

8. Zusammenfassung (German)

8.1 Einleitung

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus der inneren Zellmasse (IZM) von Präimplantationsembryonen gewonnen. Sie sind in der Lage, zur Entwicklung von chimärischen Mäusen beizutragen, wenn sie in die IZM zurücktransplantiert werden. Diese besondere Fähigkeit wird als naive Pluripotenz oder als der Grundzustand der Pluripotenz bezeichnet. Epiblast-Stammzellen (EpiS-Zellen) werden aus dem Epiblasten von Postimplantationsembryonen gewonnen. Während sie ebenfalls pluripotente Stammzellen darstellen, die in der Lage sind, Teratomen zu generieren, tragen sie nicht zur Entwicklung von chimärischen Mäusen bei, wenn sie in die IZM zurücktransplantiert werden. Diese etwas beschränkte Pluripotenz des geringfügig weiter entwickelten Embryos wird "primed" Pluripotenz genannt, d.h. bereit für die Festlegung auf ein Keimblatt. EpiS-Zellen sind heterogen sowohl innerhalb von, als auch zwischen Zelllinien. Es wurde gezeigt, dass sie aus mindestens zwei Subpopulationen bestehen, die funktional der frühen bzw. der späten Postimplantationsentwicklung entsprechen. Der kleine Anteil, der das frühe Stadium repräsentiert, ist sogar fähig Chimären zu generieren, während der allergrößte Teil, der das späte Stadium repräsentiert, nicht zur Entwicklung von Chimären beitragen kann. Bis jetzt konnten diese EpiS-Zellen des späten Stadiums nicht, allein durch chemische Inhibitoren, in naive Pluripotenz reprogrammiert werden. Im Gegenteil zu EpiS-Zellen des frühen Stadiums widersetzten sich EpiS-Zellen des späten Stadiums der 2i/LIF-Bedingung, mit dem die Stabilisierung des Grundzustands der Pluripotenz durch Inhibition von GSK3 β und MEK erreicht werden kann.

8.2 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine neue chemische Methode für die Konvertierung von inerten EpiS-Zellen des späten Stadiums in naive Pluripotenz zu identifizieren. Im Rahmen der Untersuchungen des Wirkmechanismus der entdeckten aktiven Verbindungen sollte der Mechanismus, der der Etablierung des Grundzustands der Pluripotenz in EpiS-Zellen des späten Stadiums zugrunde liegt, aufgeklärt werden.

8.3 Methoden

Zu diesem Zweck wählte ich einen chemisch-genetischen Ansatz. Ich entwickelte ein systematisches Testverfahren (screening assay) zur Identifizierung von niedermolekularen Verbindungen (small molecules) und benutzte die LOPAC-Bibliothek von bekannten pharmakologisch aktiven Verbindungen, um "Treffer" (hits) zu finden. Der Hit wurde in Sekundärtestverfahren durch vollständige Charakterisierung der konvertierten Zellen mittels FACS, qRT-PCR, globaler Genexpressionsanalyse, Immunocytochemie und Teratom- und Chimärentest validiert. Untersuchungen zur Zielidentifizierung umfassten Kinaseprofilierung, Testierung weiterer Inhibitoren mit abweichenden chemischen Strukturen, Microarray- und Gene Ontology-Analysen, Untersuchungen zur Struktur-Aktivitätsbeziehung und IC50-Wertbestimmungen. Die weitere Erforschung des Wirkmechanismus und die Zielvalidierung umfassten biochemische Testverfahren, wie Westernblot, genetische Knock-down-Experimente, und *in vivo* phänotyp-basierte Testverfahren am Zebrafischmodell.

8.4 Ergebnisse

Ich entwickelte ein Testverfahren (screening assay) in 96-Well-Mikrotiterplatten basierend auf der unterschiedlichen Expression des *OCT4-GFP*-Reportergens in GOF18 EpiS-Zellen und ES-Zellen für die Identifizierung von aktiven niedermolekularen Verbindungen (small molecules). Für die Auslese wurde ein High-content-Lesegerät für Mikrotiterplatten verwendet. Ich identifizierte Triamteren (TR), ein bekanntes Pteridinderivat, das als Diuretikum verwendet wird, als Trefferverbindung. Die Validierung der Trefferverbindung zeigte, dass TR mehrere EpiS-Zelllinien des späten Stadiums in einen Zustand konvertieren konnte, der viele Eigenschaften mit ES-Zellen teilte. Die konvertierten Zellen waren jedoch nicht in der Lage, zur Entwicklung von Chimären beizutragen, wenn sie in Blastozysten injiziert wurden. Dieses Defizit konnte durch die Ergänzung der TR-induzierten Konvertierung durch gleichzeitige Inhibition des ERK-Signalwegs überwunden werden, was in der Gewinnung von ES-Zell-ähnlichen Zellen mit vollständiger Chimärenkompetenz resultierte. Kinaseprofilierung identifizierte $CK1\delta/\epsilon$ und $PI3Kclass2\gamma$ als mögliche Zielmoleküle von TR. Anschließende Gen-knock-down-Experimente bestätigten die Isoform $CK1\epsilon$ als das Zielmolekül der TR-induzierten Konvertierung. Untersuchungen der Struktur-Aktivitätsbeziehung führte zur Synthese eines deutlich potenteren Inhibitors, genannt AU52, mit der Fähigkeit der naiven Zellkonvertierung. Biochemische Analysen zeigten, dass die Inhibition von $CK1\epsilon$ in der gleichzeitigen Inhibition der Phosphorylierung von β -CATENIN and SMAD2 resultierte. Die zeitgleiche Stimulierung des WNT und Blockierung des TGF β Signalwegs führten zur Aktivierung der ES-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren *Klf2*, *Nanog* und *Esrrb*, die schließlich die naive Konvertierung bewerkstelligten.

8.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend stellen die vorliegenden Ergebnisse das erste chemische Protokoll für die Reprogrammierung von EpiS-Zellen des späten Stadiums in naive Pluripotenz dar. Ich zeige, dass CK1 ϵ einen Einfluss auf das Kernnetzwerk der Regulierung des Grundzustands der Pluripotenz hat, und erläutere den Wirkmechanismus der TR/AU52-induzierten naiven Konvertierung. Letztendlich stelle ich eine neue chemische Methode für die weitere Erforschung der zwei Stadien der "naïve" und "primed" Pluripotenz vor.