q., Bosenberg, M. W., . . . Robertson, G. P. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res*, 64(19), 7002-7010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1399
- Stefkova, K., Prochazkova, J., & Pachernik, J. (2015). Alkaline phosphatase in stem cells. *Stem Cells Int*, 2015, 628368. doi:10.1155/2015/628368
- Storm, M. P., Bone, H. K., Beck, C. G., Bourillot, P. Y., Schreiber, V., Damiano, T., . . . Welham, M. J. (2007). Regulation of Nanog expression by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling in murine embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 282(9), 6265-6273. doi:10.1074/jbc.M610906200
- Storm, M. P., Kumpfmüller, B., Thompson, B., Kolde, R., Vilo, J., Hummel, O., . . . Welham, M. J. (2009). Characterization of the phosphoinositide 3-kinase-dependent transcriptome in murine embryonic stem cells: identification of novel regulators of pluripotency. *Stem Cells*, 27(4), 764-775. doi:10.1002/stem.3
- Taha, C., Liu, Z., Jin, J., Al-Hasani, H., Sonenberg, N., & Klip, A. (1999). Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *J Biol Chem*, 274(46), 33085-33091.
- Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Ohtake, F., Kobayashi, S., Igarashi, M., . . . Kato, S. (2007). A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol*, 9(11), 1273-1285. doi:10.1038/ncb1647
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
- Tang, Y., Jiang, Z., Luo, Y., Zhao, X., Wang, L., Norris, C., & Tian, X. C. (2014). Differential effects of Akt isoforms on somatic cell reprogramming. *J Cell Sci*, 127(Pt 18), 3998-4008. doi:10.1242/jcs.150029
- ten Berge, D., Kurek, D., Blauwkamp, T., Koole, W., Maas, A., Eroglu, E., . . . Nusse, R. (2011). Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat Cell Biol*, 13(9), 1070-1075. doi:10.1038/ncb2314
- Tezuka, N., Brown, A. M., & Yanagawa, S. (2007). GRB10 binds to LRP6, the Wnt co-receptor and inhibits canonical Wnt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 356(3), 648-654. doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.019
- Ugi, S., Imamura, T., Maegawa, H., Egawa, K., Yoshizaki, T., Shi, K., . . . Olefsky, J. M. (2004). Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol*, 24(19), 8778-8789. doi:10.1128/MCB.24.19.8778-8789.2004
- Vogt, P. K., & Hart, J. R. (2011). PI3K and STAT3: a new alliance. *Cancer Discov*, 1(6), 481-486. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0218
- Vojnits, K., & Bremer, S. (2010). Challenges of using pluripotent stem cells for safety assessments of substances. *Toxicology*, 270(1), 10-17. doi:10.1016/j.tox.2009.12.003
- Wang, L., Huang, D., Jiang, Z., Luo, Y., Norris, C., Zhang, M., . . . Tang, Y. (2017). Akt3 is responsible for the survival and proliferation of embryonic stem cells. *Biol Open*, 6(6), 850-861. doi:10.1242/bio.024505
- Warmflash, A., Arduini, B. L., & Brivanlou, A. H. (2012). The molecular circuitry underlying pluripotency in embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 4(5), 443-456. doi:10.1002/wsbm.1182
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y. H., Li, H., Lau, F., . . . Rossi, D. J. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7(5), 618-630. doi:10.1016/j.stem.2010.08.012

