

Aus dem Institut für Neuroanatomie der Universität Tübingen
Abteilung Sensorische Entwicklung

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Stefan Liebau

**Identifikation olfaktorischer Entwicklungsstadien im hiPSZ-
basierten Differenzierungsprotokoll**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der
Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Edna Pauline Ella Blum

2021

Dekan:

1. Berichtserstatter:

2. Berichtserstatter:

Professor Dr. rer. nat. Bernd Pichler

Professor Dr. med. Stefan Liebau

Professor Dr. med. Olaf Rieß

Tag der Disputation:

28. April 2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Funktionalität des Geruchssinns	7
1.1.1 Überblick über Riechstörungen, Therapie und Prognose	9
1.1.2 Bezug zur Differenzierung von olfaktorischen Rezeptorneuronen <i>in vitro</i> aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen.....	9
1.2 Embryonale Entwicklung im Hinblick auf das olfaktorische System	10
1.2.1 Die Präplakodale Region.....	13
1.2.2 Weiterentwicklung und Unterteilung der Präplakodalen Region.....	17
1.2.3 Die olfaktorischen Plakoden.....	20
1.3 Induzierende Signalwege von PPR bis zur olfaktorischen Plakode	20
1.3.1 Signale des Bone Morphogenetic Proteins (BMP).....	20
1.3.2 Signale des Fibroblast Growth Factors (FGF).....	22
1.3.3 Wnt-Signalweg.....	23
1.3.4. Interaktionen der Signalwege.....	23
1.4 ORN und ihre Einbettung ins olfaktorische Epithel	25
1.4.1 Olfaktorische Rezeptorneurone – spezifische definierende Faktoren	28
1.5 Zielstellung	29
2. Material	31
2.1. Ethikvotum	31
2.2. Zellkultur	31
2.2.1. Zelllinien	31
2.2.2 Medien	31
2.3 Chemikalien, Enzyme, Zusätze	36
2.4 Vektoren	38
2.5 Kits	39
2.6 Primer	39
2.7 Antikörper	39
2.8 Verbrauchsmaterialien	41
2.9 Geräte und Software	43
3. Methoden	44
3.1 Kultivierung von Keratinozyten	44
3.1.2 Reprogrammierung von Keratinozyten zu induziert pluripotenten Stammzellen	45
3.2 Kultivierung von hiPSZ	46
3.2.1 Charakterisierung von iPSZ	47
3.3 Olfaktorische Differenzierung	48
3.3.1 EB-Formation	48
3.3.2. Auswachsen der EBs in 2D Kultur	48
3.4 Charakterisierung olfaktorischer Rezeptorneurone	49
3.4.1 Proteinanalyse per Immunfluoreszenzfärbung	49
3.4.2 RNA-Analyse.....	50
4. Ergebnisse	54

4.1. Olfaktorische Differenzierung.....	54
4.1.1 <i>In vitro</i> Entwicklungsschritte.....	54
4.2 Vergleich der Differenzierungsprotokolle O-BWF8 und O-BWF8/TGF.....	55
4.2.1 Vergleich der Differenzierungsprotokolle O-BWF8 und O-BWF8/TGF.....	55
hinsichtlich der Generierung einer PPR.....	55
4.2.2 Vergleich der Differenzierungsprotokolle O-BWF8 und O-BWF8/TGF.....	61
hinsichtlich der Generierung einer OP.....	61
4.2.3 Vergleichende Analyse der Differenzierungsprotokolle O-BWF8 und O-BWF8/TGF	
hinsichtlich der Auszählung definierter Präparatausschnitte.....	66
4.2.4 Morphologischer Vergleich von O-BWF8 und O-BWF8/TGF	69
4.3 Analyse des Differenzierungsprotokolls O-BWF8 auf RNA-Ebene	72
4.3.4 Zusammenführende Analyse des Differenzierungsprotokolls O-BWF8 hinsichtlich der	
Generierung der PPR.....	75
4.3.5 Zusammenführende Analyse des Differenzierungsprotokolls O-BWF8 an Tag 25 und 30.....	75
4.4. Generierung olfaktorischer Rezeptorneurone	76
4.4.1 Analyse des Differenzierungsprotokolls O-BWF8/RA auf Proteinebene	76
4.4.2 Analyse der RNA-Expressionen des Differenzierungsprotokolls O-BWF8/RA im Verlauf...80	
4.4.4 Zusammenführende Analyse des Differenzierungsprotokolls O-BWF8/RA.....	83
5. Diskussion	84
5.1 Kulturverhältnisse	85
5.2 Wurden im Laufe der Differenzierung die richtigen Signalwege beachtet?	85
5.2.1 Stellen die Anpassungen hinsichtlich des TGF-Beta Signalwegs eine Verbesserung der	
Differenzierung in Protokoll O-BWF8/TGF im Vergleich zu O-BWF8 dar?	86
5.3 Ist eine Identifikation der Präplakodalen Region durch das	
Differenzierungsprotokoll O-BWF8 möglich?.....	88
5.3.1 Betrachtung von SIX und EYA hinsichtlich der Differenzierung der PPR	88
5.3.2 Betrachtung weiterer Markeranalysen hinsichtlich der Differenzierung der PPR.....	91
5.4 Ist eine Identifikation der olfaktorischen Plakode durch das	
Differenzierungsprotokoll O-BWF8 möglich?.....	93
5.4.1 Betrachtung von SIX und EYA hinsichtlich der Differenzierung plakodaler Zellen.....	93
5.4.2 Betrachtung weiterer Markeranalysen hinsichtlich der Differenzierung einer olfaktorischen	
Plakode	95
5.4.3 Betrachtung der Verlaufsanalysen der RNA-Expression hinsichtlich der Differenzierung einer	
olfaktorischen Plakode	96
5.5 Ist eine Identifikation olfaktorischer Rezeptorneurone durch das	
Differenzierungsprotokoll O-BWF8/RA möglich?	99
5.5.1 Wurden reife ORN generiert? – Analyse anhand von OMP, TUBB3 und NCAM2	99
5.5.2 Betrachtung der Signalkaskade <i>GOLF</i> und <i>TMEM16B</i> sowie der olfaktorischen Rezeptoren	
<i>ORIG1</i> und <i>OR1A1</i>	101
5.5.3 Betrachtung der Signalkaskaden der Vorläufermarker <i>ASCL1</i> , <i>NGN1</i> und <i>NEUROD1</i> sowie	
<i>EBF2</i> und <i>CALB2</i>	103
5.5.4 Tabellarische Übersicht aller verwendeten Marker.....	106
5.6 Fazit und Ausblick.....	108
Zusammenfassung.....	110
Summary	112
Literaturverzeichnis.....	114
Abbildungsverzeichnis.....	121
Tabellenverzeichnis	122

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name
%	Prozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ADCY3	Adenylyl
AFP	Alpha Fetoprotein
ASCL1	Achaete-scute homolog 1
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
ca.	Circa
Ca²⁺	Kalzium-Ionen
CALB2	Calbindin 2
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphat
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
Cl⁻	Chlorid-Ionen
CO₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DLX3/5	Distal Less Homeobox 3/5
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EB	Embryoid Bodies
et al.	Und andere
EtOH	Ethanol
EYA1/2	Eye absent homolog 1/2
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
FGF8	Fibroblast Growth Factor 8
FTDA	FGF2/TGFβ/Dorsomorphin/ActivinA
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBZ	Globose Basalzellen
GDNF	Glial Cell Derived Neurotrophic Factor
GnRH	Gonadotropin Releasing Factor

GOLF	Guanin-Nucleotide Binding Protein Subunit alpha olfactory type
h	Stunde
HBZ	Horizontale Basalzellen
HCl	Salzsäure
heSZ	Humane embryonale Stammzellen
hiPSZ	Humane induzierte pluripotente Stammzellen
<i>In vitro</i>	‘im Glas’
<i>In vivo</i>	‘im Lebendigen’
ITS	Insulin/Transferrin/Selenit
KLF4	Kruppel Like Factor 4
MEF	Mausembryo-Fibroblasten
min	Minuten
ml	Milliliter
MSX2	Msh homeobox 2
MYH6	Myosine Heavy Chain 6
n	Anzahl
NCAM2	Neural Cell Adhesion Molecule 2
O₂	Sauerstoff
OBP	Odorant Binding Protein
OCT4	Octamer Binding Transcription Factor 4
OE	Olfaktorisches Epithel
OMP	Olfaktorisches Marker Protein
OR	Olfaktorischer Rezeptor
OR1A1	Olfactory Receptor Family 1 Subfamily A Member 1
OR1G1	Olfactory Receptor Family 1 Subfamily G Member 1
ORN	Olfaktorische Rezeptorneurone
PAX6	Paired Box 6
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PPR	Präplakodale Region
qRT-PCR	Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction
RA	Retinsäure
REF	Rattenembryo-Fibroblasten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per Minute
SIX1/3/4	Sine oculis homeobox 1/3/4
SOX2/9/10	Sex Determining Region Y-Box 2/9/10
SSEA4	Stage-Specific Embryonic Antigen 4
TGF-β1	Transforming Growth Factor Beta 1
TMEM16B	Transmembrane Protein 16B
TUBB3	Beta 3 Tubulin
UCHL1	Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Der Geruchssinn ist mit dem Geschmacksinn der phylogenetisch älteste Sinn, aber auch der am wenigsten erforschte Sinn der Biologie [1]. Das olfaktorische System wird erst seit wenigen Jahren eingehender analysiert und verstanden, was vor allem daran liegt, dass das optische und das auditive System im menschlichen Leben einen höheren Stellenwert haben.

Nichtsdestotrotz geht man gegenwärtig davon aus, dass ca. 5 % der Bevölkerung an einer Anosmie (Verlust des Riechsinn) leiden, eine häufig unterschätzte, deutliche Einschränkung im alltäglichen Leben, die keinen Bezug zu chronisch nasalen Entzündungen aufweist [2, 3]. Riechstörungen nehmen vor allem im Alter zu, ab 65 Jahren ist circa ein Viertel der Bevölkerung – meist unbewusst – „riechschwach“. Bei 80-Jährigen zeigt sich sogar eine Inzidenz von Riechstörungen von 50 %. [4] Dabei legen Studien dar, dass, von den an objektiven Riechstörungen leidenden Patienten, bis zu 74 % diese selbst nicht bemerken [2]. Außerdem sind Riechstörungen Frühsymptome neurodegenerativer Erkrankungen wie z.B. Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer. Hinsichtlich dieser Erkrankungen wird in Zukunft eine frühe Diagnose von Vorteil und von Bedeutung für die Prognose sein [5].

Die weitere Analyse und ein tiefergehendes Verständnis des Geruchssinns sind nicht nur hinsichtlich der Funktionalität und chemischen sowie physiologischen Abläufe, sondern vor allem auch hinsichtlich der Entwicklung notwendig, um Riechstörungen adäquat einordnen und therapieren zu können.

1.1 Funktionalität des Geruchssinns

Im Folgenden wird die Funktionalität des Geruchssinns kurz beleuchtet.

Beim Menschen ist der Geruchssinn von besonderer Bedeutung, beispielsweise für die Erkennung von Gefahren, der interpersonellen Kommunikation oder der Nahrungsaufnahme, bzw. Nahrungsinterpretation.

Der Geruchssinn ist wie der auditive und optische Sinn ein Fernsinn, er dient unter anderem der Ortung von Nahrung, Territorien und Feinden sowie der Erkennung chemischer Signale von Artgenossen (Pheromone, chemische Kommunikation, Gruppenduft, chemische Ökologie) [6]. Der Geruchssinn ist eng verbunden mit dem Geschmackempfinden.

Das Geschmacksempfinden beschränkt sich auf der Zunge auf salzig, süß, sauer, bitter und umami. Nur mit Hilfe des Geruchssinns kann ein verfeinerter Geschmack wahrgenommen werden. Die bei Anosmikern erschwerte Beurteilung der Nahrung mindert den Genuss des Essens und beeinflusst damit die Lebensqualität erheblich [2] Zusätzlich ist ein Belohnungsgefühl durch gutes Essen oder Trinken eingeschränkt. Die bei Anosmie-Patienten fehlende Warnfunktion kann auch dazu führen, dass verschimmelte oder vergorene Speisen eingenommen werden und Lebensmittelvergiftungen auftreten. [7] Die genaue Rolle der olfaktorischen Eindrücke bei der Regulierung des Appetits benötigt noch weiterer Erforschung [8].

Hinsichtlich der interpersonellen Kommunikation, der chemischen Signale zwischen Artgenossen und dem Aufbau von Erinnerungen spielen wohl vor allem die Verschaltungen vom Bulbus olfactorius zu Amygdala, piriformem und entorhinalem Cortex, die zu affektiven Begleitreaktionen führen, eine große Rolle. [9] So verbinden wir nicht nur bestimmte Gerüche mit Angst oder Ekel, wie zum Beispiel Feuerrauch, anbrennendes Essen, Gase oder Erbrochenes, sondern viele Gerüche auch mit angenehmen Empfindungen. Diese Lerneffekte sind unter anderem auch für die emotionale Entwicklung von großer Bedeutung. Ebenso wird unser Sexualverhalten unbewusst von Duftstoffen, insbesondere von Pheromonen, beeinflusst. Besonders beeindruckend ist die Zeitspanne von Jahrzehnten, die durch einen Geruch überwunden werden kann, der mit emotionalen Erinnerungen verknüpft ist. So sind viele unserer Kindheitserinnerung weniger stark visuell oder auditiv als olfaktorisch abgespeichert. [8] Die wiederum fehlende Wahrnehmung von Körpergerüchen bei Anosmie-Patienten verursacht eine verstärkte Unsicherheit in Partnerschaften und im Umgang mit Kindern. Nicht nur, dass unangenehme Gerüche wie Schweiß oder Urin und Stuhl bei einem selbst nicht wahrgenommen werden, auch der fehlende Geruch bei anderen erschwert Bindungen und Erinnerungsverknüpfungen. [7] Hinsichtlich psychologischer Abläufe führt der mangelnde Riechsinn sowohl zu einer Einschränkung der Lebensqualität als auch zu andauernden Unsicherheiten im Alltag. Die psychischen Folgen können von Depressionen, über Angststörungen vor unangenehmen Eigengeruch bis hin zu Verhaltensstörungen reichen [3, 10, 11].

1.1.1 Überblick über Riechstörungen, Therapie und Prognose

Ursächlich für eine Riechstörung oder eine komplette Anosmie können unterschiedliche Konstellationen sein. Traumata, virale Infektionen, Rhinosinusitis oder Polyposis nasi sowie neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson und Morbus Alzheimer sind die häufigsten Ursachen für Riechstörungen [3]. Eine angeborene Anosmie wird einerseits im Rahmen des Kallmann-Syndroms (Olfaktogenitales Syndrom) beschrieben, welches sich durch Anosmie und Hypogonadismus auszeichnet [12-14]. Andererseits wird in der Literatur eine isolierte angeborene Anosmie beschrieben [15]. Hier ist anzufügen, dass höchstwahrscheinlich aufgrund des bislang niedrigen Stellenwerts des Geruchssinns bei vielen Erkrankungen nicht überprüft ist, ob und inwiefern der Riechsinn beeinflusst ist. Obwohl bekannt ist, dass olfaktorische Neurone die Fähigkeit zur Regeneration besitzen [16], ist es noch nicht möglich, die individuelle Besserungstendenz olfaktorischer Störungen vorherzusagen. Bisher bieten sich nur für sinunasal bedingte Riechstörungen Therapieansätze mithilfe von Antibiotika, Steroiden oder chirurgischen Eingriff an. Sowohl bei durch Traumata bedingten als auch bei postviralen Riechstörungen konnte bislang keine Behandlungsoption etabliert werden. [4]

1.1.2 Bezug zur Differenzierung von olfaktorischen Rezeptorneuronen *in vitro* aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen

Ein Ziel dieser Dissertation ist die Differenzierung von olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) *in vitro* auf Grundlage von humanen induziert pluripotenten Stammzellen (hiPSZ). Dabei werden verschiedene Stufen in der Entwicklung der ORN untersucht. Einerseits dient diese Grundlagenforschung der Analyse der Entwicklung des bisher unzureichend erforschten olfaktorischen Systems, welches durch seine Fähigkeit zur Regenerierung und durch die direkte Verbindung der primären Sinnesneurone zur Außenwelt als neurales System besonderes Interesse verdient. Andererseits werden hiPSZ in Zukunft die Möglichkeit klinischer Anwendung auch im Bereich der Olfaktion bieten. Vor der Entwicklung von hiPSZ durch Takahashi und Yamanaka [17] war die Forschung an Stammzellen auf die Arbeit mit humanen embryonalen Stammzellen (heSZ) beschränkt. Die (h)iPSZ-Technik ermöglicht es, somatische adulte Zellen mit Hilfe von bestimmten Transkriptionsfaktoren, meist Klf4, Myc, Oct4 und Sox2, zu pluripotenten Stammzellen

zu reprogrammieren [17]. In den meisten Laboren wurde hier die lentivirale Transduktion verwendet. Eine der größten Problematiken bei dieser Art der Reprogrammierung ist das Verbleiben der transduzierten Faktoren in der DNA der resultierenden Stammzelle, weshalb weiter an einer Verbesserung der Methode gearbeitet wird. Ein Ansatz ist hierbei die Reprogrammierung mit dem Sendai-Virus, welcher nicht in das Genom integriert wird und hierdurch geringere Gefahren einer Alternierung des Genoms birgt [18]. Weiterhin zur Diskussion steht, inwieweit hiPSZ von heSZ zu unterscheiden sind, und welche Limitierungen der Arbeit mit hiPSZ gesetzt sind. HiPSZ bieten den Vorteil – im Gegensatz zu heSZ – keine ethischen Kontroversen auszulösen und gleichzeitig enorme klinische Möglichkeiten zu bieten, z.B. zur Analyse von Erbkrankheiten oder personenspezifischen Medikamenteneinflüssen. [19] Außerdem bieten sie unbegrenzte Zellbestände und inzwischen auch erfolgsversprechende Analysen im Hinblick auf die Differenzierung von adulten Zelltypen [20]. Aus heSZ und hiPSZ wurden bereits erfolgreich Zellen der Trigemini-, der Ohr- und der Linsenplakode differenziert [21-23]. In dieser Arbeit wurde aus oben genannten Gründen mit hiPSZ gearbeitet.

Langfristig gesehen könnte eine adäquate Differenzierung von ORN auch dazu dienen, Menschen, die unter dem Verlust von olfaktorischen Nerven, Riechstörungen oder angeborener Anosmie leiden, durch Implantation von differenzierten Stammzellen eine Therapieoption zu bieten. Allemal bietet die Differenzierung aus hiPSZ aber die Option, die Entwicklung ORN eingehender zu untersuchen und die vergleichsweise seltenen Analysen des olfaktorischen Systems im Menschen zu vervollständigen.

1.2. Embryonale Entwicklung im Hinblick auf das olfaktorische System

Nach Einnisten der Blastozyste in die Gebärmutterschleimhaut unterteilt sich der Keim in Embryoblast und Trophoblast. Der Trophoblast ist vor allem an der Ausbildung des pränatalen Versorgungssystems beteiligt. Der Embryoblast differenziert sich weiter in Epiblast und Hypoblast; die zweiblättrige Keimscheibe entsteht. An den Epiblasten grenzt die Amnionhöhle, welche im Verlauf den Embryo beherbergt. An den Hypoblasten grenzt der Dottersack, welcher im Verlauf Stoffwechselfunktionen besitzt und Stammzellen für die Hämatopoese bereitstellt (Abb. 1).

Im Rahmen der Gastrulation findet in der dritten und vierten Woche die Entwicklung des Epiblasten in drei Keimblätter statt. Zwischen Epi- und Hypoblast wandern Zellen des Epiblasten ein, die sich zum intraembryonalen Mesoderm entwickeln. Weiterwachsende Zellen des Epiblasten verdrängen die Hypoblastenzellen und entwickeln sich zum Endoderm. Der ursprüngliche Epiblast differenziert zum Ektoderm (Abb. 1), welches sich dann weiter in neurales und epidermales Ektoderm unterteilt. Unter anderem wird auch die mesodermale Herzanlage in diesen zwei Wochen ausgebildet. Parallel zur dreiblättrigen Keimscheibe entsteht die Chorda dorsalis aus dem Chordafortsatz als schlauchförmige Einstülpung zentral zwischen Ektoderm und Endoderm. Anschließend vollzieht sich die Neurulation, wobei sich die neuralen Zellen des Ektoderms, die zentral lokalisiert und als Neuralplatte bezeichnet werden, absenken und die Platte zur Rinne wird. An den Längsseiten der Neuralrinne entwickeln sich die Neuralfalten und durch das Aufeinanderzuwachsen der Neuralfalten entsteht das Neuralrohr, welches sich zum Zentralnervensystem entwickelt. Oberhalb der Verschmelzung der Falten entsteht das Oberflächenektoderm, das an die Amnionhöhle grenzt und sich später zur Epidermis des Rückens entwickelt. [Embryologie Lehrbuch] Einige neurale Zellen, die sich während des Prozesses der Verschmelzung der Falten ablösen, lagern sich in einer Region zwischen Neuralrohr und Oberflächenektoderm ab. [24] Aus dieser sogenannten neuralen Grenzregion entwickelt sich neben der Neuralleiste auch die präplakodale Region (PPR), aus welcher sich unter anderem die gesuchten ORN entwickeln. (Abb. 2) [25].