- Watanabe, K., & Dai, X. (2011). A WNTer revisit: new faces of beta-catenin and TCFs in pluripotency. *Sci Signal*, 4(193), pe41. doi:10.1126/scisignal.2002436
- Watanabe, S., Umehara, H., Murayama, K., Okabe, M., Kimura, T., & Nakano, T. (2006). Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene*, 25(19), 2697-2707. doi:10.1038/sj.onc.1209307
- Williams, M. R., Arthur, J. S., Balendran, A., van der Kaay, J., Poli, V., Cohen, P., & Alessi, D. R. (2000). The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr Biol*, 10(8), 439-448.
- Wong, D. J., Liu, H., Ridky, T. W., Cassarino, D., Segal, E., & Chang, H. Y. (2008). Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell Stem Cell*, 2(4), 333-344. doi:10.1016/j.stem.2008.02.009
- Wu, J., Liu, C., Tsui, S. T., & Liu, D. (2016). Second-generation inhibitors of Bruton tyrosine kinase. *J Hematol Oncol*, 9(1), 80. doi:10.1186/s13045-016-0313-y
- Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), 471-484. doi:10.1016/j.cell.2006.01.016
- Xia, P., & Xu, X. Y. (2015). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. *Am J Cancer Res*, 5(5), 1602-1609.
- Yi, F., Pereira, L., Hoffman, J. A., Shy, B. R., Yuen, C. M., Liu, D. R., & Merrill, B. J. (2011). Opposing effects of Tcf3 and Tcf1 control Wnt stimulation of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol*, 13(7), 762-770. doi:10.1038/ncb2283
- Zacharias, D. G., Nelson, T. J., Mueller, P. S., & Hook, C. C. (2011). The science and ethics of induced pluripotency: what will become of embryonic stem cells? *Mayo Clin Proc*, 86(7), 634-640. doi:10.4065/mcp.2011.0054
- Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B. Z., Rubinstein, M., & Cohen, B. (1998). Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *EMBO J*, 17(17), 5085-5094. doi:10.1093/emboj/17.17.5085
- Zeng, X. (2007). Human embryonic stem cells: mechanisms to escape replicative senescence? *Stem Cell Rev*, 3(4), 270-279. doi:10.1007/s12015-007-9005-x
- Zhang, B., Gu, F., She, C., Guo, H., Li, W., Niu, R., . . . Ma, Y. (2009). Reduction of Akt2 inhibits migration and invasion of glioma cells. *Int J Cancer*, 125(3), 585-595. doi:10.1002/ijc.24314
- Zhao, T., Zhang, Z. N., Rong, Z., & Xu, Y. (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 474(7350), 212-215. doi:10.1038/nature10135
- Zhao, W. N., Cheng, C., Theriault, K. M., Sheridan, S. D., Tsai, L. H., & Haggarty, S. J. (2012). A high-throughput screen for Wnt/beta-catenin signaling pathway modulators in human iPSC-derived neural progenitors. *J Biomol Screen*, 17(9), 1252-1263. doi:10.1177/10870571112456876
- Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., & Hung, M. C. (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol*, 3(11), 973-982. doi:10.1038/ncb1101-973
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J. Y., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., . . . Ding, S. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 4(5), 381-384. doi:10.1016/j.stem.2009.04.005

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Frau Julia Günter war im Rahmen ihrer Diplomarbeit unter meiner Anleitung maßgeblich an der Generierung der Akt1<sup>-/-</sup> mES Zelllinie beteiligt. Dazu gehörten die Etablierung der TALEN-Plasmid Transfektionen und die anfängliche Kultivierung der selektierten Klone, sowie die Bestätigung des Akt1 knockouts der in dieser Arbeit verwendeten Klone.

Frau Perihan Mir analysierte im Rahmen ihrer Masterarbeit unter meiner Anleitung die Alkalische Phosphatase Aktivität der Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen (Abbildung 4.4B).

Die Selektion der Akt1<sup>-/-</sup> mES Zellen mittels FACS wurde durch die FACS Core Facility (FCF), Universitätsklinikum Tübingen durchgeführt (Abbildung 4.3C).

Alle weiteren Experimente und Analysen, soweit nach bestem Wissen und Gewissen ersichtlich, wurden von mir durchgeführt.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Britta Merz
Geburtsdatum:	10.08.1982
Geburtsort:	Balingen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

### Berufs- und Bildungsweg

12/2012 - 07/2017	Promotion
10/2005 - 10/2012	Studium der Biochemie, Eberhard Karls Universität Tübingen
09/1999 - 6/2002	Gymnasium Balingen
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
09/1993 - 07/1999	Progymnasium Rosenfeld
	Abschluss: Mittlere Reife



## 9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Britta Merz, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit zum Thema „Pluripotenzenerhaltung von Mausstammzellen in Abhängigkeit des PI3K/Akt Signalwegs“ eigenständig, ohne unerlaubte Hilfsmittel und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle sinngemäß und wörtlich übernommenen Textstellen aus Veröffentlichungen oder aus anderweitigen fremden Äußerungen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Tübingen, den 14.07. 2017

Britta Merz