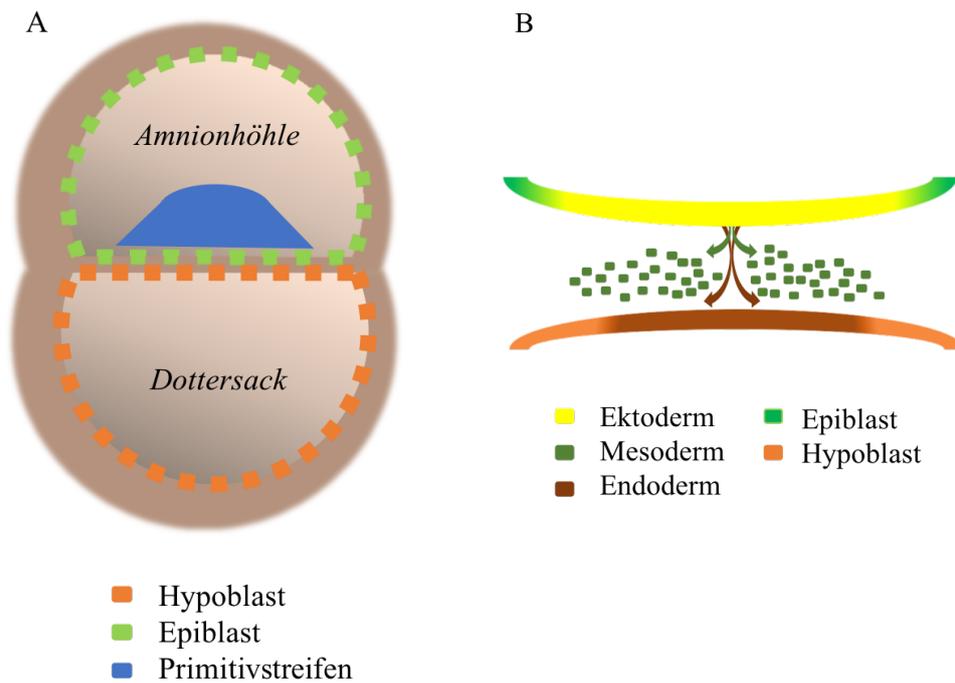


Abbildung 1: Schematische Darstellung der zweiblättrigen Keimscheibe und der Gastrulation

In A schematisch dargestellt ist das Stadium der zweiblättrigen Keimscheibe mit Epiblast und Hypoblast, entstanden aus dem Embryoblasten, sowie dem Primitivstreifen. Gekennzeichnet sind zusätzlich die Amnionhöhle sowie der Dottersack. In B schematisch dargestellt ist die Gastrulation mit Entstehung der dreiblättrigen Keimscheibe. Gezeigt wird das Einwandern von Epiblastzellen in den Zwischenraum von Epi- und Hypoblast (späteres Mesoderm) und weiter in den Hypoblasten (späteres Endoderm), sowie die Differenzierung des Epiblasten zu Ektoderm.

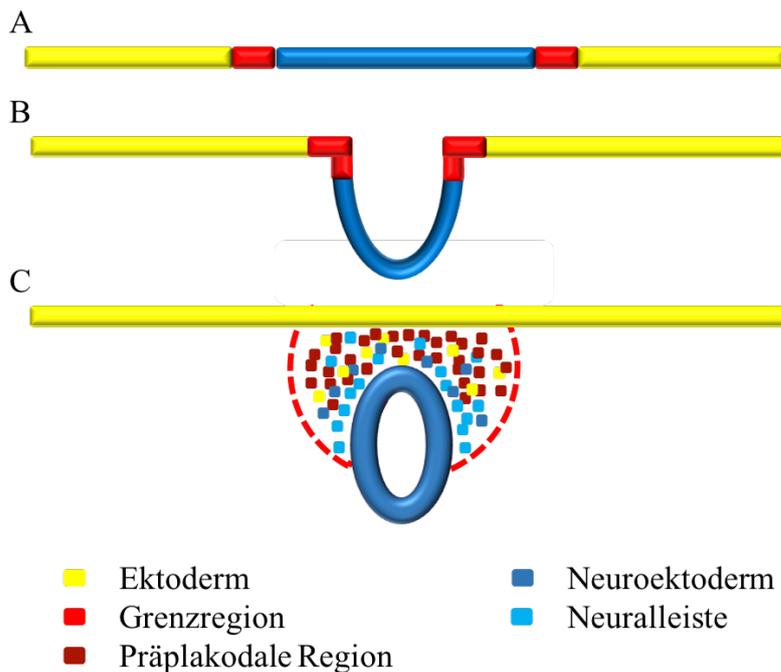


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Neurulation mit Entstehung der Grenzregion
 Dargestellt ist in A die Unterteilung des Ektoderms in Neuroektoderm (Neuralplatte), Grenzregion und Oberflächenektoderm. In B ist die Absenkung der Neuralplatte zur Neuralrinne dargestellt. In Schema C wird das Neuralrohr mit rostral gelegener Grenzregion, bestehend aus eingestreuten neuronalen, ektodermalen und präplakodalen Zellen, sowie Zellen der Neuralleiste ersichtlich.

1.2.1 Die Präplakodale Region

Alle spezialisierten sensorischen Organe im Kopf der Wirbeltiere entstehen aus Verdickungen des embryonalen, kranialen Ektoderms, welche kraniale sensorische Plakoden genannt werden [13, 26]. Diese Plakoden entstehen anterior und lateral zur Neuralleiste aus der PPR [21, 27]. Im menschlichen Embryo sind die ektodermalen Verdickungen im Somitenstadium 4-20 zu erkennen und enthalten alle sensorischen Plakoden [13]. Die Induzierung der PPR ist ein multimodaler Prozess, der viele verschiedene Signale von unterschiedlichen Geweben miteinbezieht [13].

Im Laufe der Gastrulation differenziert sich, wie oben beschrieben, die ektodermale Keimscheibe, induziert durch Signale umliegender Gewebe, in prä-neurales und nicht-neurales Ektoderm, dabei ist die Aufteilung nicht strukturiert, sondern weitgehend überlappend [24, 28]. Neurale Marker wie *Sox2/3* [29], *ERNI*, *Geminin* und *SoxD* sind in dieser Region durchmischt mit nicht-neuralen Markern wie *Dlx3-5*, *GATA2/3*, *FoxI3*, *Bmp4* und *Msx1* [28].

Die durch die Ausstreuung einzelner Neuralplattenzellen gebildete neurale Grenzregion zwischen der Neuralplatte und den darüber liegenden epidermalen Zellen [28] ist Ursprung der PPR und der Neuralleiste [24, 30].

Dabei scheinen sich Neuralleistenzellen in Experimenten im Krallenfrosch (*Xenopus*) aus den ausgestreuten neuronalen Zellen der Neuralplatte und präplakodale Zellen aus dem dazwischenliegenden nicht-neuronalen Ektoderm zu entwickeln [32]. Spezifische Neuralleistenmarker sind *FoxD3* und *Sox9/10* und im Verlauf *Msx1* [30, 32]. Präplakodale Marker können vor allem um die Grenzen der eingestreuten Neuralplattenzellen herum detektiert werden [24] und lokalisieren sich im Verlauf hufeisenförmig um die rostrale neurale Platte, bzw. das Neuralrohr [31].

Im *Xenopus* wird diese hufeisenförmige Region unter anderem definiert durch die Expression von den PPR-Markern *Six1* und *Six4*, *Eya1* und *Eya2*, *Dlx3* und *Dlx5*, *Sox2*, *Sox3* und *Msx1* [31, 33, 34]. *Sox2* und *Sox3* werden aber auch in der Neuralplatte exprimiert sowie *Dlx3* und *Dlx5* auch in der Epidermis exprimiert werden [31] (Abb. 4). Aus der Neuralleiste entwickeln sich sensorische Neurone, Gliazellen, pigmentierte Zellen sowie kranialer Knochen und Knorpel [32].

Erst im späten Neurulationsstadium, ab dem 4-5-Somitenstadium, mit dem Abschluss der Faltung der Neuralplatte, sind Neuralleistenzellen und präplakodale Zellen molekular und zellulär abgrenzbarer von anderen ektodermalen Derivaten [28].

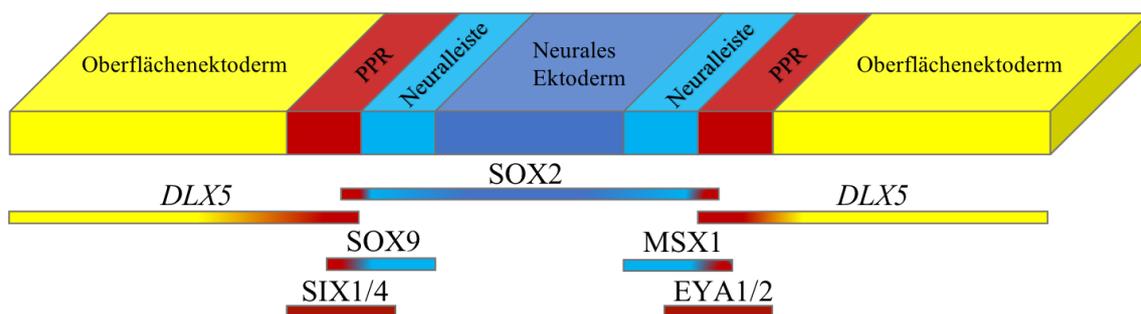


Abbildung 3: Schematische Übersicht der definierenden Faktoren im Stadium der Neurulation

Schematisch dargestellt das neurale Ektoderm (Neuralrohr), Oberflächenektoderm sowie PPR und Neuralleiste, Schema angelehnt an Moody et al. [30]. In dieser Arbeit verwendete und definierende Faktoren der PPR: *SIX1/4*, *EYA1/2*, *DLX3/5*, *SOX2*, *MSX1*; der Neuralleiste: *SOX9*, *MSX1*; des Neuralrohrs: *SOX2/3*; des Oberflächenektoderms *DLX3/5*; zu diesem frühen Stadium sind einige Faktoren noch nicht spezifisch und werden in mehreren Zelltypen exprimiert.

1.2.1.1 Vorstellung der Transkriptionsfaktoren bezüglich der Differenzierung und Weiterentwicklung der Grenzregion- *Msx*, *Dlx* und *Sox*

Msx und *Dlx* sind wichtige Faktoren bei der Differenzierung und Spezifizierung der Zellen der Grenzregion. *Msx1* ist einer der frühesten spezifischen Marker für die Grenzregion und wird direkt von BMP moduliert [28].

In Frosch-, Fisch- und Huhnarten wurden *Dlx3-5* als wichtige intrazelluläre Mediatoren für die Differenzierung der Grenzregion und die Positionierung der PPR ausgemacht [24, 28]. Dabei wird davon ausgegangen, dass die *Dlx*-Gene vor allem als Regulatoren eines BMP-Antagonisten der Grenzregion fungieren [24].

Dlx und *Msx* stehen zwar in engem Verhältnis zueinander, wirken aber oft gegensätzlich in überlappenden Gebieten und bestimmen hierdurch Gewebegrenzen- und Interaktionen. Eine Co-Expression von *Dlx* und *Msx* Genen dient mit großer Wahrscheinlichkeit dazu, ein Gleichgewicht zwischen Differenzierung, gefördert durch *Dlx*, und Proliferation, gefördert durch *Msx*, zu erreichen [33, 35]. In Knock-down Experimenten im Zebrafisch (*Danio Rerio*) und im *Xenopus* wurde nachvollzogen, dass für die Differenzierung der PPR eine niedrige *Msx1*-Expression und eine hohe *Dlx*-Expression förderlich sind, während die Neuralleiste durch eine hohe *Msx1*-Expression und eine niedrige *Dlx*-Expression gefördert wird [28, 33]. *Msx1* bindet an die Enhancer des *Six1*-Gens der anterioren PPR-Region und unterdrückt dadurch die Expression des *Six1*-Gens, während *Dlx* durch eine Bindung die Expression des *Six1*-Gens fördert [24, 27, 36].

Wie bei der Betrachtung aller Expressionsdaten ist auch hier wichtig zu bemerken, dass vor allem die verschiedenen zusätzlichen Signaleinwirkungen die Effekte des jeweilig untersuchten Gens beeinflussen. So ist die Expression von *Six1* bei *Dlx3* Expression unter dem Einfluss von BMP und WNT-Antagonisten, sowie FGFs signifikant erhöht [32].

Sox2 und *Sox3* sind wie oben beschrieben nicht nur in präplakodalem Ektoderm, sondern auch in der Neuralplatte exprimiert [13, 24]. *Sox2* wird in neuralen Stammzellen und in frühen Vorläuferzellen exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von neuralen Zellen und deren Regenerierung. So ist *Sox2* auch im reifen olfaktorischen Epithel (OE) aufzufinden und scheint für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Stammzellzustands der Basalzellen verantwortlich zu sein. [37-39] Die Expression von *Sox2* persistiert im *Xenopus* im Laufe der Differenzierung nicht nur im Neuralrohr, sondern auch in den olfaktorischen [30] und adenohipophysären Plakoden. Nach

Schluss der Neuralfalte entsteht eine neue *Sox2*-positive Region im Bereich der zukünftigen Linsenplakode [31]. *Sox3*, zu Beginn noch co-exprimiert mit *Dlx3* beschränkt sich im Laufe der Differenzierung auf das (prä-) neurale Ektoderm [32]. *Sox9* und *Sox10* sind spezifische Gene, exprimiert in der Neuralleiste [32, 39, 40].

Der neuroektodermale Marker *Sox1* [41] spielt eine Rolle bei der Definierung der neuronalen Grenzzone. Im Verlauf spielt *Sox1* dann eine tragende Rolle bei der Entwicklung der Linsenplakode [42].

1.2.1.2 Vorstellung der Transkriptionsfaktoren bezüglich der Differenzierung und Weiterentwicklung der PPR – *Six*, *Eya* und *Pax*

Nur Mitglieder der *Six*- und *Eya*-Familien sind spezifische panplakodale Marker, im Genauen *Six1* und *Six4*, sowie *Eya1* und *Eya2* [31]. In der Larve des *Xenopus* sind dies die einzigen Gene, deren Expression in fast allen Plakoden, außer der Linsenplakode, bis ins späte Schwanzknospenstadium aufrechterhalten wird [31, 36, 43].

In Wirbeltieren wurden sechs *Six*- und 4 *Eya*-Gene identifiziert [28]. Das *Six1*-Protein, für welches das *Six1*-Gen codiert, ist ein Homeobox Protein, welches dem *Drosophila* „*sine oculis*“ Genprodukt ähnelt [44]. Der Transkriptionsfaktor *Six1* benötigt eine Interaktion mit einem Mitglied der *Eya*-Familie, um aktiv transkribieren zu können und besitzt für diese Interaktion eine N-terminale Bindungsstelle (SD), an die das *Eya*-Protein mit seiner C-terminalen Bindungsstelle (ED) andocken kann [24]. *Six*- und *Eya*-Expressionen lassen sich in späteren Entwicklungsstadien unter anderem auch in Muskeln, den Nieren und den Knospen der Gliedmaßen detektieren [30, 43].

Bei Erkrankungen mit Mutationen in *Six1*- oder *Eya1*-Genen (Branchio-Otogenes-Syndrom) liegt die Mutationsstelle entweder in SD oder in ED, also in der jeweiligen Bindungsstelle. Dies lässt vermuten, dass vor allem die fehlende Interaktion zu Defekten führt [24].

Im Huhn ist *Six4* während der Neurulation korrespondierend zur hufeisenförmig lokalisierten PPR exprimiert und im Anfangsstadium in allen Plakoden (außer der trigeminalen und hypophysealen) aufzufinden [13, 35].

Das *Eya*-Protein scheint anfänglich zytoplasmatisch lokalisiert zu sein und von *Six*-Proteinen in den Nukleus transloziert zu werden [45, 46]. *Six*- und *Eya*-Proteine sind oft co-

lokalisiert mit *Pax*-Proteinen, welche für die Differenzierung und Aufrechterhaltung der Plakoden von Bedeutung sind.

Pax-Gene sind nicht panplakodal lokalisiert und es wird angenommen, dass sie eine dementsprechende Rolle bei der späteren Differenzierung der PPR in Subdomänen spielen [24, 31]. Alle Plakoden exprimieren im Laufe ihrer Entwicklung ein oder mehrere Mitglieder der *Pax*-Familie. Dabei ist *Pax6* in der frühen Entwicklung definierend für die anteriore Plakodenregion, sowie einer der frühesten Marker der olfaktorischen Plakode. [13, 47].

Die genauen spezifischen Funktionen und Bedeutungen sowie das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren und Gene sind noch nicht vollständig erforscht und benötigen weiterer Aufklärung [24].

1.2.2 Weiterentwicklung und Unterteilung der Präplakodalen Region

Die gesamte PPR ist vorerst als Linse spezifiziert [24, 28, 48]. Um die Entwicklung anderer Plakoden zu ermöglichen, ist eine Suppression der Linsensignale notwendig, hierbei spielen unter anderem FGF8 und Signale der Neuralleistenzellen eine zentrale Rolle [28, 48].

Während der frühen Neurulation teilt sich die PPR in verschiedene Subregionen, vorläufig in eher anteriore und eher posteriore Regionen, auf [24, 30, 31]. Eher rostral bilden sich die Vorläufer der anterioren Region für die olfaktorischen, die phakale (Linsen-) und die adenohipophysäre Plakoden aus. Die Vorläufer der posterioren Region für die trigeminalen, epibranchialen, otischen und lateralen Plakoden entwickeln sich eher kaudal (Abb. 7). [49] So ist auch eine regional begrenzte Expression von Transkriptionsfaktoren nach der Induzierung des plakodalen Territoriums ersichtlich. Anterior lassen sich vor allem die Transkriptionsfaktoren *Otx2*, *Pax6* und *Six3* finden, während posterior vor allem *Gbx2*, *Pax8* und *Irx1/2/3* exprimiert werden. [24, 28, 31] Dabei wird angenommen, dass sich die Transkriptionsfaktoren durch antagonistische Effekte auf die Grenzformationen des Gewebes auswirken [49, 50]. So unterdrücken sich *Otx2* und *Gbx2* gegenseitig und stellen damit die Grenzen zwischen den zukünftigen Domänen auf [24]. Matsuo et al. zeigen, dass *Otx2* mutierte Mäuse deformiertes bis hin zu vollständig fehlendem Riechepithel aufweisen [51]. Im Huhn wurde gezeigt, dass auch *Pax6* mit *Pax2* bzw. *Pax3*, welches eher intermediär vorkommt, plakodale Territorien definiert. Die genauen

Mechanismen, mit welchen die verschiedenen *Pax*-Gene bei der Etablierung der unterschiedlichen Plakoden mitwirken, sind noch nicht vollständig verstanden, auch hier wird dem Zusammenspiel mit anderen Faktoren eine große Rolle beigemessen [24, 31, 49]. Auch *Six3* und *Irx3* wirken durch ihre antagonistischen Effekte, nicht nur in der PPR, sondern beispielsweise auch an der Grenze des Vorderhirns, später der Zona limitans intrathalamica entsprechend [28].

Im Anschluss an die posterior-anterior-Achsenteilung findet eine Entwicklung in kleinere Subdomänen statt, die sich sowohl morphologisch, als auch hinsichtlich der zu analysierenden Transkriptionsfaktoren voneinander unterscheiden [28]. Dabei rangiert die Spannweite der entstehenden Zellen von neurosekretorischen Zellen, über sensorische Neurone bis hin zu kranialen sensorischen Organen [52].

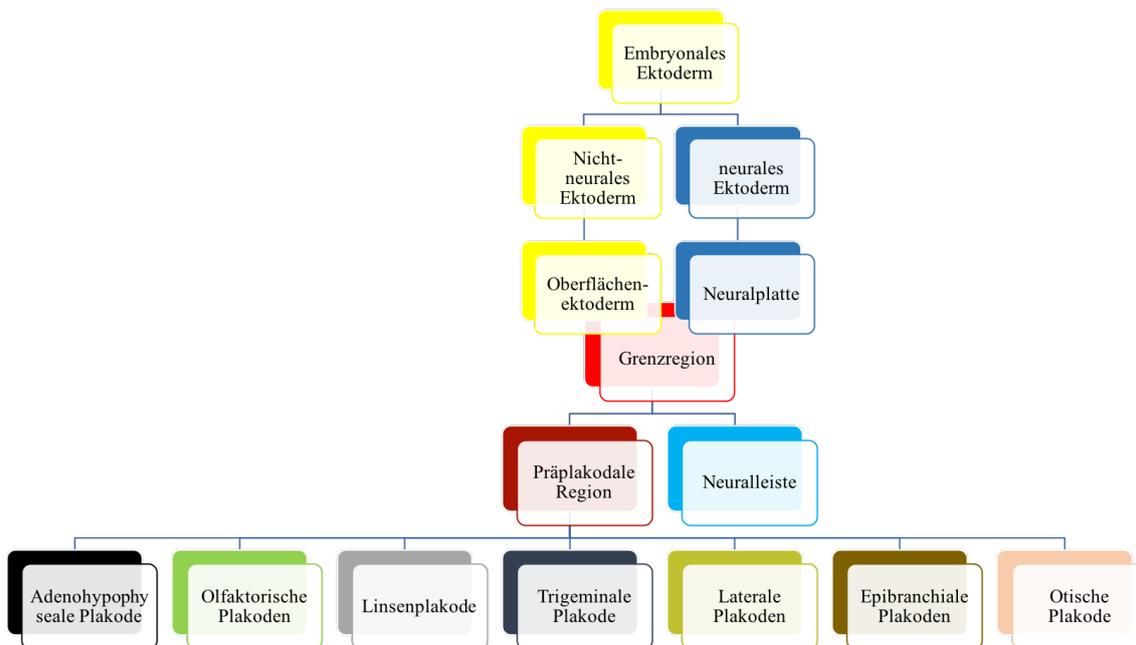


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Differenzierung der Plakoden

Schematisch dargestellt die Entstehung der Grenzregion aus nicht-neuralem und neuralem Ektoderm mit anschließender Unterteilung in Neuralleiste und PPR. Aufgezeigt ist die weitere Differenzierung der präplakodalen Region in die verschiedenen Plakoden.

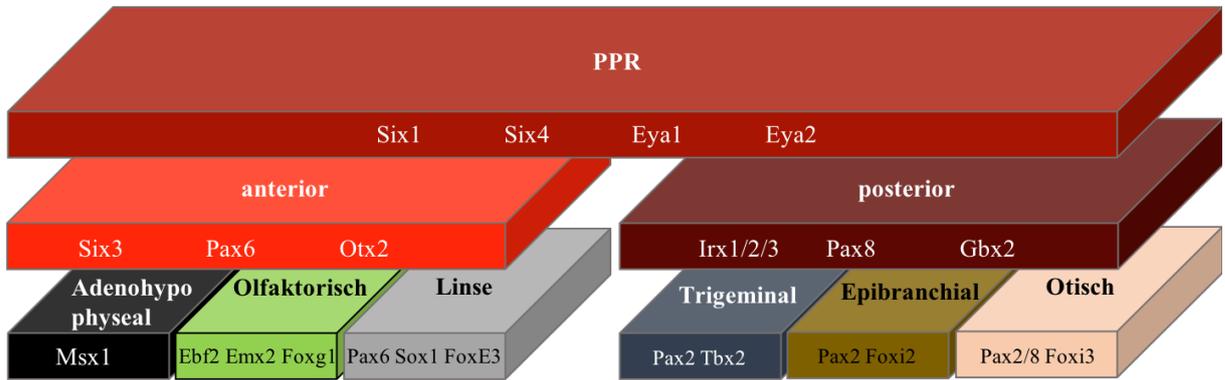


Abbildung 5: Schematische Übersicht der definierenden Faktoren von PPR zu Plakoden

Schematische Darstellung der Differenzierung der PPR in anteriore Regionen, definiert durch *Six3*, *Pax6* und *Otx2*, und posteriore Regionen, definiert durch *Irx1/2/3*, *Pax8* und *Gbx2*. Besonderes Augenmerk liegt auf der Entwicklung der olfaktorischen Plakoden mit den definierenden Faktoren *Ebf2*, *Emx2* und *Foxg1*. Schema angelehnt an Moody et al. [30]

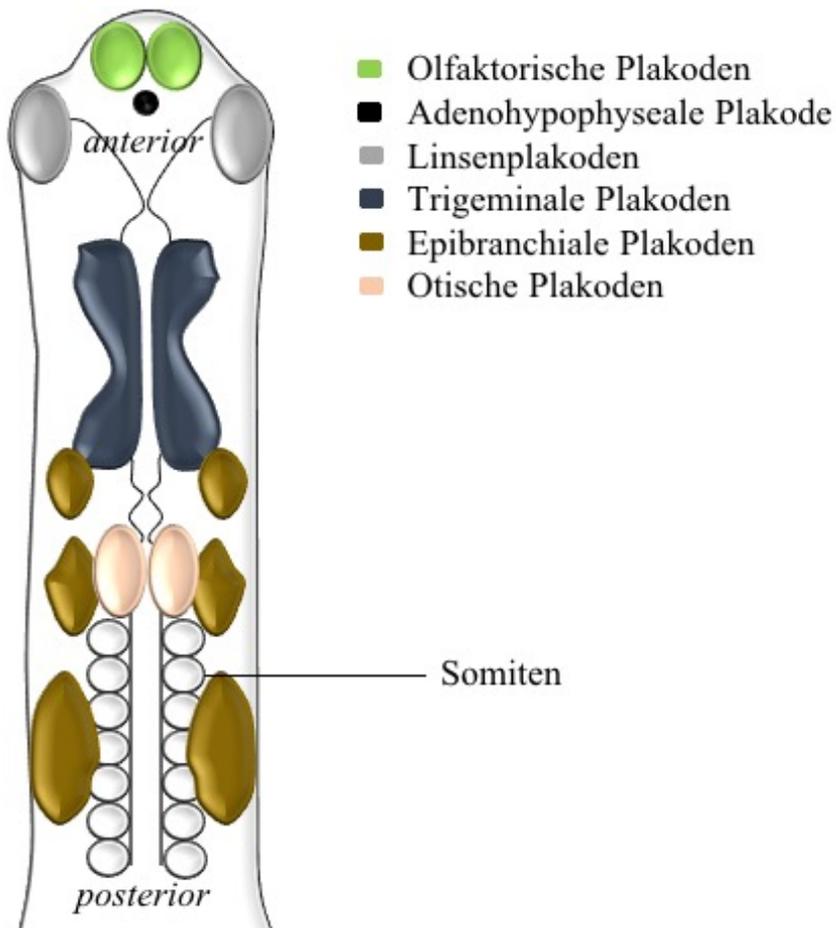


Abbildung 6: Schematische Übersicht der Lokalisation der Plakoden

Schematische Darstellung eines Embryos in anterior-posteriorer Achse mit Kenntnismachung der räumlichen Aufteilung der Plakoden. Besonders hervorzuheben die räumlichen Beziehungen von olfaktorischer und adenohypophysealer Plakode, sowie der Linsenplakode. Nicht dargestellt sind die lateralen Plakoden.

1.2.3 Die olfaktorischen Plakoden

Die olfaktorischen Plakoden (OP) entstehen lateral der adenohipophysealen Plakode und in räumlicher Nähe zu den Linsenplakoden. Aus ihnen entspringen neben Basalzellen und Stützzellen auch die primär sensorischen ORN, die sich in Richtung des Riechkolbens ausbilden. [52] Außerdem entwickeln sich aus der olfaktorischen Plakode neuroendokrine Zellen, GnRH sekretierende Neurone, die ins Prosencephalon einwandern [53]. Die enge embryologische Verbindung von Riechen und Reproduktion ist wiederum interessant hinsichtlich der psychologischen Aspekte des Riechens. Zusätzlich spielen die OP bei der Entwicklung des Riechkolbens und des restlichen Telencephalons eine Rolle. [54] Bezogen auf die zeitliche Komponente unterscheidet sich die Differenzierung olfaktorischer Zellen von Spezies zu Spezies. Im Axolotl ist die Differenzierung zu olfaktorischen Vorläuferzellen bereits ab dem 4-Somitenstadium ersichtlich, während sich OE im Huhn-Embryo erst im 23-Somitenstadium ausbildet. [13] Die OP erreichen im Huhn-Embryo erst im 26-Somitenstadium ihre typische morphologische Ausprägung und exprimieren dann die spezifischen Marker *Foxg1* und *Eya2* [48].

Ebf2 ist ebenfalls ein früher Marker für unreife olfaktorische Vorläuferneurone sowie reife ORN und wird in dieser Arbeit deshalb unter anderen als Marker für die OP verwendet [55, 56].

1.3 Induzierende Signalwege von PPR bis zur olfaktorischen Plakode

Von der Entstehung der PPR bis hin zur Entwicklung der OP wurden die gleichen Signalwege für die Induktion der Differenzierung als wesentlich erkannt. Im Folgenden wird auf die BMP-, FGF- und Wnt-Signale und ihre Bedeutung für die Differenzierung bis hin zu OP eingegangen.

1.3.1 Signale des Bone Morphogenetic Proteins (BMP)

BMP-Signale scheinen für die Ausbildung der PPR essentiell zu sein [21]. Sie können in zwei Zeiträume unterteilt werden. Während der Gastrulation wird ein verstärktes BMP-Signal benötigt, um die Ausbildung der Grenzregion und der PPR zu fördern [28]. Während der Neurulation und der Differenzierung der Zellen der Grenzregion initiiert ein niedrigeres BMP-Signal die Expansion von PPR-Genen [24, 36, 57]. So werden BMP-

Signale auch für die Expression von *Dlx*- und *Msx*-Genen in Froscharten, Huhn und Zebrafisch benötigt, sind aber allein nicht ausreichend, um die PPR zu induzieren [29, 33, 35]. Auch in heSZ konnte gezeigt werden, dass BMP-Signale einer zweiphasigen Einteilung unterliegen. Zur Förderung der Differenzierung der Grenzregion sind BMP Signale in der frühen Gastrulation vonnöten. Anti-BMP-Signale fördern dann bei bereits bestehender PPR die Differenzierung zu anterioren präplakodalen Vorläuferzellen [21, 57]. Nach der Ausbildung der Grenzregion mit Neuralleistenzellen und präplakodalen Zellen konzentriert sich BMP4 in den sich formierenden Neuralfalten der anliegenden Neuralplatte, in denen auch Wnt exprimiert wird [24, 29]. Gemeinsam fördern diese Signalwege (BMP+, Wnt+) die Ausbildung der Neuralleistenzellen. Das zukünftige Herzmesoderm wächst währenddessen Richtung anterior unter der Grenzregion ein [29]. Dieses Gewebe exprimiert FGF4, BMP- und Wnt- Antagonisten und induziert damit einerseits die weitere Ausbildung der präplakodalen Zellen und schützt diese andererseits vor störenden Faktoren an den lateralen, medialen und posterioren Grenzrändern. [28] Auch im Huhn-Embryo ist für diese Prozesse das unterliegende Mesoderm verantwortlich [24, 29]. Auch Analysen im *Xenopus* zeigen auf, dass die PPR-Marker *Six1*, *Six4* und *Eya2* unter dem Einfluss von anti-BMP, FGF8 und anti-Wnt exprimiert werden [58]. Die Signale werden hier von der naheliegenden Neuralplatte, dem nicht-neuralen Ektoderm und dem naheliegenden Endomesoderm ausgesendet [29, 36, 58]. Im *Xenopus* werden bei hohen Konzentrationen von BMP vor allem epidermale Marker exprimiert, bei mittleren Konzentrationen vor allem Neuralleisten- und präplakodale Marker und bei niedrigen Konzentrationen Neuralplattenmarker [29]. Es wird angenommen, dass im intermediären Bereich niedrigere Dosierungen von BMP4 die PPR fördern, während höhere Dosierungen die Neuralleiste fördern [29, 31, 59]. Wahrscheinlich ist, dass weitere Mediatoren wie *Dlx*, *Msx* und *FoxI1* notwendig sind, um die präplakodale Genexpression zu induzieren. Im Verlauf führt im *Xenopus* eine längere Signalwirkung von BMP im Zusammenhang mit anderen Faktoren zur Ausbildung der phakalen Plakode, eine kurze Signalwirkung hingegen führt zur Ausbildung der OP [24, 60].

TGF-Beta ist ein weiterer wichtiger Signalweg, der mit dem BMP-Signalweg in Verbindung steht. Beide regulieren über zytoplasmatische Smad Moleküle Wachstum und Differenzierung von Zellen in vielen biologischen Systemen [61]. Die Kombination der

Inhibition beider Signalwege (BMP und TGF-Beta) wird duale SMAD-Inhibition genannt (dSMADi) [62]. TGF-Beta Signale werden in Neuralleistenzellen generiert [36]. In Differenzierungen auf Grundlage von hiPSZ/hePSZ induzieren Anti-TGF-Beta Signale in Verbindung mit BMP4 (-Antagonisten) die Differenzierung der PPR [22]. Im adulten olfaktorischen System inhibieren TGF-Beta Signale die neuronale Differenzierung [63].

1.3.2 Signale des Fibroblast Growth Factors (FGF)

FGFs zählen zu den Faktoren, die die Ausbildung der Grenzregion und die Differenzierung der PPR induzieren [24, 57, 64]. Sie werden im Kopfmesoderm und paraaxialen Stammesoderm exprimiert, das der Grenzregion unterliegt (im Huhn), oder im anterioren Ende der Neuralplatte (Xenopus) [28]. Im Xenopus und im Huhn kann fehlendes Mesoderm die Induktion der spezifischen PPR-Gene *Six* und *Eya* verhindern [65].

Für die Ausprägung von PPR-Genen ist neben FGF-Signalen zusätzlich, wie oben bereits erwähnt, die Reduktion von Wnt- und BMP-Signalen notwendig.

Besonders FGF8 spielt eine Rolle bei der Entwicklung der PPR [24]. Im Huhn wird FGF8 in der anterioren Neuralplatte [48] exprimiert und ein Knock-down von FGF8 hat einen umfangreichen Verlust von präplakodalen Markern zur Folge [58]. Auch im Huhn-Embryo induziert FGF8 die Expression von *Dlx5* und *Eya2*, präplakodalen Markern. Alleinige FGF8 Signale können jedoch keine *Six1* und *Six4* Expressionen hervorrufen [29].

FGFs, im besonderen FGF8, scheinen in Huhn-Embryos neben Signalen der umliegenden Neuralleistenzellen auch bei der Unterdrückung der frühen präplakodalen Linsensignale essentiell zu sein [22, 52] und gleichzeitig die Differenzierung zu olfaktorischen Vorläuferzellen zu induzieren [48]. Auch die umliegenden Neuralleistenzellen sind für die Unterdrückung der Linsensignale verantwortlich und ermöglichen damit eine weitere Differenzierung [48]. Im Xenopus fördert FGF8 bei Anwesenheit eines BMP4-Antagonisten die Expression von spezifischen olfaktorischen Plakodengenegen [24, 58].

Interessanterweise scheinen diese Bedingungen (FGF8+) spezifisch für die Differenzierung der OP zu sein, da spezifische Gene anderer Plakoden dabei nicht aktiviert werden. Bei verschiedenen Spezies scheinen durch verschiedene Kombinationen der FGF-Faktoren unterschiedliche Subdomänen induziert zu werden [24]. FGF8 scheint nicht nur bei der Differenzierung der OP, sondern auch bei der anschließenden Differenzierung zu ORN von Bedeutung zu sein [48]. FGFs sind somit in der weiteren olfaktorischen

Entwicklung auch von Bedeutung bei der Differenzierung von Globosen Basalzellen zu reifen ORN [66].

1.3.3 Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist für viele Vorgänge in der Embryologie, wie zum Beispiel bei der Ausbildung der Körperachse, von Bedeutung. In adulten Zellen ist er zumeist inaktiviert, kann aber in Tumorzellen aktiv sein.

In Bezug auf die Ausbildung der PPR vermindern verstärkte Wnt-Signale im *Xenopus* die Expression von präplakodalen Genen [28, 29]. Ein abgeschwächtes Signal fördert plakodale Vorläufer, ein starkes Signal fördert Neuralleistenzellen [28]. Damit übereinstimmende Ergebnisse lassen sich auch im Huhn finden. Im Huhn exprimieren auch die anteriore Neuralplatte und das unterhalb der PPR liegende Kopfmesoderm anti-Wnt-Signale, welche die Ausbildung der Neuralleiste eindämmen [24, 29].

Eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs im weiteren Verlauf der Entwicklung reduziert die Expression anteriorer Plakodengene und fördert die posteriore Plakode, spezifisch otische Gene [30]. Auch im Zebrafisch führt eine erhöhte Wnt-Aktivität zum Verlust der olfaktorischen und Linsen-Plakode, während die posterior befindliche trigeminale Plakode expandiert [24]. Diese Ergebnisse lassen rückschließen, dass die anterioren Plakoden durch ein vermindertes Wnt-Signal und die posterioren Plakoden durch ein verstärktes Wnt-Signal gefördert werden [24] (Abb. 9).

1.3.4. Interaktionen der Signalwege

Die Interpretationen der Signalwege sind hochgradig abhängig vom jeweiligen Kontext sowie der Entwicklungsstufe. Als induzierende Gewebe werden primär das umliegende Mesendoderm, aber als verstärkender Signalgeber auch die anteriore Neuralrinne/-platte eingestuft [13, 31, 48, 58]. Die örtliche Nähe von Vorläufern der Neuralleiste und den olfaktorischen Vorläufern lässt vermuten, dass auch die Neuralleiste einen Teil zu der Entwicklung des olfaktorischen Systems beiträgt [24].

Zusammenfassend fördern zum jetzigen Wissensstand ein kurzes BMP Signal, FGF- und anti-Wnt-Signale die Ausbildung der neuralen Grenzregion. Eine anschließende

Reduktion des BMP Signals auf ein niedriges intermediäres Level, sowie weitere FGF- und Anti-Wnt Signale fördern auf Kosten der Neuralleiste die Ausbildung der PPR. Besonders FGF8 unterstützt dabei die Differenzierung der PPR in Richtung der olfaktorischen Plakode (Abb. 8).

Eine zusätzliche Rolle spielt Retinsäure. Sie fördert in der frühen Differenzierung die Entwicklung der posterioren PPR. Im Verlauf ist sie jedoch auch an der Entwicklung der OP und des Riechkolbens beteiligt [67, 68]. Sie wird im frontonasalen Mesenchym generiert [24] und wird im Somitenstadium 21-29 auch von olfaktorischen Zellen selbst produziert [69].

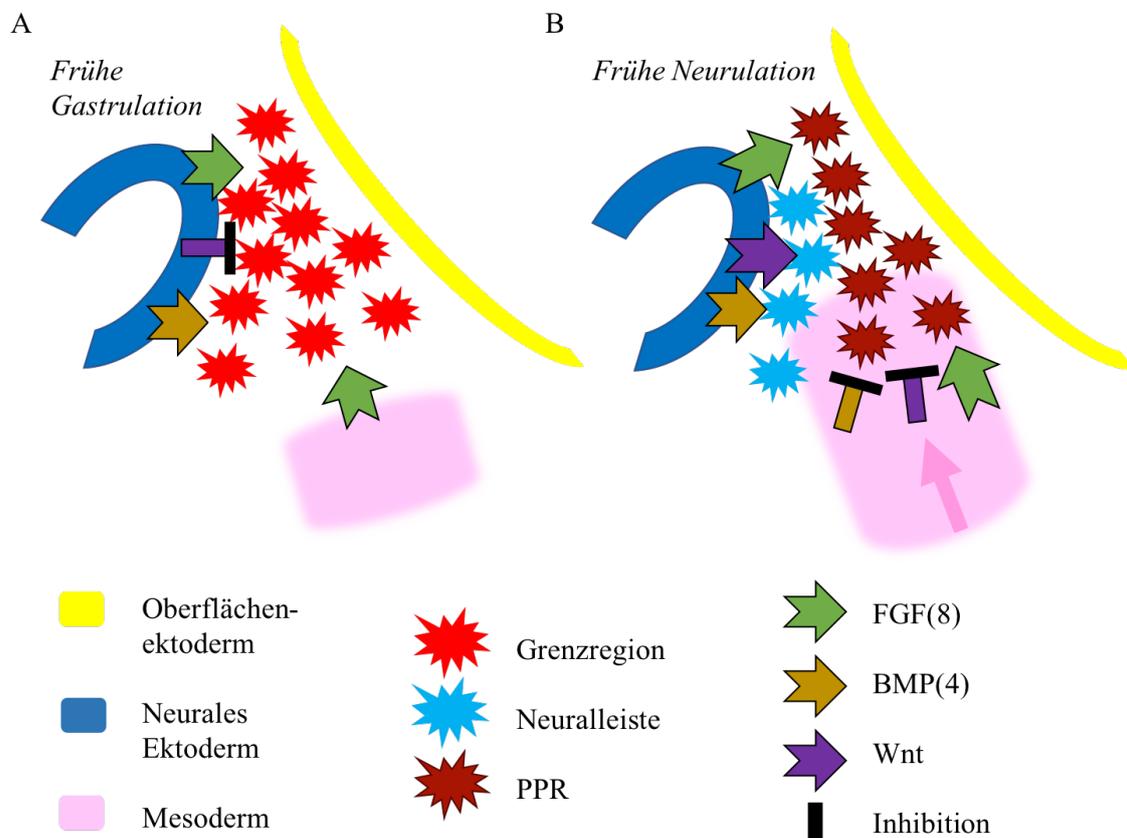


Abbildung 7: Signalwege in der frühen Gastrulation und der frühen Neurulation

Schematisch dargestellt in A ist das Stadium der Grenzregion. FGF, BMP4 und anti-Wnt-Signale fördern die Differenzierung der Grenzregion sowie die Ausbildung der PPR.

In B wird gezeigt, dass FGF-Signale sowie BMP4- und Wnt-Antagonisten, exprimiert v.a. von unterwachsendem Mesoderm, die Ausbildung der PPR fördern, während BMP4- und Wnt- Signale die Ausbildung der Neuralleiste fördern.

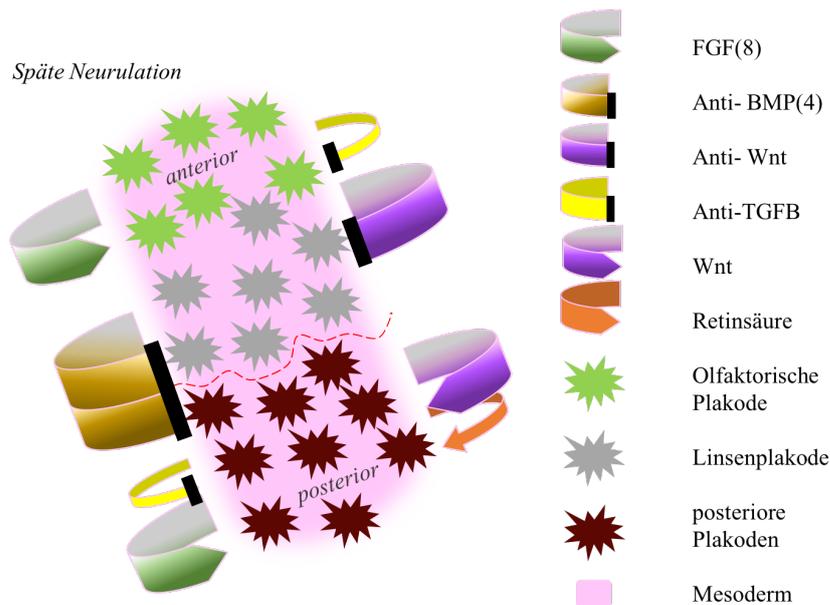


Abbildung 8: Signalwege der Achsenteilung der PPR

Schematisch dargestellt ist die Unterteilung der PPR in anteriore und posteriore Regionen. FGF, BMP4-, TGF-Beta- und Wnt-Antagonisten fördern die Differenzierung der anteriore PPR. Wnt-Signale und Retinsäure fördern die posteriore PPR.

1.4 ORN und ihre Einbettung ins olfaktorische Epithel

ORN entwickeln sich nicht aus dem Neuralrohr oder der Neuralleiste, sondern aus der OP. Sie sind bipolare Neurone, primäre Sinneszellen und stellen eine direkte Verbindung der Außenwelt (OE) zum Gehirn (Bulbus olfactorius) dar. Zusätzlich sind sie hinsichtlich ihrer Regenerationseigenschaften bislang einzigartig, da über die Basalzellen eine lebenslange Neurogenese stattfindet und die ORN somit einer lebenslangen Veränderung und Erneuerung unterliegen [16]. Sie erneuern sich alle 4-8 Wochen und regenerieren damit öfter nach Degeneration als die wenigen anderen bisher bekannten regenerationsfähigen Neurone [6, 70]. ORN werden deshalb auch als Modellvorlage herangezogen, um die Regeneration von Neuronen zu untersuchen.

In der OP entstehen neben ORN zahlreiche andere Neurone. Darunter auch GnRH-exprimierende Neurone, Neuropeptid Y-exprimierende Neurone und Calbindin-immunreaktive Neurone, die den olfaktorischen Nerv und sein Wachstum Richtung Bulbus olfactorius als Leitstruktur für ihre Migration nutzen [53, 71].

Die olfaktorische Region in der Nase lässt sich in OE und Lamina propria unterteilen. Das Riechepithel zeigt sich als ca. 2-3 cm großes Areal am hinteren Nasendach (Regio

olfactoria). Es enthält ca. 10-12 Mio. Sinneszellen. Da beispielsweise Hunde weitaus mehr Sinneszellen besitzen (bis zu 300 Millionen), werden Menschen als Mikrosmatiker bezeichnet [6]. Erst seit der 2004 mit dem Nobelpreis gewürdigten Arbeit von Richard Axel und Linda B. Buck ist bekannt, dass rund 3 % der menschlichen Gene die Funktion des Geruchssinns beeinflussen [72]. Dank ihrer Arbeiten hat sich das Verständnis für die Organisation des olfaktorischen Systems sowie die Funktion olfaktorischer Rezeptoren vertieft [73].

Anatomisch gesehen ist die Riechregion nur durch die Lamina cribrosa vom Gehirn getrennt. Das OE setzt sich aus ORN, Stützzellen und Basalzellen zusammen.

Die Stützzellen durchqueren das OE über die gesamte Dicke, stützen und isolieren benachbarte ORN und dienen damit auch als Diffusionsbarriere. Gemeinsam mit den Bowman-Drüsen produzieren sie Riechschleim. Sie besitzen einen Saum aus Mikrovilli [74]. In der Lamina propria befinden sich die Bowman-Drüsen, welche den Riechschleim sezernieren, der als oberste Schicht das OE bedeckt [70].

Die Basalzellen lassen sich in Globöse Basalzellen (GBZ) und Horizontale Basalzellen (HBZ) unterteilen. Die HBZ sind ganz basal im OE direkt auf der Basalmembran lokalisiert, während GBZ in der Schicht über den HBZ zu finden sind [63]. GBZ sind multipotente, aktiv proliferierende Vorläuferzellen und exprimieren neurale Differenzierungsmarker. HBZ exprimieren keine neuronalen Differenzierungsmarker und sind im intakten Epithel inaktive Vorläuferzellen. Sie können sich aber bei extremen Schädigungen des OE aktivieren und wie die GBZ sowohl neurale als auch nicht neurale Zellen des OEs regenerieren [16, 75].

Die Zellkörper der ORN liegen im OE. ORN sind morphologisch bipolare Neurone. Ihre apikalen dendritischen Fortsätze enden als feinste Kinozilien im Riechschleim, wo die ankommenden Duftstoffe gelöst, bzw. an „odorant binding proteins“ gebunden sind [16]. Die Duftstoffrezeptoren befinden sich in den Zellmembranen der Kinozilien, sie sind G-Protein gekoppelte Rezeptorproteine und binden Geruchsstoffe spezifisch [6]. Bis jetzt wurden etwa 360 verschiedene Duftrezeptor-Typen differenziert, mit denen wir ca. 10000 verschiedene Duftstoffmoleküle wahrnehmen können [6]. Ausgelöste Membranpotenziale werden über den Zellkörper in das Axon weitergegeben. Basal bündeln sich die Axone zu Fila olfactoria (Abb. 10). Auf jeder Nasenseite finden sich etwa 35 Fila, die von speziellen Gliazellen ummantelt sind, welche aus Neuralleistenzellen differenzieren und die

Axonregeneration anregen [6, 76]. Die zusammengefassten Fila bilden den Nervus olfactorius, der zum Bulbus olfactorius zieht. Im Bulbus olfactorius vereinigen sich Neurone mit gleicher Selektivität in Glomeruli. Dort findet die Verschaltung auf das zweite Neuron, die Mitralzellen oder Büschelzellen statt. Hierbei werden die Informationen stark reduziert und dann über die Projektionsneurone in verschiedene Hirnregionen weitergeleitet [6]. Projektionsziele sind hierbei die Amygdala, der präpiriforme Cortex mit Anschluss über den Thalamus an den orbitofrontalen Cortex, der enthorhinale Cortex mit Beziehung zum Hippocampus als weiterer Teil des limbischen Systems und der Gedächtnisbildung, das Tuberculum olfactorium sowie die Septumregion, auch mit Beziehung zum limbischen System und der Gedächtnisbildung [6, 77] [Anatomie Prometheus Kopf Hals].

Bipolarzellen kommen selten im Organismus vor und sind spezialisierte Sensorneurone. Neben der olfaktorischen Region wirken sie in der Retina als Vermittler zwischen Stäbchen, Zapfen und den Ganglienzellen [78]. Zusätzlich lassen sie sich im Ganglion cochleare der Gehörschnecke finden [25] und spielen eine Rolle beim Tasten, Schmecken und Gleichgewicht.

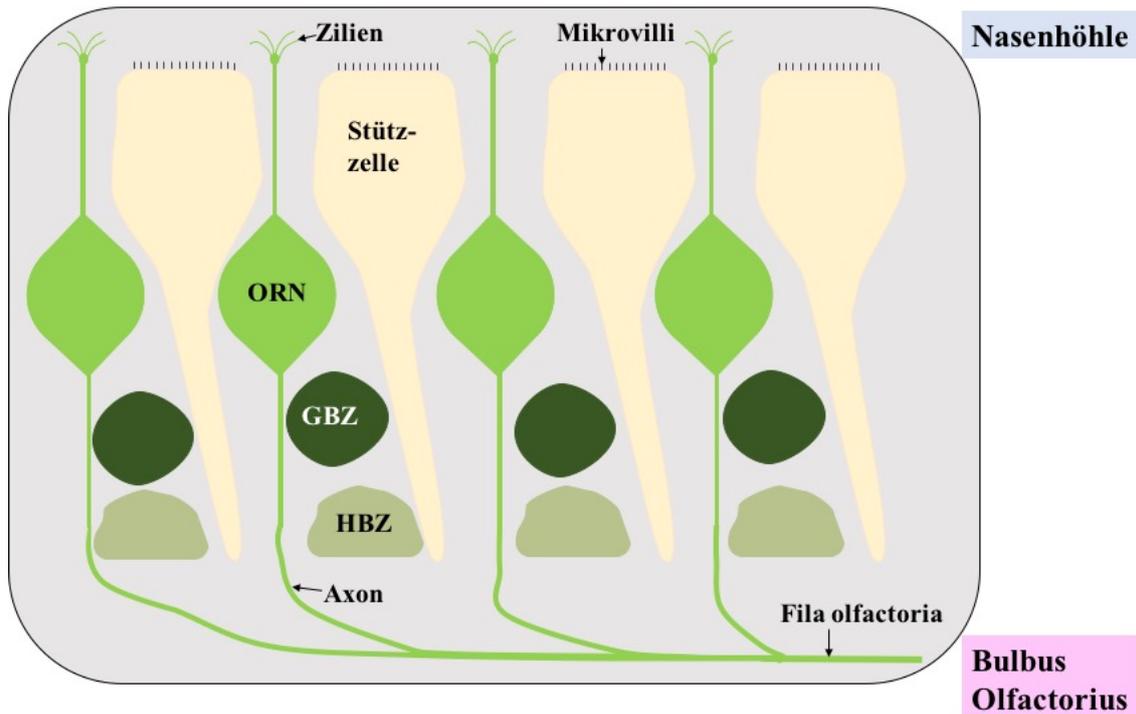


Abbildung 9: Schematische Darstellung des olfaktorischen Epithels

Schematisch dargestellt sind die basal liegenden Stammzellen, bestehend aus den unterliegenden HBZ sowie den GBZ, aus welchen die bipolaren ORN in 4-8-wöchigem Abstand regenerieren. Apikal gezeigt die Dendriten mit ziliaren Ausläufern, welche die olfaktorischen Rezeptoren enthalten, basal gezeigt, die sich zu Fila olfactoria zusammenschließenden Axone, welche durch die Lamina cribrosa zum Bulbus olfactorius ziehen. In stützender und isolierender Funktion grenzen die Stützzellen benachbarte ORN voneinander ab und sezernieren Riechschleim.

1.4.1 Olfaktorische Rezeptorneurone – spezifische definierende Faktoren

Reife ORN lassen sich anhand ihrer Expression von OMP (Olfactory Marker Protein) erkennen [79]. Das OMP zeigt seine höchsten Ausprägungen in reifen ORN [80]. Weiterhin erwähnenswert sind unter anderen auch die Faktoren der olfaktorischen Signalkaskade Golf, Tmem16B, OR1A1 und OR1G1, welche zur Überprüfung der Funktionalität der ORN analysiert werden können. Beispielsweise spielt Golf eine tragende Rolle in der Signalkaskade des Riechens und wird in den Zilien der ORN exprimiert [81]. Bindet ein Duftstoff an einen olfaktorischen Rezeptor, aktiviert sich die alpha- Untereinheit der Golf-Proteins und über ADCY3 wird das cAMP in der Zelle erhöht [81-83]. Membranständige Kanäle binden cAMP und ein Einstrom von Ca^{2+} Ionen findet statt. Daraufhin werden Chlorid-Kanäle wie z.B. TMEM16B eröffnet, die Cl^- aus der Zelle befördern [84]. Das generierte Aktionspotential wird über die Axone ins Gehirn weitergeleitet.

1.5 Zielstellung

Die Entwicklung des olfaktorischen Systems ist in ihrer Komplexität bis dato noch nicht vollständig verstanden. Diese Arbeit soll dazu beitragen, bisherige Erkenntnisse sowie neue Ansätze zu überprüfen.

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand der bisherigen Erkenntnisse Differenzierungsprotokolle zu analysieren, die die Entwicklung von olfaktorischen Rezeptorneuronen ermöglichen sollen. Dafür werden im ersten Schritt zwei Protokolle hinsichtlich der Entwicklung einer präplakodalen Region und einer olfaktorischen Plakode verglichen. Das Protokoll O-BWF8 bezieht die Signalwege BMP, WNT, FGF8 und TGF-Beta mit ein. Als vergleichende Differenzierung wird das Kombinationsprotokoll O-BWF8-TGFB mit zusätzlichem Fokus auf der Beeinflussung des TGF-Beta-Signalwegs herangezogen. Es wird untersucht, ob die Differenzierungen überhaupt dazu geeignet sind, Zellen der jeweiligen Entwicklungsschritte zu generieren. Dabei werden die Zellen an den Tagen 12-20 auf ihre präplakodale Entwicklung und an den Tagen 25-30 auf ihre plakodale Entwicklung hin untersucht.

Im zweiten Schritt wird im Langzeitversuch die Differenzierung nach neuronalem Protokoll (O-BWF8/RA) untersucht. Hierfür werden die Zellen an Tag 78, 100, 120 und 140 auf die Entwicklung olfaktorischer Rezeptorneurone hin charakterisiert. (Abb. 11)

Ziel der Arbeit ist es, zu zeigen, dass sowohl plakodale Zellen, als auch olfaktorische Rezeptorneurone in der Differenzierung aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen generiert werden können und gleichzeitig Ansätze für Verbesserungen des Differenzierungsprotokolls zu überprüfen, um in Zukunft eine noch spezifischere Induktion olfaktorischer Zellen ermöglichen zu können.

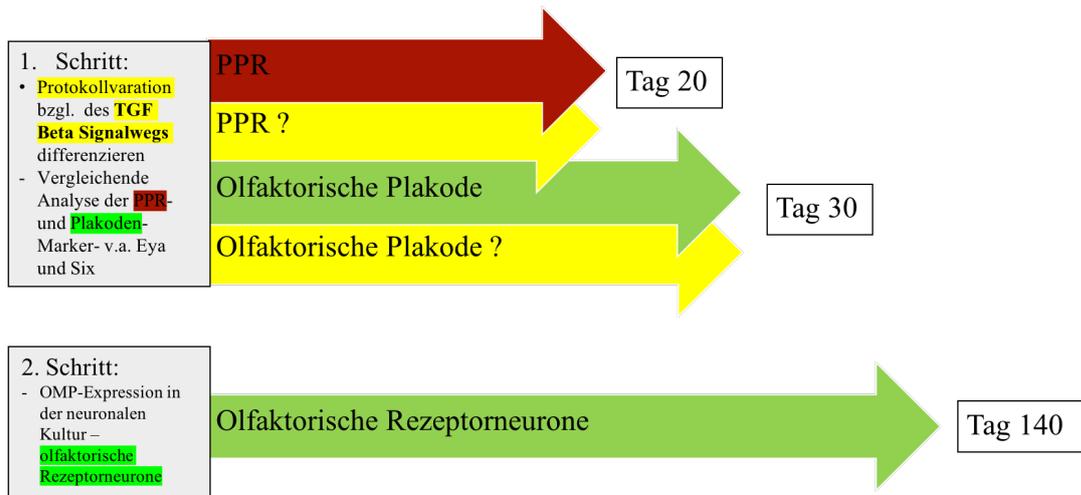


Abbildung 10: Übersicht der Arbeitsabschnitte

Im ersten Schritt werden zwei Protokolle, unterschieden durch eine Variation des TGF-Beta Signalwegs auf die Differenzierung von PPR und olfaktorischer Plakode hin verglichen., Im zweiten Schritt wird die Tauglichkeit eines Protokolls hinsichtlich der Differenzierung zu olfaktorischen Rezeptorneuronen geprüft.

2. Material

2.1. Ethikvotum

Für die Arbeitsgruppe Liebau gilt folgendes Aktenzeichen der Ethikkommission: 205/2020BO2.

2.2. Zellkultur

Die Arbeit in der Zellkultur fand unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Laborbank statt. Inkubiert wurde in einem 37 °C warmen Brutschrank in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 5 % O₂. Alle Medien, die bei erhöhten Temperaturen verwendet werden sollten, wurden in einem 37 °C warmen Wasserbad (autoklaviertes H₂O und Aquaguard (2 ml pro l H₂O)) aufgewärmt.

2.2.1. Zelllinien

In Tabelle 1 werden alle in der Zellkultur verwendeten Zelllinien aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Organismus	Verwendung
iPSZ K2	Reprogrammierte Keratinozyten der Kontrollperson 2	Mensch	Grundlage für die Differenzierung zu olfaktorischen Rezeptorneuronen
Keratinozyten K16	Kopfhaar der Kontrollperson 16	Mensch	Grundlage für die Reprogrammierung zu iPSZ
REF	Rattenembryo-Fibroblasten E14.5	Ratte	Ammenzellen

2.2.2 Medien

2.2.2.1. Grundmedien

In Tabelle 2 werden alle in der Zellkultur verwendeten Grundmedien aufgelistet.

Tabelle 2: Grundmedien

Grundmedium	Firma	Bestellnummer
DMEM/F-12, Gluta-MAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	31331-028
EpiLife®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	M-EPI-500-CA

Human Growth (HKGS)	Keratinocyte Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	S-001-5
Knockout™ DMEM		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	10829-018

2.2.2.1.1. Grundmedien für die Differenzierung

In Tabelle 3 werden die zusammengesetzten Grundmedien für die Differenzierungsprotokolle aufgelistet.

Tabelle 3: Grundmedien der Differenzierungsprotokolle

Name	Grundmedium	Zusatz	Konzentrationsverhältnis
hESC	hESC Embryonic Stem Cell Media	-Animal-Free Growth Factor Component -Antibiotikum-Antimykotikum -Blebbistatin - Y-27632 2HCl	- 1 % - 10 nM - 10 nM
5KO	DMEM/F-12, GlutaMAX™	- KnockOut™ Serum Replacement - Antibiotikum- Antimykotikum - MEM Non-Essential Amino Acids - β-Mercaptoethanol	- 5 % - 1 % - 1 % - 0,2 % (0,1 mM)
B27-A	DMEM/F-12, GlutaMAX™	- B-27® Supplement without Vitamin A - Antibiotikum- Antimykotikum - MEM Non-Essential Amino Acids - GlutaMAX™	- 2 % - 1 % - 1 % - 1 %
20KO	DMEM/F-12, GlutaMAX™	- KnockOut™ Serum Replacement - GlutaMAX™	- 20 % - 1 %
GM	DMEM/F-12, GlutaMAX™	- GlutaMAX™ - Antibiotikum- Antimykotikum	- 2 % - 1 %

2.2.2.2. Zusätze

In der Tabelle 4 werden alle in der Zellkultur verwendeten Zusätze zu Grundmedien aufgelistet.

Tabelle 4: Zusätze

Zusatz	Firma	Bestellnummer
(±)-Blebbistatin	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland	BN0640
Activin A	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	GFH6
Antibiotikum- Antimykotikum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	15240-062
B-27® Supplement <u>without Vitamin A</u>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	17504-044
BMP4	PeproTech, Hamburg, Deutschland	120-05ET
Brain-derived neurotrophic factor	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	GFH1
Chemisch definiertes Lipidkonzentrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	11905-031
Dibutyryl-cAMP	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland	BML-CN125
Dorsomorphin	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab120843
FGF2	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	GFH146
FGF8	PeproTech, Hamburg, Deutschland	100-25
GDNF	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	GFH2
GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	35050-038
Humanes Serumalbumin	Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel	05-720-1B
Human Keratinocyte Growth Supplement HKGS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	S-001-5
ITS Premix	Corning, Amsterdam, Niederlande	354350
KnockOut™ Serum Replacement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	10828-028

MEM Non-Essential Amino Acids	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	11140-050
Retinsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	R2625
SB431542	Selleckchem, München, Deutschland	S1076
β-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	31350-010
TGF-β1	PeproTech, Hamburg, Deutschland	100-21
Vitamin C	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3525.1

2.2.2.3. Zusammensetzung der Medien

In Tabelle 5 wird die Zusammensetzung der Medien dargestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Medien

Medium	Grundmedium	Zusätze
FTDA	DMEM/F-12, Gluta-MAX™	1 % Chemisch definierte Lipide 1 % Humanes Serumalbumin 1 % Antibiotikum- Antimykotikum 0,1 % ITS Premix 5 ng/ml Activin A 10 ng/ml FGF2 0,5 ng/ml TGF-β1 0,05 nM Dorsomorphin
Haare	DMEM/F-12, Gluta-MAX™	MEF cond. Med 10 μM Rock 50 μg/ml Vit C 10 ng/ml FGF2
Keratinocyten	EpiLife®	HKGS Rock 10 μM
EB Formation	Peprotech	1 % Antibiotikum- Antimykotikum 10 μM Rock 10 nM Blebbistatin
Differenzierung*	5KO 20KO B27-A GM	<u>Growth Factor Reduced Matrigel</u> 10 ng/ml BMP4 1 oder 10 μM SB431542 25 ng/ml FGF2 2 μM Dorsomorphin 2,8 μM IWR1e <u>FGF8</u>
Neurone	B27-A	1 % Antibiotikum- Antimykotikum

		2 % B-27 Supplement 50 µg/ml Vitamin C 10 ng/ml BDNF 10 ng/ml GDNF 500 nM cAMP
--	--	--

2.2.2.4 Zellkultivierung von in vitro generierten Olfaktorischen Rezeptorneuronen

Für die Differenzierung von olfaktorischen Rezeptorneuronen werden im ersten Schritt Embryonic Bodies aus hiPS geformt. Im ersten Schritt erfolgt eine 24h-stündige Inkubation in hESC-Medium. Die in den folgenden Tagen durchgeführte Differenzierung ist in tabellarischer Form zusammengefasst. In Tabelle 6 ist die Differenzierung von Protokoll O-BWF8, welches bis Tag 30 differenziert wurde, aufgezeigt.

Tabelle 6: Differenzierung Protokoll O-BWF8

Tag	Grundmedium	Zusatz	Endkonzentration	Kultivierung
1	5KO	GFRM		Suspension
2	5KO	BMP4 SB431542	10 ng/ml 1 µM	Suspension
4/5	5KO	FGF2 Dorsomorphin IWR1e	25 ng/ml 2 µM 2,8 µM	Ausplattiert auf Matrigel-KO DMEM
8	B27-A	FGF8	1:1000	Ausplattiert auf Matrigel-KO DMEM

In Tabelle 7 ist die Differenzierung des Protokolls O-BWF8/TGF, welches bis Tag 30 differenziert wurde, aufgezeigt.

Tabelle 7: Differenzierung Protokoll O-BWF8/TGF

Tag	Grundmedium	Zusatz	Endkonzentration	Kultivierung
1	100% 20KO	GFRM		Suspension
2	75% 20KO – 25% GM	BMP4 SB431542	10 ng/ml 1 µM	Suspension
4	50% 20KO – 50% GM	FGF2 Dorsomorphin IWR1e SB	25 ng/ml 2 µM 2,8 µM	Ausplattiert auf Matrigel-KO DMEM

6	25% 20KO 75% GM	FGF8 SB Dorsomorphin IWR1e	1:1000 2 μ M 2,8 μ M	Ausplattiert auf Matrigel-KO DMEM
----------	--------------------	-------------------------------------	--	---

In Tabelle 8 ist die Differenzierung von Protokoll O-BWF8/RA, welches bis Tag 140 differenziert wurde, aufgezeigt. Dabei wurden die differenzierten Zellen an Tag 4 auf Laminin/-Poly-L-Ornithine beschichteten Wells ausplattiert, um eine stabile langfristige neurale Differenzierung zu ermöglichen.

Tabelle 8: Differenzierung Protokoll O-BWF8/RA

Tag	Grundmedium	Zusatz	Endkonzentration	Kultivierung
1	5KO	GFRM		Suspension
2	5KO	BMP4 SB431542	10 ng/ml 1 μ M	Suspension
4	5KO	FGF2 Dorsomorphin IWR1e	25 ng/ml 2 μ M 2,8 μ M	Ausplattiert auf Laminin/Poly- L-Ornithine
8	B27-A	FGF8	1:1000	Ausplattiert auf Laminin/Poly- L-Ornithine
10	B27-A	FGF8 Dorsomorphin	2 μ M	Ausplattiert auf Laminin/Poly- L-Ornithine
15	B27-A	Retinsäure	0,1 μ M	Ausplattiert auf Laminin/Poly- L-Ornithine
ab 30	B27-A	GDNF BDNF Vit C cAMP	10 ng/ml 10 ng/ml 50 μ g/ml 500 nM	Ausplattiert auf Lamininpoly- ornithin

2.3 Chemikalien, Enzyme, Zusätze

In Tabelle 9 werden alle verwendeten Chemikalien, Enzyme und Zusätze aufgelistet.

Tabelle 9: Chemikalien, Enzyme, Zusätze

Substanz	Firma	Bestellnummer
1x Halt™ Protease + Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	78440

CaCl₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	HN04.1
Cryostem	Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel	05-710-1E
D(+)- Sucrose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	4621.1
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	4720.1
Dispase	Corning, Amsterdam, Niederlande	354235
Dnase 1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	18047-019
DPBS Calcium, Magnesium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	14040-091
DPBS ohne Calcium, ohne Magnesium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	14190-094
Kollagen IV	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	C5533
Laminin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	11243217001
Lenti-X Concentrator	Takara Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich	631232
Matrigel® hESC-Qualified Matrix	Corning, Amsterdam, Niederlande	354277
MgCl₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	8283.2
Mitomycin C	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	11435
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3957.1
NaH₂PO₄	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	2370.3
NaHCO₃	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	HN01.1

Natriumselenit	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	S5261
NBT	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	N5514
Normal Donkey Serum	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	D9663
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	0335
Poly-L-Ornithin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	P4957
ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	P36935
ReLeSR™	Stem Cell Technologies, Köln, Deutschland	05873
Synth-a-Freeze®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	A12542-01
Triton® X 100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3051.3
TrypLE™ Express	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	12604-021

2.4 Vektoren

In Tabelle 10 werden alle verwendeten Vektoren aufgelistet

Tabelle 10: Vektoren

Cyto Tune Sendai vector	Factor	GenBank ID
CytoTune 2.0 KOS	Human Klf4 Human Oct3/4 Human Sox2	BC029923.1 NM_002701.4 NM_003106.2
Cytotune 2.0 hc-Myc	Human c-Myc	K02276.1
CytoTune 2.0 hKlf4	Human Klf4	BC029923.1
CytoTune-EmGFP-Sendai Fluorescence Reporter (Cat. No. A16519)		

2.5 Kits

In Tabelle 11 werden alle verwendeten Kits aufgelistet.

Tabelle 11: Kits

Kit	Firma	Bestellnummer
PreAmp Master Mix	Fluidigm, San Francisco, USA	100-5581
QuantiFast SYBR[®] Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	204156
RNeasy Mini Isolations-kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	74106

2.6 Primer

In Tabelle 12 sind alle für das QuantiFast SYBR[®] Green RT-PCR Kit verwendeten Primer aufgelistet.

Tabelle 12: Primer

Primer	Firma	Bestellnummer
Hs_EYA1_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00070980
Hs_EYA2_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00076573
Hs_GAPDH_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00079247
Hs_SIX1_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00010584
Hs_SIX4_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00035959

2.7 Antikörper

In Tabelle 13 sind alle verwendeten Primärantikörper, in Tabelle 14 alle verwendeten Sekundärantikörper aufgelistet.

Tabelle 13: Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
Anti-Ascl1(N17)	Ziege	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland	Sc-13219
Anti-CALB2	Maus	1:500	Merck Milipore, Massachusetts, USA	Sc-13219
Anti-EBF2	Schaf	1:40		

Anti-EYA1	Kaninchen	1:100	Protein Tech™, Manchester, UK	22658-1-AP
Anti-EYA2	Maus	1:100	Abnova, Heidelberg, Deutschland	H00002139-M04
Anti-EYA2	Kaninchen	1:50		
Anti-GOLF (K19)	Kaninchen	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland	Sc-385
Anti-MSX1	Kaninchen	1:200		
Anti-NCAM2	Kaninchen	1:100		
Anti-OMP	Ziege	1:200	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland	544-10001
Anti-PAX6	Maus	1:100		
Anti-SIX1	Kaninchen	1:100	Protein Tech™, Manchester, United Kingdom	10709-1-AP
Anti-SIX4(M09)	Maus	1:100	Abnova, Heidelberg, Deutschland	H00051804-M09
Außerdem wurden aus dem StemLight™ Pluripotency Antibody Kit verwendet:				
Anti- OCT-4A (C30A3)	Kaninchen	1:200	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9656
Anti- SOX2 (D6D9)	Kaninchen	1:200		
Anti- NANOG	Kaninchen	1:200		

(D73G4)				
---------	--	--	--	--

Tabelle 14: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
Anti-Kaninchen-IgG H%L (Alexa Fluor® 488)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	ab150073
Anti-Kaninchen-IgG H%L (Alexa Fluor® 568)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	ab175470
Anti-Kaninchen-IgG H%L (Alexa Fluor® 647)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab150075
Anti-Maus-IgG H%L (Alexa Fluor® 488)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab150105
Anti-Maus-IgG H%L (Alexa Fluor® 568)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab175472
Anti-Maus-IgG H%L (Alexa Fluor® 647)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab150107
Anti-Ziege-IgG H%L (Alexa Fluor® 488)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab150129
Anti-Ziege-IgG H%L (Alexa Fluor® 568)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab175474

2.8 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 15 werden alle verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien

Material	Firma	Bestellnummer
0,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	72.704.700
1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	72.706.700
12 Well Kulturplatten	Corning, Amsterdam, Nie- derlande	353043
15 ml Zentrifugenröhr- chen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	62.554.502
24 Well Kulturplatten	Greiner Bio One, Fricken- hausen, Deutschland	662168
25 cm² Kulturflaschen	Corning, Amsterdam, Nie- derlande	3815
250 ml Zellkulturflasche	Greiner Bio One, Fricken- hausen, Deutschland	658175
50 ml Zentrifugenröhr- chen	Greiner Bio One, Fricken- hausen, Deutschland	227261
6 Well Kulturplatten	Corning, Amsterdam, Nie- derlande	353046
96 Well Kulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3926.500
BD Plastipak 50 ml Sprit- zen	VWR, Darmstadt, Deutschland	300869
Clip Tip™ Pipettenspit- zen 1- 10 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	94410210
Clip Tip™ Pipettenspit- zen 10- 100 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	94410310
Clip Tip™ Pipettenspit- zen 100- 1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	94410710
Cryoröhrchen 1,2 ml	Corning, Amsterdam, Nie- derlande	430487
Nitril powderfree Hand- schuhe	ABENA, Zörbig, Deutsch- land	290417
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym, Hessich Olden- dorf, Deutschland	720011
Pipettenspitzen 1000 µl	Greiner Bio One, Fricken- hausen, Deutschland	740290
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	70.760.002
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	86.1254.001
Serologische Pipette 25 ml	Corning, Amsterdam, Nie- derlande	357525
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	86.1253.001

2.9 Geräte und Software

In Tabelle 16 werden alle verwendeten Geräte und in Tabelle 17 jede verwendete Software aufgelistet.

Tabelle 16: Geräte

Geräte	Firma
Analysenwaage BP2218-0CE	Satorius
Axio Imager M2 Forschungsmikroskop	Zeiss
Eppendorf Multipette Stream	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 0,1 – 2,5 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 0,5 – 10 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 0,5 – 5 ml	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 10 – 100 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 100 – 1000 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 20 – 200 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 500 – 5000 µl	Eppendorf
EVOS® FL Cell Imaging System	Thermo Fischer Scientific
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 1 – 10 µl	Thermo Scientific
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 10 – 100 µl	Thermo Scientific
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 100 – 1000 µl	Thermo Scientific
Flockeneisbereiter AF-103	Scotsman
Gefrierschrank GN 4113-20K	Liebherr
Heracell 240i CO₂ Incubator	Thermo Scientific
Heraeus™ Fresco™ Zentrifuge	Thermo Scientific
Heraeus™ Megafuge™ 16 Universalzentrifuge	Thermo Scientific
InoLab® Labor-pH-Meter	WTW
Kühl-Gefrierkombination CUN 3933-21B	Liebherr
Magnetrührer MR3001K	Heidolph
Mikrowelle MW13145W	Amica
Minizentrifuge Sprout	Biozym
MSC-Advantage™ biologische Sicherheitswerkbank, Klasse 2	Thermo Scientific

Nanophotometer™ P-Class	Implen
NeoVortex D-6012	NeoLab
Odyssey FC Imaging System	Li-Cor
PCR-Cycler 732-1210	Gene Technologies
Pipetus®	Hirschmann
PowerPac™ 200	Bio-Rad
Primovert inverses Mikroskop	Zeiss
Quantum ST4	Vilber Lourmat
Schüttelinkubator 3031	GFL
StepOnePlus™ Real-time PCR System	Applied Biosystems
Thermomixer Pro	CellMedia
Ultra-Tiefkühlschrank Forma 900 Series	Thermo Scientific

Table 17: Software

Software	Firma	Verwendung
AxioVision SE64 Rel 4.9	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	Mikroskopie
StepOne Software V 2.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	qRT-PCR
Microsoft Office	Microsoft Corporation , Redmond, USA	Schreiben, Rechnen
ZEN	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	Mikroskopie
ImageJ	Wayne Rusband	Zellauszählungen

3. Methoden

3.1 Kultivierung von Keratinozyten

Vorbereitend werden zwei Kulturflaschen mit je 700 µl Matrigel in Epilife (1:10) bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

Dem freiwilligen Spender werden mit einer breitflächigen Pinzette Haare mitsamt Haarwurzel aus dem Hinterkopf herausgezogen. Die Haare werden in einer mit DMEM befüllten Petrischale sortiert. Eine dicke weißliche Wurzelscheide ist essentiell für das Auswachsen der Keratinozyten. Das Haar wird circa 3mm hinter der Wurzel abgeschnitten und je fünf Wurzeln werden in die vorbereiteten Kulturflaschen gelegt. Jede Wurzel wird mit einem Tropfen Matrigel in Epilife 1:5 fixiert. Die Kulturflaschen werden bei 37 °C für 2 h inkubiert, anschließend werden pro Flasche 1 ml Haar-Medium zugegeben, dieses wird täglich gewechselt, bis Keratinozyten auswachsen. Es erfolgt dann der Umstieg auf

Keratinocyten-Medium, dieses wird circa 2-3 Wochen alle 2 Tage neu zugegeben, bis die Keratinocyten dicht genug sind für die Infektion mit viralen Partikeln.

Für die Kryokonservierung werden die Keratinocyten mit 700 µl Dispase nach 5-10 min Inkubationszeit bei 37 °C abgelöst, zentrifugiert und nach Zugabe des Einfriermediums Synth-a-Freeze in Kryoröhrchen überführt. Diese werden in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.2 Reprogrammierung von Keratinocyten zu induziert pluripotenten Stammzellen

Ausplattiert werden Keratinocyten in 6 Well Platten, welche mit 700 µl in PBS/- gelöstem Kollagen IV (Endkonzentration 20 µg/ml) 1 h bei 37 °C beschichtet wurden. 1-2 Tage bevor die Dichte der Keratinocyten 70% des Wells entsprechen, werden die bereits hergestellten Ammenzellen ausplattiert. Bei diesen handelt es sich um, durch Mitomycin in ihrem Zellzyklus gestoppte, also inaktivierte Fibroblastenzellen der Ratte (REFs). Diese sondern Wachstumsförderungsstoffe ab und erleichtern das Absetzen der reprogrammierenden Zellen. Sie werden mit REF-Medium versorgt.

Über einen lentiviralen Vektor werden vier Pluripotenzgene (*cMYC*, *KLF4*, *OCT4* und *SOX2*) in das Genom der Keratinocyten integriert. An zwei aufeinanderfolgenden Tagen werden pro Well je 40 µl Lenti-Virus und 1 µg/ml Polybrene zugegeben. Die Zellen werden bei 37 °C inkubiert.

Die infizierten Zellen werden mit 500 µl TrypLE Express abgelöst und nach der Zentrifugation mit Reprogrammierungs-Medium resuspendiert. Anschließend werden je 2 ml auf ein Well mit ausplattierten REFs übertragen. Das Reprogrammierungs-Medium wird alle zwei Tage gewechselt.

Etwa ab Tag 7 sind erste Stammzellkolonien sichtbar und nach circa 3 Wochen sind die ersten Kolonien groß genug, um umgesetzt zu werden. Vorbereitend wird ein Well einer 6-Well Platte 1 h bei 37 °C mit 700 µl Matrigel in KO-DMEM beschichtet.

Die Kolonie wird manuell mit einer 100 µl Pipettenspitze abgekratzt, mit der Pipette aufgesaugt und in das beschichtete 6-Well mit vorgelegtem FTDA-Medium übertragen.

In dieser Doktorarbeit wurden als Grundlage für die Differenzierungen nur bereits vollständig charakterisierte hiPSZ aus Keratinocyten, reprogrammiert mit Hilfe von Lentiviren, herangezogen.

3.2 Kultivierung von hiPSZ

hiPSZ werden in einem Inkubator bei 37 °C mit 5 % O₂ und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen befinden sich auf Matrigel in KO-DMEM beschichteten Platten und das für Stammzellen verwendete FTDA Medium wird täglich mit je 1,5 ml pro 6-Well gewechselt.

Stammzellen werden passagiert, dabei wird meist ein Verhältnis von 1:6 verwendet. Soll 1 Well auf 6 Wells gesplittet werden, werden die 6 Wells zuvor 1 h mit Matrigel in KO-DMEM bei 37 °C beschichtet. Auf das zu splittende Well werden 500 µl ReleSR gegeben. Dieser wird nach 1 min wieder abgenommen. Nach weiteren 4 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur werden die Zellen mit 1ml FTDA Medium abgelöst und in ein vorbereitetes Falcon mit 4 ml FTDA Medium überführt. Das Well wird nochmals mit 1 ml FTDA Medium gespült und die restlichen Zellen werden übertragen.

Das Matrigel der 6 beschichteten Wells wird nach der Stunde Inkubationszeit abgesaugt und je 500 µl FTDA Medium werden vorgelegt. Anschließend werden aus dem Falcon, mit den gesammelten Zellen, die man vorsichtig, ohne sie zu vereinzeln, resuspendiert hat, je 1 ml pro Well zugegeben.

Beim Einfrieren werden die Zellen ebenfalls mit ReleSR behandelt, im Anschluss aber nicht mit FTDA-Medium, sondern mit DMEM-F12+ Glutamax abgelöst und in ein Falcon mit 2 ml Vorlage überführt. Sind alle Zellen gesammelt werden sie bei 1500 rpm 2min zentrifugiert und im Einfriermedium Kryostem resuspendiert. Anschließend werden je 0,8 µl in ein Kryoröhrchen überführt, wobei pro gelöstes Well ein Kryoröhrchen verwendet wird. Diese werden eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Beim Auftauen wird wiederum ein 6-Well mit Matrigel-Beschichtung vorbereitet. Das Kryoröhrchen wird in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und schnellstmöglich in ein vorbereitetes Falcon mit DMEM F12 überführt. Die Zellen werden bei 1500 rpm 2 min zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Anschließend werden die Zellen mit FTDA-Medium vorsichtig resuspendiert und in die vorbereiteten Wells gegeben.

Bei spontaner Differenzierung sollten die differenzierten Zellen unter dem Mikroskop mit einer 100 µl Pipettenspitze abgekratzt und das Well vor dem Mediumwechsel mit 500 µl PBS/-gewaschen werden.

3.2.1 Charakterisierung von iPSZ

Eine neue iPSZ-Linie sollte auf ihr Pluripotenzpotential getestet werden.

Dafür werden verschiedene Analysen durchgeführt.

Nach Protokoll des Pluripotenzfärbekits (Tabelle 11) wird mit den hiPSZ eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dabei wird die Existenz der Pluripotenz- (SOX2, NANOG, OCT4) und Oberflächenmarker (SEAA4, TRA-1-60 und TRA-1-81) immunologisch nachgewiesen. Die Pluripotenzmarker sind Transkriptionsfaktoren und im Kern lokalisiert. Die Oberflächenmarker binden an Glykoproteine der Zellmembran und sind membranständig lokalisiert. Zur Detektion des Nukleus wird eine DAPI-Färbung durchgeführt.

Außerdem wird eine Keimblattdifferenzierung ausgeführt, um zu beweisen, dass die hiPSZ sich in alle 3 Keimblätter entwickeln können. Hierfür werden zum einen die RNA-Expressionendaten von keimblattspezifischen Markern ermittelt und mit iPSZ Expressionsdaten verglichen. Zum anderen wird auch hier für die Marker der Keimblätter eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

Für die Differenzierung wird eine 6 Well Platte mit dichten hiPSZ mit je 500 μ l ReleSR abgelöst, indem nach 1min der ReleSR wieder abgenommen wird und dann weitere 4 min bei Raumtemperatur inkubiert wird. Die Zellen werden zweimal mit je 1 ml EB-Formationsmedium abgelöst und in ein vorbereitetes Falcon mit 4 ml EB-Formationsmedium gegeben. Die insgesamt 10 ml werden mit einer Multipipette gleichmäßig mit je 100 μ l auf einer v-förmigen 96-Platte verteilt und nach 5 Minuten Zentrifugation bei 1200 rpm bei 37 °C, 5 % O₂ und 5 % CO₂ kultiviert. Das Reprogrammierungsmedium wird jeden 2. Tag gewechselt. Nach 7 Tagen werden für die Immunfluoreszenzfärbung je 2 bis 3 EBs in ein mit Matrigel in KO-DMEM beschichtetes 24er-Well mit Deckglas mit 500 μ l Reprogrammierungsmedium überführt. Für die RNA-Expressions-Analyse werden je 3-4 EBs mit 1ml Reprogrammierungsmedium in ein 12er-Well ohne Deckglas gegeben. Alle zwei Tage wird das Medium gewechselt.

Überprüft werden die Zellen bei der RNA-Expressionsanalyse auf die Marker T und MYH6 für Mesoderm, AFP und FOXA2 für Endoderm und PAX6 und TUBB3 für Ektoderm.

Bei der Immunfluoreszenz-Färbung werden die Marker TUBB3 für Ektoderm, DESMIN für Endoderm und SOX17 für Mesoderm überprüft.

3.3 Olfaktorische Differenzierung

3.3.1 EB-Formation

Zur Formierung von Embryoid Bodys werden vier dichte 6-Wellen verwendet. Diese werden an Tag 0 mit je 500 µl PBS-/- gewaschen, anschließend werden 500 µl ReleSR zugegeben. Nach einer Minute Inkubation bei Raumtemperatur wird der ReleSR wieder abgenommen und für weitere 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit je zweimal 1ml EB-Formationsmedium abgelöst und in ein vorbereitetes Falcon mit 2 ml EB-Formationsmedium-Vorlage überführt. Die insgesamt 10 ml werden mit einer Multipipette gleichmäßig mit 100 µl pro Well auf eine 96-Well Platte übertragen. Anschließend wird die Platte 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und dann bei 37 °C, 5 % O₂ und 5 % CO₂ kultiviert.

Ab Tag 1 wird das dem jeweiligen Protokoll entsprechende Grundmedium mit Zusätzen zugegeben. Der Mediumwechsel erfolgt täglich. Das alte Medium wird vorsichtig abgesaugt, sodass sich der EB noch in circa 20 µl Medium befindet. Anschließend werden vorsichtig mit der Multipipette neue 100 µl zugegeben.

3.3.2. Auswachsen der EBs in 2D Kultur

An Tag 4 oder 5 werden die Embryoid Bodys zur weiteren Differenzierung ausplattiert. Dieser Vorgang hat unter anderem den Vorteil, dass die Morphologie der auswachsenden Zellen leichter beurteilt werden kann.

Für Versuche bis zu 30 Tagen wird nachfolgender Vorgang verwendet.

Hierfür werden zwei 24-Well-Platten mit 13mm Deckgläsern bestückt und anschließend 1 h bei 37 °C mit Matrigel in KO-DMEM beschichtet. In der 96-Well-Platte wird das Medium wie oben beschrieben gewechselt, wobei auch hier die Zusätze nach Protokoll verändert werden. In den 24-Well-Platten wird das Matrigel abgesaugt und 300 µl des neuen Mediums werden vorgelegt. Mit einer 1000 µl Pipette wird ein EB vorsichtig mit dem neuen Medium aufgenommen und in das Well der 24-Platte übertragen, sodass er

auf dem Deckglas zu liegen kommt. Immer zwei EBs werden in 1 Well übertragen, bis alle 96 EBs übertragen sind. Anschließend werden die Platten vorsichtig in den Brutschrank gestellt und das Medium wird am zweiten Tag nach dem Ausplattieren sehr vorsichtig mit dem Pipetus mit einer 5ml Pipette gewechselt. Der Medienwechsel erfolgt dann jeden zweiten Tag mit je 500 µl pro Well.

Für Versuche über 30 Tage wird statt Matrigel in KO-DMEM mit Laminin/Poly-L-Ornithine 1:100 beschichtet, dabei beträgt die Inkubationszeit 2 h bei 37 °C. Das restliche Verfahren entspricht dem oben beschriebenen, wobei ab Tag 30 der Medienwechsel nur noch alle 3 Tage erfolgt. Die Generierung der Neurone erfolgte im durchgeführten Protokoll bis Tag 140.

3.4 Charakterisierung olfaktorischer Rezeptorneurone

Zur Charakterisierung der Zellen auf den verschiedenen Stufen der Differenzierung wurden zwei Methoden der Analyse präferiert.

3.4.1 Proteinanalyse per Immunfluoreszenzfärbung

Im ersten Schritt werden die auf Deckglas ausgewachsenen EBs nach einer Waschung mit PBS/- mit 4 % Paraformaldehyd 10 % D+ Sucrose für 20 min fixiert. Anschließend werden die Deckgläser zweifach mit PBS/- abgewaschen.

Zur Permeabilisierung und Blockierung werden die Zellen mindestens 1 h mit 0,2 % TritonX und 10 % Normal Donkey Serum bei Raumtemperatur behandelt. Die Zellmembran wird durchlässig und ermöglicht den Eintritt der Antikörper in das Zytoplasma und den Nukleus. Alle freien Proteinstellen werden durch das Normal Donkey Serum blockiert. Die Primärantikörper werden in dem gleichen Serum angesetzt und über Nacht bei 4 °C auf den Zellen angewendet. Nach wiederholten Waschschritten mit PBS wird der in PBS/- gelöste Sekundärantikörper in Dunkelheit für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS und einer 15-sekündigen Inkubation mit destilliertem Wasser werden die Proben in DAPI-haltiger Lösung eingedeckelt. Die Proben werden ca. 1-2 h bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend entweder direkt unter dem Mikroskop analysiert oder bei 4 °C gelagert.

Zum immunologischen Beweis der Pluripotenz der Stammzellen wird ein spezielles Färbekit verwendet. Abweichend vom normalen Protokoll werden die Färbungen gegen

Transkriptionsfaktoren nicht mit TritonX, sondern vor der Blockierung mit eiskaltem 100 % Methanol 10 min permeabilisiert. Der restliche Ablauf entspricht dem oben beschriebenen Vorgang.

3.4.1.1 Auszählung von Zellen in immunhistochemischen Färbungen

Als TIFF-Datei exportierte Bilder wurden mit ImageJ und dem Plugin Cell-Counter ausgezählt. Dabei wurde jede Zelle angeklickt und automatisch gezählt. Für die Analyse der allgemein im Bild befindlichen Zellen wurden die mit DAPI gefärbten Kerne ausgezählt. Zur Analyse der untersuchten Marker wie z.B. SIX1 wurden alle nukleär gefärbten SIX1-positiven Zellen gezählt. Alle Auszählungen erfolgten im Umfang n=3 für jeden spezifischen Marker. Anschließend wurde das Verhältnis von spezifischen Marker zu DAPI ausgerechnet und mit 100 multipliziert, um eine prozentuale Angabe über die Anzahl der spezifisch gefärbten positiven Zellen zu erhalten. In Ergebnisteil 4.3.2 wurden Regionen ausgewählt, die großflächig SIX1-positive Zellen aufwiesen. Ausschnitte aus diesen Regionen wurden ausgezählt.

In Ergebnisteil 4.3.3 wurden zufällig Regionen in unmittelbarer Nähe des EB's ausgewählt und ausgezählt. Dabei wurde der EB als Referenz gesehen, um eine statisch vergleichbare Lokalisation auszuwählen und es wurde darauf geachtet, jeweils einen vergleichbaren Abstand zum EB einzuhalten.

3.4.2 RNA-Analyse

3.4.2.1 Isolation der RNA

Für den ersten Schritt Isolation der RNA wurden zwei Wege verwendet.

Einmal werden die Zellen mit 500 µl TrypLE 5-10 min bei 37 °C inkubiert, gelöst, in ein 15 ml Falcon überführt und anschließend 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und die Zellen des Pellet werden in 350 µl RLT Plus Buffer des RNeasy Mini Isolationkits (Qiagen) gut resuspendiert und dann bei -80 °C eingefroren oder direkt für die weitere Isolation nach Protokoll des Kits verwendet. Im zweiten Ansatz werden die Zellen direkt mit je 175 µl RLT Plus Buffer des RNeasy Mini Isolationkits in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80 °C eingefroren oder ebenfalls direkt nach Protokoll des Kits weiterverarbeitet.

Beide Ansätze wurden mit 30 µl RNase freiem H₂O (50 °C, 6min Inkubationszeit vor Zentrifugation) eluiert.

3.4.2.2 Quantitative Real Time PCR

Für die Analysen der RNA wurden zwei verschiedene Geräte verwendet, der StepOnePlus™ und der Biomark™ von Fluidigm. Beide Geräte funktionieren mit ähnlichen Ansätzen.

Zugrunde liegt eine Polymerase Kettenreaktion (PCR). Diese ermöglicht die Vervielfältigung einer Sequenz, bestimmt durch die zugegeben Primer. Hierfür reagieren Proben in einem Thermocycler in 3 Grundschritten. Alle doppelsträngigen Gebilde werden bei einer Temperatur von 94-96 °C denaturiert, sodass sowohl Primer als auch cDNA in Einzelsträngen vorliegen. Anschließend wird die Temperatur schnell auf ca. 60 °C gesenkt, um eine erneute Bildung von Doppelsträngen zu verhindern. Im nächsten Schritt binden die Primer an ihre spezifischen Sequenzen, dabei unterscheidet sich die Annealingtemperatur (hier ca. 68 °C) je nach Länge und Sequenz der Primer. Es folgt der Schritt der Elongation, die DNA-Polymerasen füllen die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Die Temperatur liegt im Arbeitsoptimum der jeweiligen Polymerase (hier ca. 72 °C). Die 3 Schritte werden je nach PCR in beliebig vielen Zyklen wiederholt. Da in unserem Fall RNA als Probe vorliegt, wird diese im Voraus bei ca 50 °C durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

Bei der Real-Time-PCR im StepOnePlus wird zusätzlich ein DNA interkalierender Farbstoff beigemischt. Die Fluoreszenz kommt also bei jeder Entstehung einer DNA-Doppelhelix mehr zum Tragen. Die Quantifizierung erfolgt durch die Messung der Fluoreszenz, die proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt. Um die Proben untereinander vergleichen zu können, wird ein Referenzgen eingesetzt. Die relative Menge der RNA wird also anhand der Intensität der Fluoreszenz im Verhältnis zu dem Referenzgen errechnet.

Bei dem Fluidigm von Biomark wird statt eines DNA-interkalierenden Farbstoffs eine TaqMan-Sonde eingesetzt. Diese bindet an eine spezifische Sequenz und besitzt auf der einen Seite ein Reporter Fluoreszenzfarbstoff und auf der anderen Seite einen Quencher, welcher die Fluoreszenz der Sonde solange unterdrückt, bis die Sequenz von der TaqMan- Polymerase, welche auch Exonukleaseaktivität besitzt, abgebaut wird. Sobald

der Quencher sich räumlich von dem Fluorophor entfernt, kann eine steigende Reporter Fluoreszenz gemessen werden. Während der DNA-interkalierende Farbstoff die Gesamtmenge an DNA misst, kann die Fluoreszenz der spezifischeren TaqMan-Methode also nur dann gemessen werden, wenn eine Sonde abgebaut wird.

3.4.2.2.1 StepOnePlus™ Real-Time-PCR-System

Das StepOnePlus wird für kleinere Ansätze verwendet.

Es wird nach Protokoll des Herstellers vorgegangen.

Wie oben beschrieben benötigt man eine reverse Transkriptase, spezifische Primer der zu analysierenden Gene und des Referenzgens, eine DNA-Polymerase, ein Puffergemisch mit dNTPs und einen DNA-interkalierenden Farbstoff.

Der Mastermix wird wie in Tabelle 3.1 beschrieben hergestellt. Zu den 19 µl Mastermix werden 1 µl RNA zugegeben.

Tabelle 18: Mastermix

Zusatz	Menge in µl
H2O	6,8
Primer	2
2x PCR Mix	10
Polymerase	0,2

In Tabelle 3.2 sind die PCR-Laufzeiten angegeben.

Tabelle 19: PCR-Laufzeiten

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Anzahl
Start	50	600	1
	95	300	1
Zyklen	95	10	40
	60	30	
Schmelzkurven	60-95	-	Alle 0,3 °C messen

3.4.2.2.2 Biomark™ von Fluidigm

Das Biomark wird für die Analyse großer Datenmengen verwendet, da hier bis zu 96 Proben mit 96 Primern verglichen werden können. Auch hier wird eine Real-Time-PCR

zur Quantifizierung verwendet, dabei werden aber wie oben beschrieben TaqMan-Sonden eingesetzt.

Hier muss die cDNA Synthese vorher erfolgen. Dafür wird zunächst die DNA in den RNA-Proben durch die DNase 1 verdaut. Nach 15 min wird das Enzym direkt mit der Stop-Lösung inaktiviert. Für die cDNA Synthese werden 80 ng RNA, 1 µl 5x RT Puffer, 0,25 µl dNTPs, 0,313 µl Hexanukleotide, 0,25 µl MMLV RT und 0,438 µl H₂O gemischt und für 1 h bei 37 °C und 10 min bei 85 °C inkubiert.

Die Reaktionsplatte wird dann nach dem Protokoll des Herstellers beladen und in den BiomarkTM platziert.

Die statistische Analyse der RNA-Ergebnisse erfolgte mittels t-Test, bei 3 biologischen Replikaten (n=3). Signifikanz wurde wie folgt wiedergegeben: $p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,005$: **; $p \leq 0,0005$: ***

4. Ergebnisse

4.1. Olfaktorische Differenzierung

Im Rahmen der olfaktorischen Differenzierung *in vitro* sollen die in der menschlichen Embryologie ablaufenden Entwicklungen nachvollzogen werden. Dabei wurden drei Entwicklungsschritte ausgewählt, zu welchen die Protokolle O-BWF8, O-BWF8/RA und O-BWF/TGF auf ihre Eignung geprüft werden. Als erster wichtiger Entwicklungsschritt wurde die Differenzierung der präplakodalen Region (PPR), als zweiter Schritt die Differenzierung der olfaktorischen Plakode (OP) und als dritter Schritt die Differenzierung von olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) ausgemacht.

Die Untersuchungen sind wiederum in zwei Abschnitte unterteilt.

Im ersten Abschnitt wurden Protokoll O-BWF8 und O-BWF/TGF auf die Entstehung der PPR und der OP geprüft und hinsichtlich ihrer morphologischen Eigenschaften und Eignung verglichen.

Im zweiten Abschnitt wurde Protokoll O-BWF8/RA auf die Entstehung von ORN hin geprüft.

4.1.1 *In vitro* Entwicklungsschritte

Das Differenzierungsprotokoll ist in verschiedene *in vitro* Entwicklungsschritte unterteilt. Im ersten Schritt wird aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen (hiPSZ) ein Embryoid Body (EB) geformt. EBs sind kugelförmige, in Suspension gehaltene Zellaggregate (Abb. 16, A). Diese Aggregate spiegeln in vieler Hinsicht die Gastrulation nach, insbesondere differenzieren hier die Stammzellen zu Populationen der 3 Keimblätter. Um eine Analyse zu erleichtern und zur besseren Betrachtung der Morphologie werden die EBs an Tag 4/5 ausplattiert (Abb. 16, B). Nach wenigen Tagen bilden sich so genannte Rosetten, vergleichbar mit der Ausbildung des Neuralrohres (Abb. 16, C). Im Langzeitversuch entsteht eine Neuronenkultur (Abb. 16, D).

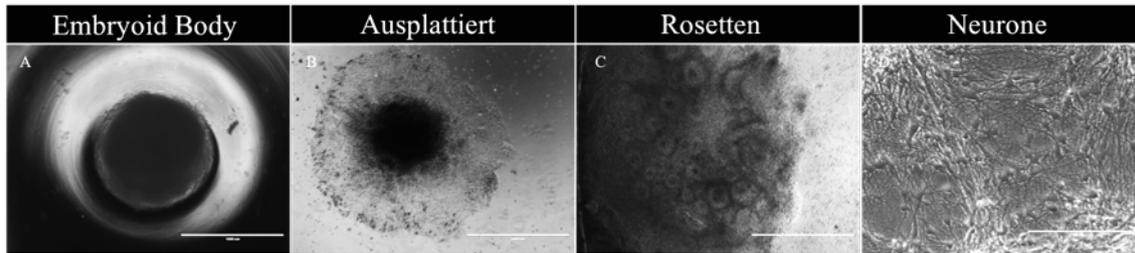


Abbildung 11: Olfaktorische Differenzierung in vitro

Bild A zeigt einen Embryoid Body (EB), kultiviert in einer 96-Well Platte an Tag 1. In B zeigt sich ein ausplattierter EB an Tag 8 mit beginnender Entwicklung von Rosetten. In C erkennt man das Stadium der ausgeprägten Rosetten hier an Tag 15. Bild D zeigt deutlich Neuronen an Tag 120. Durchlichtbilder, Maßstab A+B 1000 μ m, C 400 μ m, D 200 μ m.

4.2 Vergleich der Differenzierungsprotokolle O-BWF8 und O-BWF8/TGF

Für die Entwicklung der PPR wurde ein Differenzierungsprotokoll, weiterhin genannt O-BWF8, auf Basis des bisherigen Forschungsstandes entwickelt. Durch ein sehr frühes BMP4 Signal und eine anschließende Antagonisierung des Signals durch Dorsomorphin soll die PPR induziert werden. FGF-Signale sowie eine Antagonisierung des Wnt- und des TGF- β -Signalwegs sind ebenfalls wichtige Faktoren bei der Entwicklung der PPR und werden dementsprechend im Differenzierungsprotokoll eingesetzt. (Tabelle 6) Das Differenzierungsprotokoll O-BWF8/TGF ist eine Abwandlung des Differenzierungsprotokolls O-BWF8. Verändert wurde es hinsichtlich der durchgehenden Anwendung des TGF-Beta-Inhibitors SB431542. Außerdem wurde der Wechsel von FGF2 auf FGF8 nicht an Tag 8 sondern an Tag 6 vollzogen, um eine effizientere Differenzierung der olfaktorischen Vorläuferzellen zu gewährleisten. Wnt-Inhibitoren und Anti-BMP Signale wurden weiterhin zugefügt, um eine Differenzierung der PPR in Richtung der anterioren Plakoden und im speziellen in Richtung der olfaktorischen Plakode voranzutreiben. Desweiteren wurde ein Grundmedium ohne Zusatz von B27 verwendet. (Tabelle 7)

4.2.1 Vergleich der Differenzierungsprotokolle O-BWF8 und O-BWF8/TGF hinsichtlich der Generierung einer PPR

In den folgenden Abschnitten wird das Protokoll O-BWF8 einerseits auf seine Eignung hinsichtlich der Differenzierung der PPR auf Proteinebene untersucht und andererseits diesbezüglich mit dem Differenzierungsprotokoll O-BWF8/TGF verglichen. Die Differenzierung wurde an den Tagen 12 bis 20 auf die Entstehung präplakodaler Zellen hin analysiert.

Die differenzierten Zellen wurden auf Proteinebene auf die spezifischen PPR-Marker SIX und EYA, sowie auf die neuralen Grenzregion-Marker MSX1 und SOX2 hin analysiert. Auch der Marker der anterioren Plakodenregion PAX6 und EBF2, ein Marker exprimiert im embryonalen Nervensystem und später spezifisch für olfaktorische Vorläuferzellen und Neurone, wurden im Zellverbund analysiert. Zusätzlich wurden SOX1, Marker für neuroepitheliale Vorläuferzellen sowie später der Linsenplakode und SOX9, Marker für die Neuralleiste zur Abgrenzung von neuralen zu präplakodalen Zellen, eingesetzt. Für die Darstellung der Zellkerne (Nuclei) wurde einheitlich die Kernfärbung DAPI verwendet.

SIX1 lässt sich in der Differenzierung O-BWF8 sowohl an Tag 15, als auch an Tag 20 nukleär darstellen. An Tag 12-14 konnten keine SIX1-positiven Zellen detektiert werden. Die SIX1-positiven Zellen stellen sich als verteilte Gruppierungen ohne flächendeckende Ausbreitung im Zellverbund dar. Auch in O-BWF8/TGF zeigen sich ab Tag 18 sehr vereinzelt positive SIX1-Regionen. (Abb. 17)

SIX4 lässt sich in O-BWF8 schon ab Tag 12 zum Großteil flächendeckend im Zellverbund nukleär darstellen. Es weist an Tag 12 eine Co-Lokalisation mit PAX6 und an Tag 18 eine Co-Lokalisationen mit MSX1 auf. Auch in O-BWF8/TGF lassen sich ab Tag 18 SIX4-positive Zellen detektieren, vereinzelt in Co-Lokalisation mit PAX6, jedoch weit aus vereinzelter als in Protokoll O-BWF8. (Abb. 18)

EYA2 ist in Protokoll O-BWF8 an Tag 12-20 nur zytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 17, 19). Dahingegen lässt sich EYA2 in der Differenzierung O-BWF8/TGF an Tag 18 nukleär detektieren, teilweise in Co-Lokalisation mit PAX6. Auch können in der Differenzierung O-BWF8/TGF an Tag 12 erstmals EYA1 positive-Zellen auf Proteinebene analysiert werden. (Abb.19)

EBF2 lässt sich in der Differenzierung O-BWF8 sowohl an Tag 12 als auch an Tag 18 nukleär darstellen. Auffallend ist dabei eine teilweise zentrifugale Anordnung der EBF2-positiven Zellen. EBF2 weist teilweise Co-Lokalisationen mit SOX1 an Tag 12 sowie mit SOX9 an Tag 18 auf. (Abb. 20) In der Differenzierung O-BWF8/TGF lassen sich nur sehr vereinzelt EBF2-positive Zellen detektieren (nicht gezeigt).

SOX2 als früher Marker der Grenzregion und Marker für neurale Stammzellen zeigt in der Differenzierung O-BWF8 nukleäre Lokalisationen an Tag 20 in lokal begrenzten Teilen des Zellverbundes. (Abb. 21).

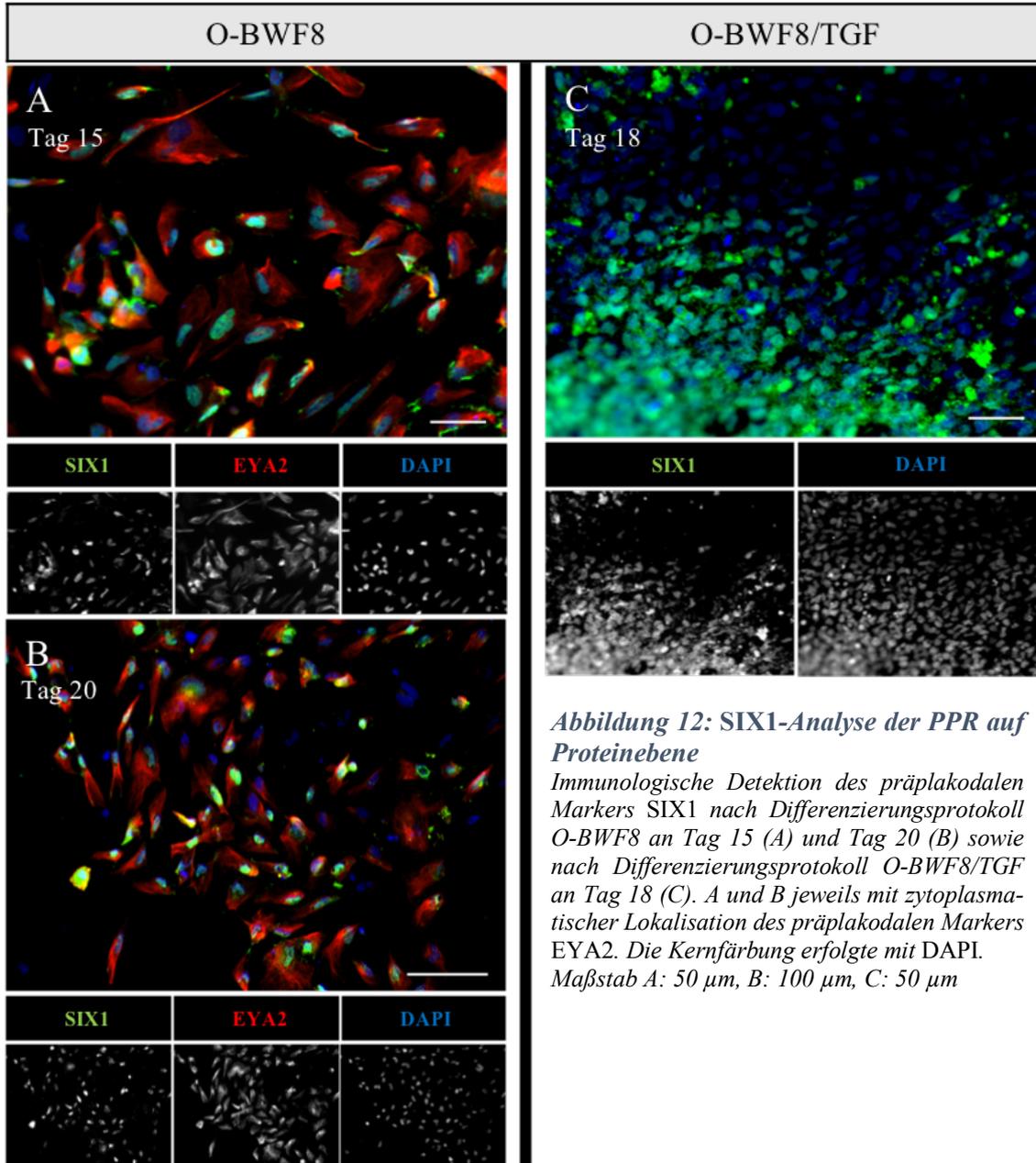


Abbildung 12: SIX1-Analyse der PPR auf Proteinebene

Immunologische Detektion des präplakodalen Markers SIX1 nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8 an Tag 15 (A) und Tag 20 (B) sowie nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8/TGF an Tag 18 (C). A und B jeweils mit zytoplasmatischer Lokalisation des präplakodalen Markers EYA2. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Maßstab A: 50 μ m, B: 100 μ m, C: 50 μ m

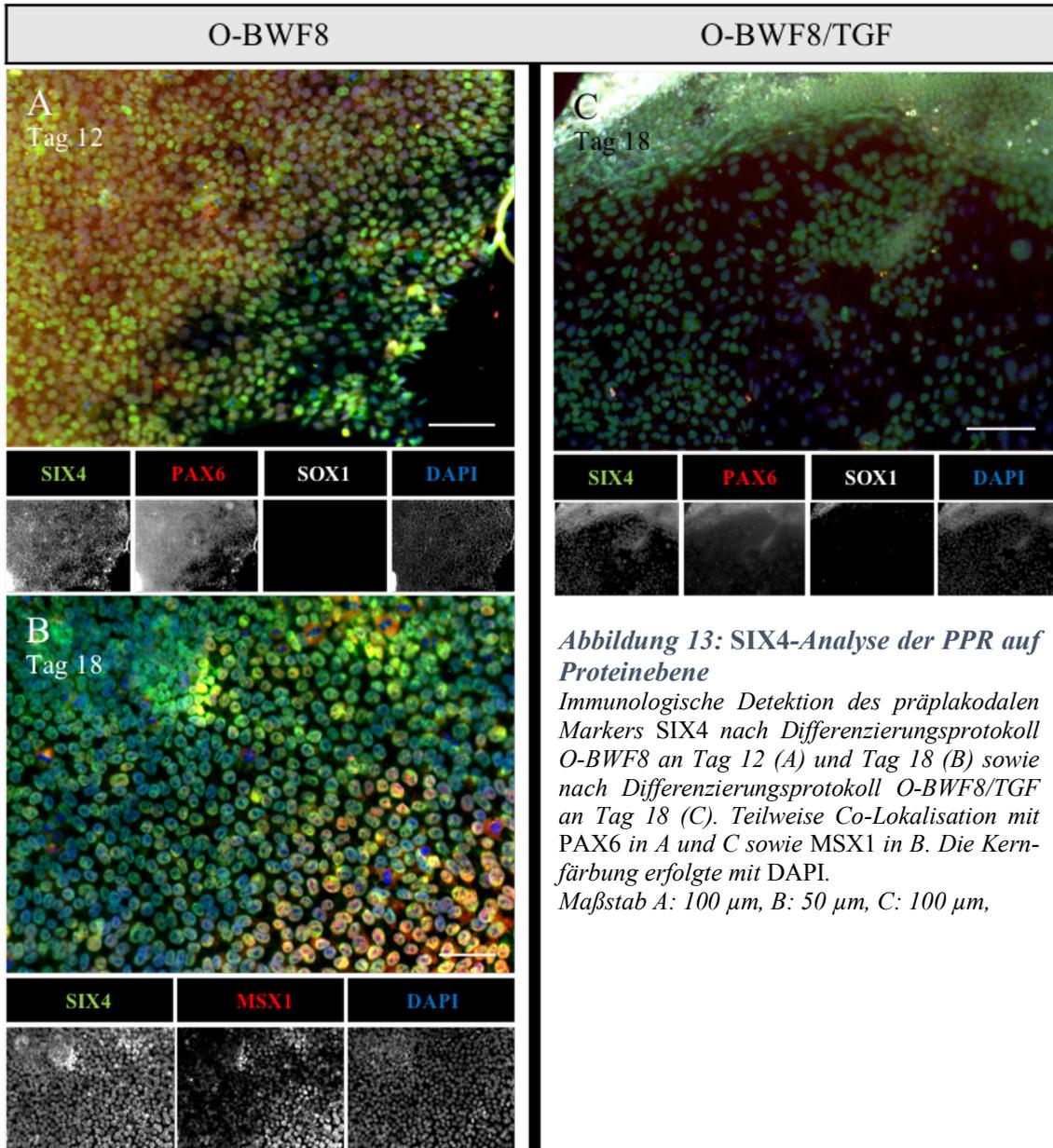


Abbildung 13: SIX4-Analyse der PPR auf Proteinebene

Immunologische Detektion des präplakodalen Markers SIX4 nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8 an Tag 12 (A) und Tag 18 (B) sowie nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8/TGF an Tag 18 (C). Teilweise Co-Lokalisation mit PAX6 in A und C sowie MSX1 in B. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI.

Maßstab A: 100 µm, B: 50 µm, C: 100 µm,

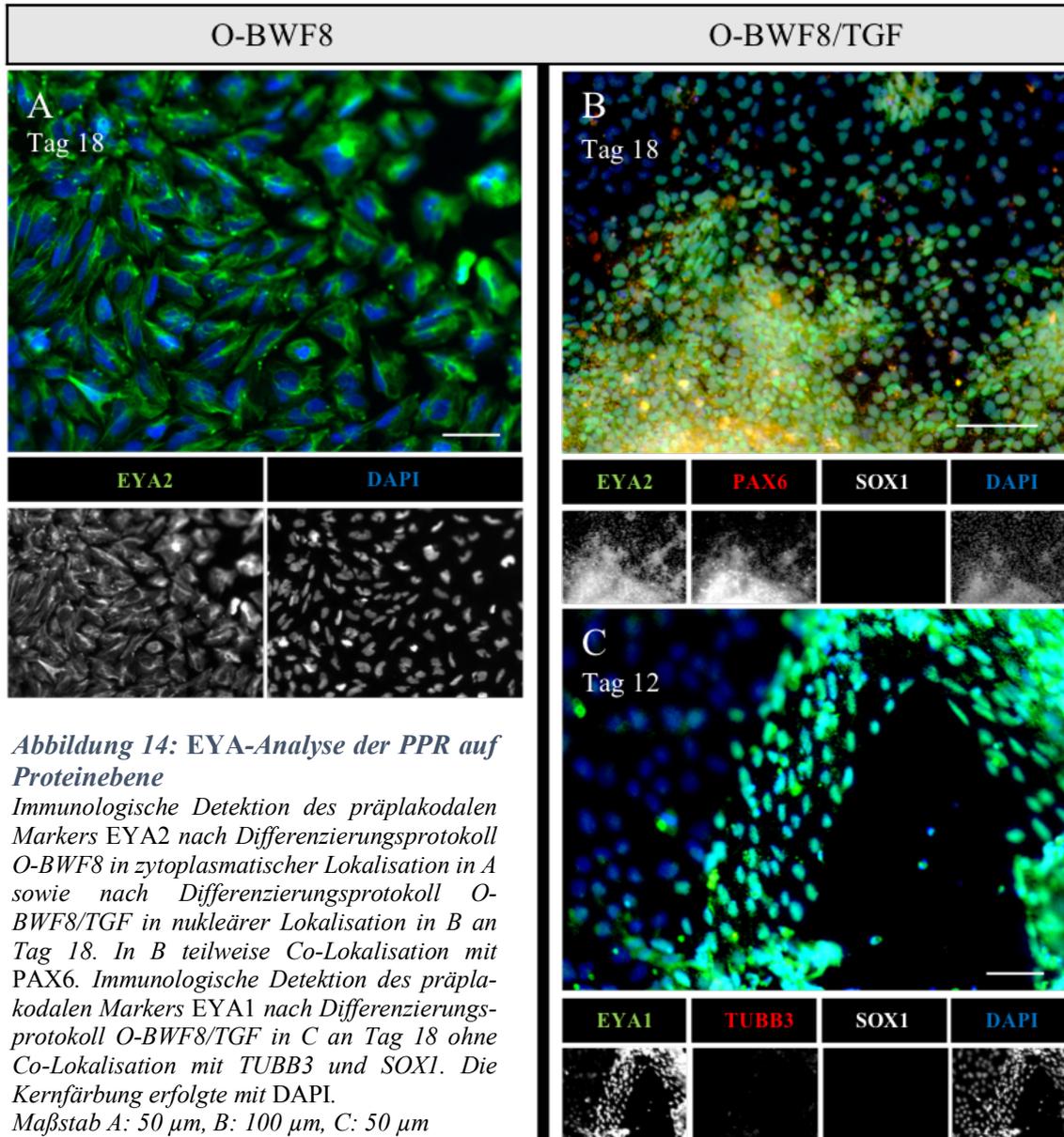


Abbildung 14: EYA-Analyse der PPR auf Proteinebene

Immunologische Detektion des präplakodalen Markers EYA2 nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8 in zytoplasmatischer Lokalisation in A sowie nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8/TGF in nukleärer Lokalisation in B an Tag 18. In B teilweise Co-Lokalisation mit PAX6. Immunologische Detektion des präplakodalen Markers EYA1 nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8/TGF in C an Tag 18 ohne Co-Lokalisation mit TUBB3 und SOX1. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Maßstab A: 50 µm, B: 100 µm, C: 50 µm

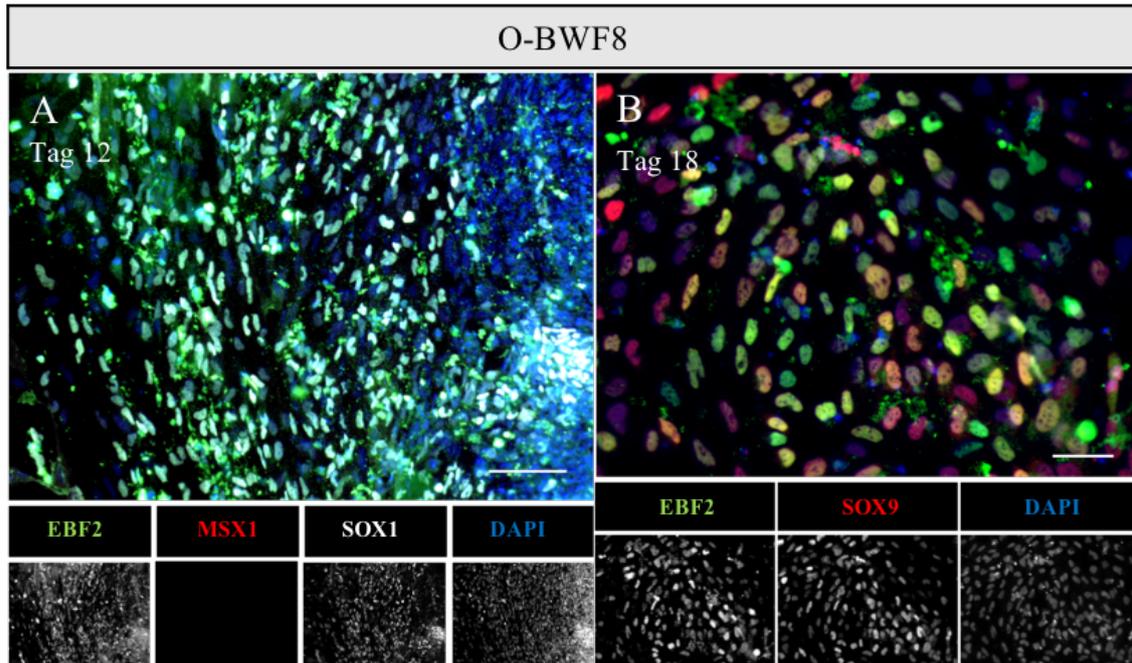


Abbildung 15: EBF2-Analyse der PPR auf Proteinebene

Immunologische Detektion des Markers EBF2 nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8 in nukleärer Lokalisation. An Tag 12 (A) in teilweiser Co-Lokalisation mit SOX1. An Tag 18 (B) in teilweiser Co-Lokalisation mit SOX9. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Maßstab A und C: 50µm,

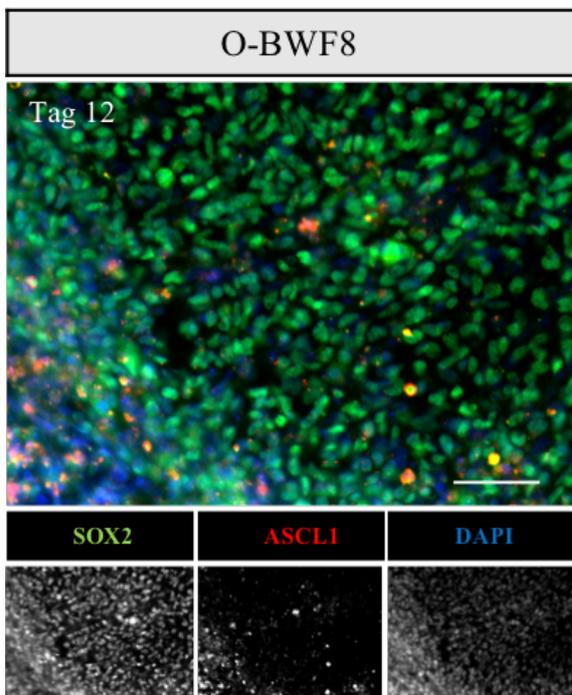


Abbildung 16: SOX2-Analyse der PPR auf Proteinebene

Immunologische Detektion des neuronalen Stammzellmarkers Markers SOX2 nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8 in nukleärer Lokalisation an Tag 20. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI.

Maßstab: 50µm,

4.2.2 Vergleich der Differenzierungsprotokolle O-BWF8 und O-BWF8/TGF hinsichtlich der Generierung einer OP

In den folgenden Abschnitten wird das Protokoll O-BWF8 einerseits auf seine Eignung hinsichtlich der Differenzierung einer OP auf Proteinebene untersucht und andererseits diesbezüglich mit dem Differenzierungsprotokoll O-BWF8/TGF verglichen.

Auf Proteinebene wurden erneut die spezifischen Plakodenmarker SIX1 und SIX4 sowie EYA1 und EYA2 eingesetzt. Auch EBF2, zu den ausgewählten Zeitpunkten spezifisch für die OP, sowie PAX6, anteriorer PPR-Marker wurden erneut eingesetzt. Zusätzlich wurden die Neuralleistenmarker SOX9 und MSX1 zur Kennzeichnung nicht-plakodaler Zelltypen analysiert. Auch SOX1 wurde als Marker für die Linsenplakode erneut zur Abgrenzung zu olfaktorischen Zellen eingesetzt.

Die differenzierten Zellen wurden an Tag 25 und Tag 30/31 auf Proteinebene analysiert. Für die Darstellung der Nuclei wurde einheitlich die Kernfärbung DAPI verwendet.

An Tag 25 konnten in der Differenzierung O-BWF8 weiterhin verteilt gruppierte SIX1-positive Populationen detektiert werden. An Tag 30 lassen sich erstmals flächendeckend deutliche SIX1-positive Populationen analysieren (Abb. 23, C). Auszählungen der nukleären SIX1-Färbungen im Verhältnis zu DAPI-Kernfärbungen wurden mithilfe des CellCounters von ImageJ durchgeführt. In bezeichneten Populationen (vgl. Abb. 23, C) erwiesen sich 86 % der Zellen SIX1-positiv (Abb. 22).

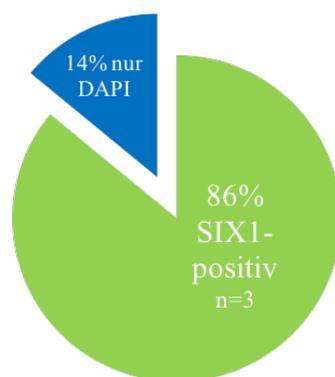


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Auszählung der analysierten SIX1-positiven Zellpopulationen

Schematische Darstellung der Auszählung der analysierten SIX1-positiven Zellen im Verhältnis zu DAPI-positiven Zellen nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8 an Tag 30. In 86 % der Zellen konnten sowohl deutliche nukleäre SIX1-Färbungen detektiert als auch ein gesunder Zellkern mittels DAPI analysiert werden. 14 % der gesunden Zellen wiesen keine SIX1, sondern nur eine DAPI-Färbung auf. Ausgewählt wurden im Zellverbund nur deutlich positive flächendeckende SIX1-positive Zellpopulationen (vgl. Abbildung 23, C), n=3. Ausgezählt mit Hilfe von CellCounter von ImageJ.

Auch in der Differenzierung O-BWF8/TGF lassen sich SIX1-positive Zellpopulationen detektieren, allerdings weitaus vereinzelter und eher in Randbereichen, als flächendeckend wie in O-BWF8.

In der Differenzierung O-BWF8 können sowohl an Tag 25 als auch an Tag 30 SIX4-positive Populationen detektiert werden. Dabei lassen sich zum Teil klare Zellverbundsgrenzen zwischen SIX4-positiven und SIX4-negativen Zelltypen ausmachen. Auch stellen sich sowohl in O-BWF8 als auch in O-BWF8/TGF SIX4-positive Zellen mitunter in einer SIX4-negativen Zellen ober- bzw. unterliegenden Ebene dar (vgl. Abb. 23, C und Abb.24, A). Co-Lokalisationen mit dem phakalen Marker SOX1 lassen sich an Tag 30 nicht eindeutig analysieren. SIX4-negative Zelltypen weisen an Tag 25 nukleäre MSX1-Färbungen auf (Abb. 24, A).

In der Differenzierung O-BWF8 zeigt sich EYA2 an Tag 31 teilweise in nukleärer Färbung, vermehrt im Bereich von Rosetten. Es zeigt sich zudem eine teilweise Co-Lokalisation mit PAX6 an Tag 30 (Abb. 25). Dahingegen können in der Differenzierung O-BWF8/TGF zwar vereinzelt EYA1-positive Populationen detektiert werden, jedoch keine EYA2-positiven Zellen. Jedoch treten sowohl EYA1- als auch EYA2-positive Populationen in beiden Differenzierungsprotokollen eher vereinzelt auf.

EBF2-positive Populationen können in der Differenzierung O-BWF8 sowohl an Tag 25 als auch an Tag 31 eindeutig detektiert werden, auch lässt sich eine Zunahme der positiven Zellen im Zeitverlauf verzeichnen. An Tag 25 weist EBF2 teilweise Co-Lokalisationen mit SOX9 (Neuralleistenmarker) auf. An Tag 31 weisen die EBF2-positiven Zellen teilweise Co-Färbungen mit dem plakodalen Linsenmarker SOX1 auf. Auch in der Differenzierung O-BWF8/TGF lassen sich an Tag 30 EBF2-positive Zellen detektieren, ebenfalls in Co-Lokalisation mit SOX1.

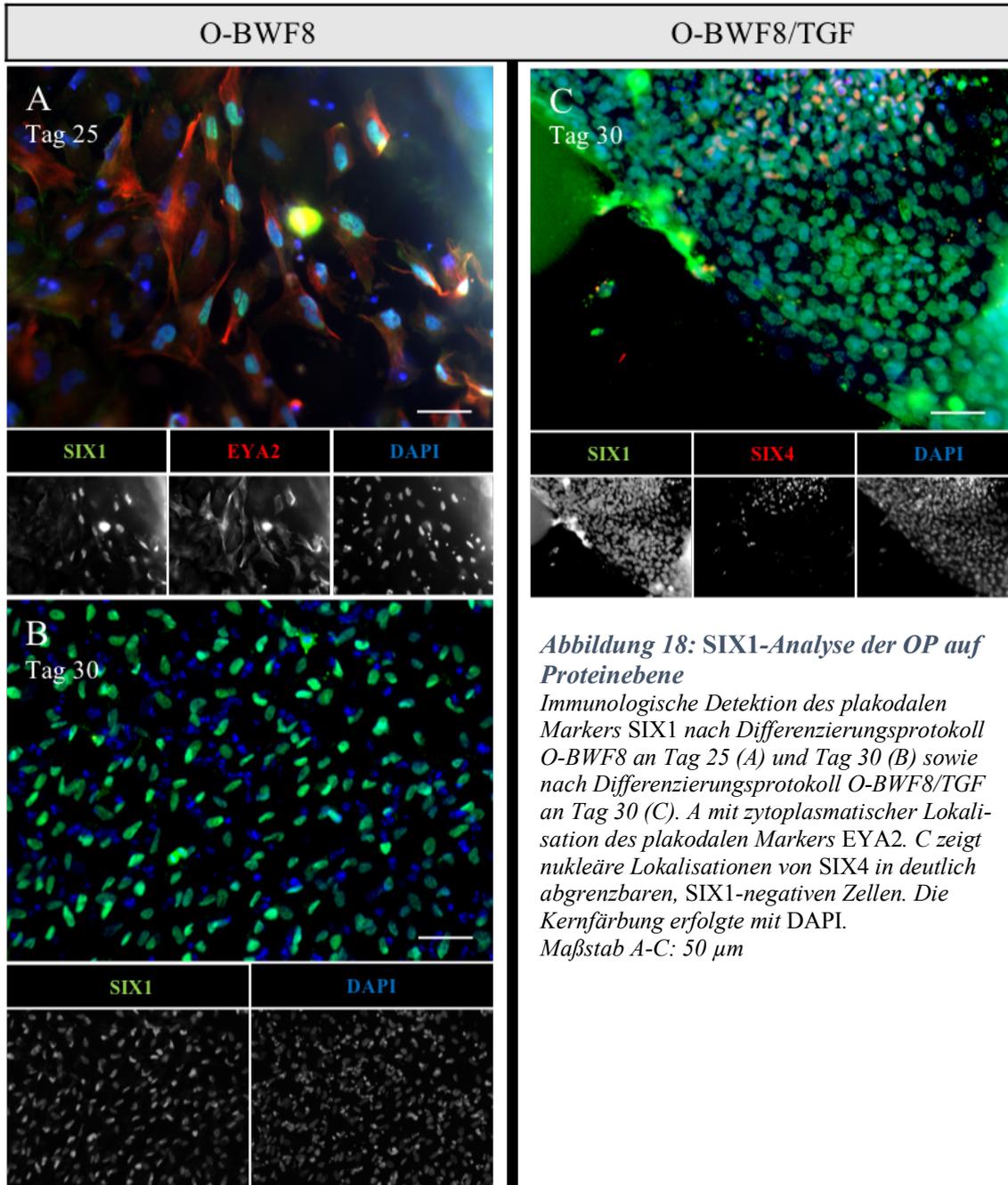


Abbildung 18: SIX1-Analyse der OP auf Proteinebene

Immunologische Detektion des plakodalen Markers SIX1 nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8 an Tag 25 (A) und Tag 30 (B) sowie nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8/TGF an Tag 30 (C). A mit zytoplasmatischer Lokalisation des plakodalen Markers EYA2. C zeigt nukleäre Lokalisationen von SIX4 in deutlich abgrenzbaren, SIX1-negativen Zellen. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Maßstab A-C: 50 μ m

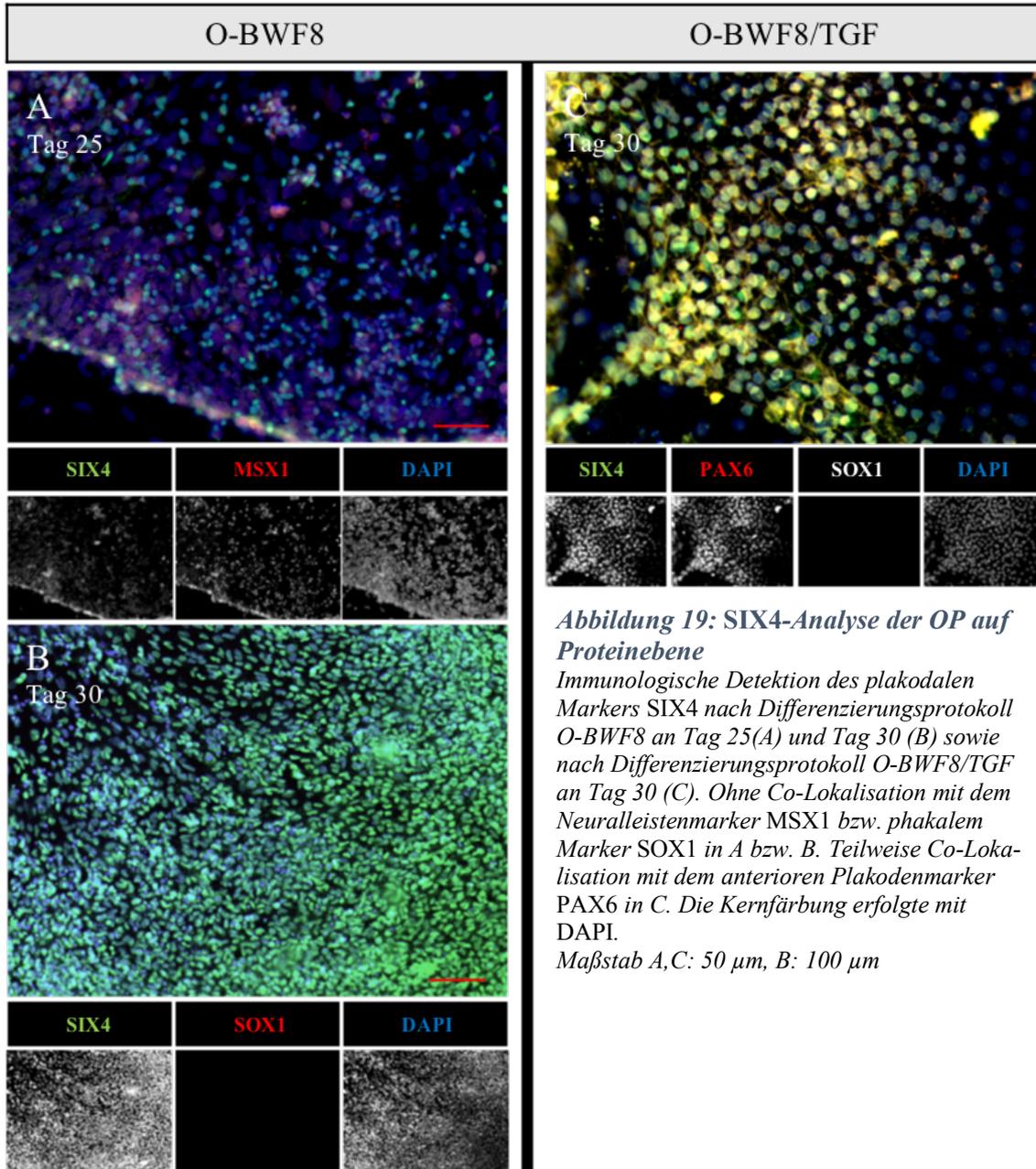


Abbildung 19: SIX4-Analyse der OP auf Proteinebene

Immunologische Detektion des plakodalen Markers SIX4 nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8 an Tag 25 (A) und Tag 30 (B) sowie nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8/TGF an Tag 30 (C). Ohne Co-Lokalisation mit dem Neuralleistenmarker MSX1 bzw. phakalem Marker SOX1 in A bzw. B. Teilweise Co-Lokalisation mit dem anterioren Plakodenmarker PAX6 in C. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI.

Maßstab A,C: 50 µm, B: 100 µm

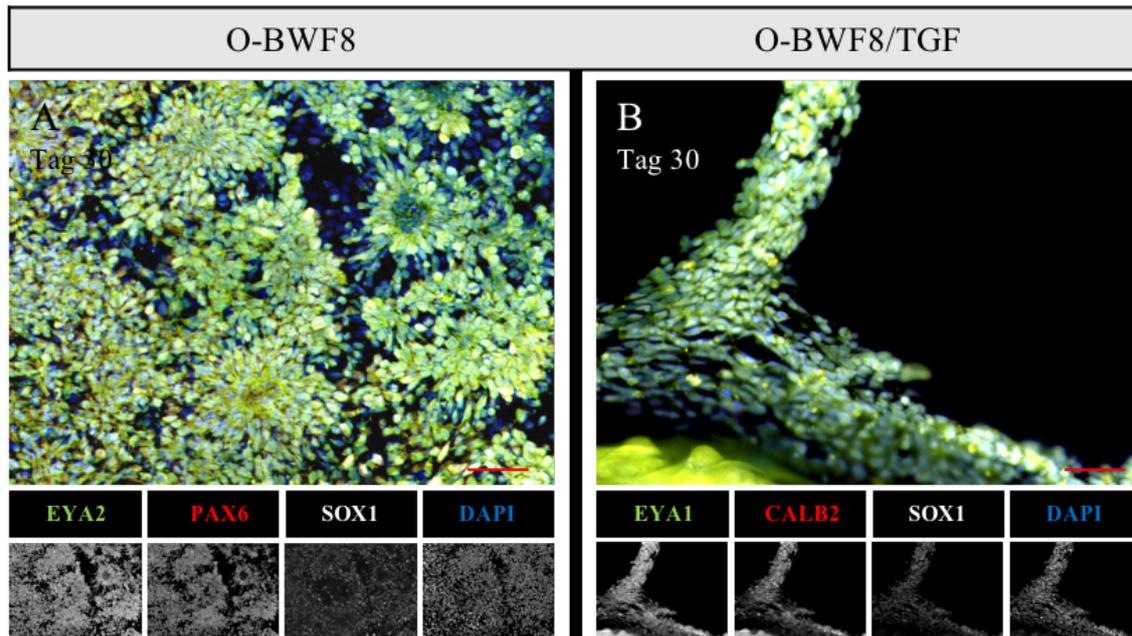
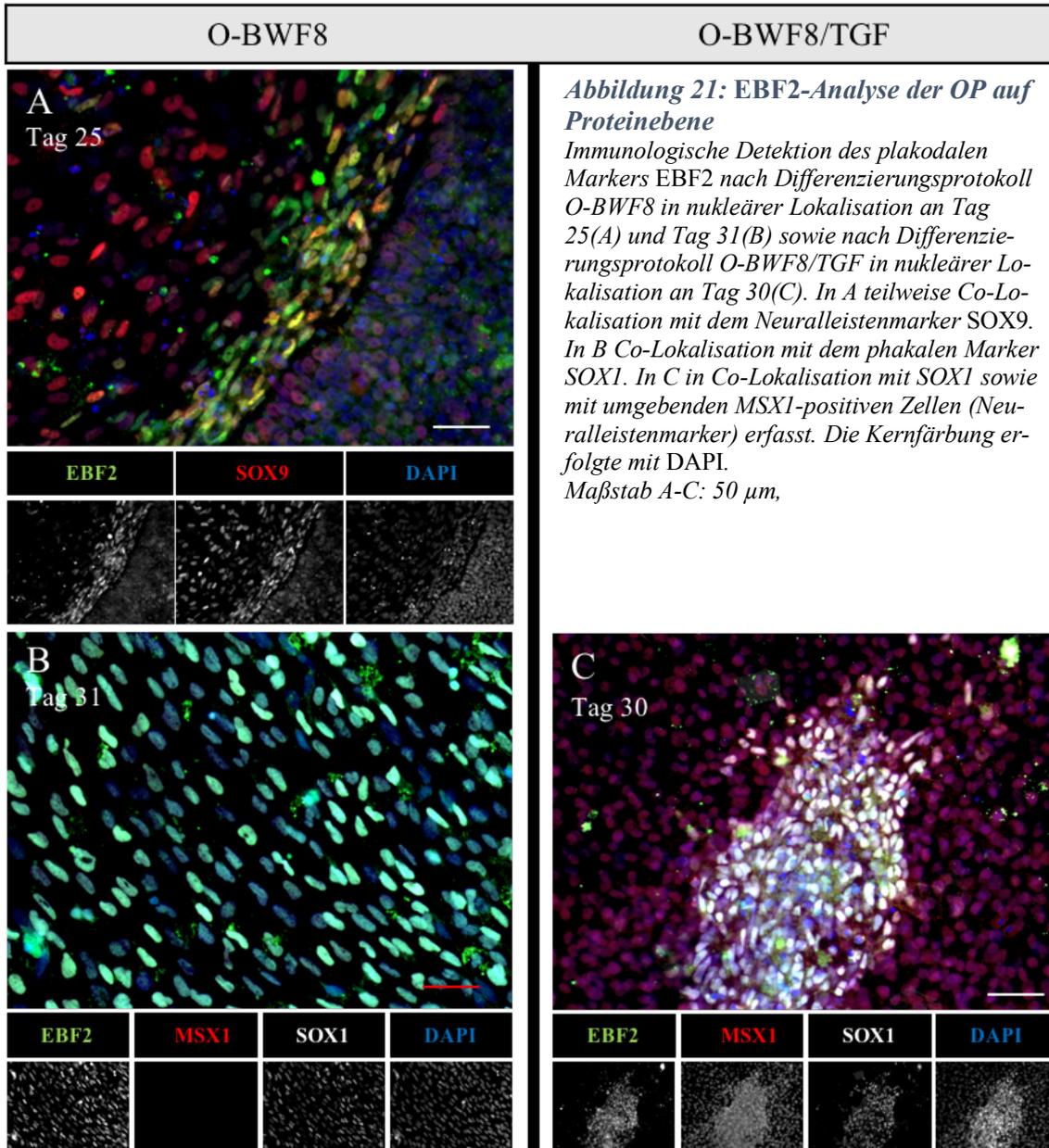


Abbildung 20: EYA-Analyse der OP auf Proteinebene

Immunologische Detektion des plakodalen Markers EYA2 nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8 in nukleärer Lokalisation an Tag 31 (A). Teilweise Co-Lokalisation mit dem anterioren Plakodenmarker PAX6. Keine eindeutige Co-Lokalisation mit dem phakalen Marker SOX1. Immunologische Detektion des plakodalen Markers EYA1 nach Differenzierungsprotokoll O-BWF8/TGF an Tag 20 (B), ohne deutliche Co-Lokalisation mit dem olfaktorischen Progenitormarker CALB2, zum Teil nukleäre Lokalisation von SOX1. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Maßstab A,B: 50µm,



4.2.3 Vergleichende Analyse der Differenzierungsprotokolle O-BWF8 und O-BWF8/TGF hinsichtlich der Auszählung definierter Präparatausschnitte

Um eine statistische Aussage über den Vergleich von Differenzierungsprotokoll O-BWF8 und O-BWF8/TGF treffen zu können, wurden an Tag 12, 18 und 30 differenzierte Zellen ausgezählt. Es wurden die immunhistochemischen Färbungen SIX1, SIX4 und SOX1 sowie die Färbungen EBF2, MSX1 und SOX1 ausgewählt. Dabei wurden pro Tag und pro Färbung jeweils drei Präparate ausgezählt. Es wurde jeweils ein zufälliger Ausschnitt in unmittelbarer Umgebung des zentral ausplattierten EB (Abstand etwa 100 µm)

ausgewählt, um einen Bereich zu standardisieren. Dabei wurde nicht beachtet, dass vor allem die SIX1-positiven Populationen oft lokal begrenzt, über den Zellverbund verteilt, aber eher peripher detektiert werden konnten. Dementsprechend sind diese Auszählungen nicht mit oben genannten spezifischen Auszählungen in bezeichneten Regionen zu vergleichen.

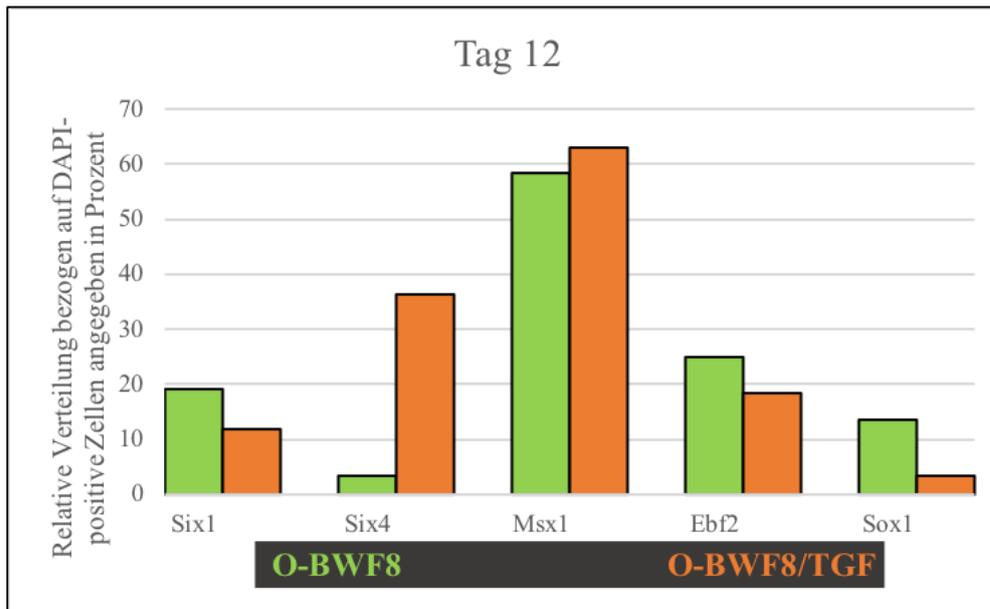


Abbildung 22: Auswertung der Zellauszählung zum Vergleich von O-BWF8 zu O-BWF8/TGF an Tag 12

Prozentual auf alle DAPI-positiven Kerne ausgerechnete nukleäre Färbungen der angegebenen Marker an Tag 12. Unterschiede in der Expression von SIX1 und SOX1 zu Gunsten des Protokolls O-BWF8 und SIX4 zu Gunsten des Protokolls O-BWF8/TGF ersichtlich.

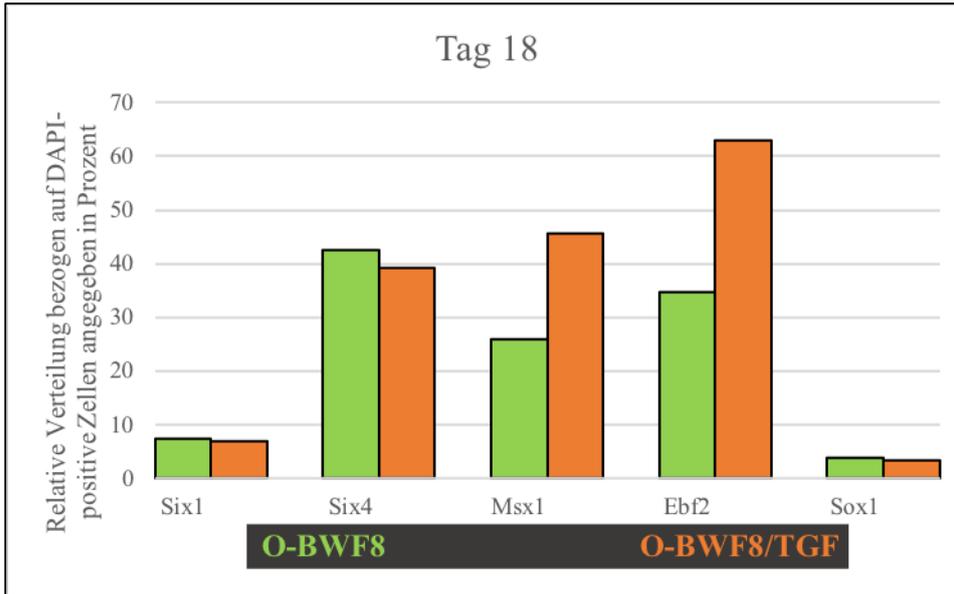


Abbildung 23: Auswertung der Zellauszählung zum Vergleich von O-BWF8 zu O-BWF8/TGF an Tag 18

Prozentual auf alle DAPI- positiven Kerne ausgerechnete nukleäre Färbungen der angegebenen Marker an Tag 18. Deutliche Unterschiede in der Expression von MSX1 und EBF2 zu Gunsten des Protokolls O-BWF8/TGF ersichtlich.

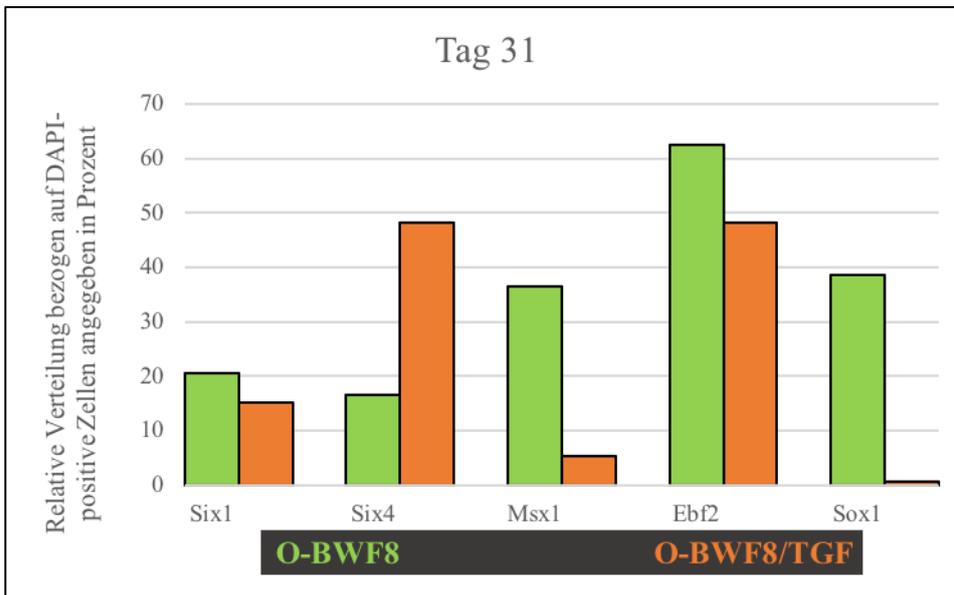


Abbildung 24: Auswertung der Zellauszählung zum Vergleich von O-BWF8 zu O-BWF8/TGF an Tag 31

Prozentual auf alle DAPI- positiven Kerne ausgerechnete nukleäre Färbungen der angegebenen Marker an Tag 31. Deutliche Unterschiede in der Expression von MSX1, EBF2 und SOX1 zu Gunsten des Protokolls O-BWF8 und SIX4 zu Gunsten des Protokolls O-BWF8/TGF ersichtlich.

4.2.4 Morphologischer Vergleich von O-BWF8 und O-BWF8/TGF

Einen Überblick über die morphologischen Unterschiede der Differenzierungsprotokolle O-BWF8 und O-BWF8/TGF erlauben die nachfolgenden Übersichtsbilder. An den Tagen 6, 8, 10, 18 und 30 wurden Durchlichtaufnahmen angefertigt (Abb. 27). An den Tagen 12, 18 und 30 wurden Übersichtsaufnahmen der immunhistochemischen Färbungen angefertigt (Abb. 28).

Die differenzierten Zellen wurden in Abbildung 28 auf SIX1, SIX4 und SOX1 gefärbt. Alle Analysen wurden mit der Kernfärbung DAPI gegengefärbt. Der Fokus der Betrachtung liegt nicht auf der Analyse der Marker, sondern auf den morphologischen Unterschieden der Zellverbände. Alle Embryoid Bodies wurden an Tag 4 auf Matrigel ausplatziert.

An Tag 6 lässt sich feststellen, dass die differenzierten Zellen des Protokolls O-BWF8/TGF flächenmäßig etwas breiter auswachsen (vgl. Abb. 27). An Tag 8 wird deutlich, dass sich in der Differenzierung O-BWF8/TGF deutlich mehr Rosetten entwickeln. Während sich in der Differenzierung des Protokolls O-BWF8 ein deutlicher Zellverbund mit klaren Grenzen aufzeigt, wachsen die Zellen der Differenzierung O-BWF8/TGF unstrukturierter und mit Abbrüchen im Zellverbund aus. Dabei scheinen die differenzierten Zellen des Protokolls O-BWF8 rein morphologisch einem einheitlicheren Zelltyp anzugehören. Im Verlauf bedarf die Zellkultivierung der Differenzierung O-BWF8/TGF größere Vorsicht, die Zellverbände erweisen sich als fragiler und die Zahl der inadhärenten, abgestorbenen Zellen nimmt zu. Die zu Beginn stärkere flächenmäßige Ausbreitung der Differenzierung O-BWF8/TGF ist im Verlauf der Entwicklung stark rückläufig, an Tag 30 ist die Differenzierung O-BWF8/TGF8 nicht so sehr von der Anzahl der vorhandenen Zellen (Mittelwert Zellzahl in 1 Zählfeld in ausgewählter Vergrößerung 1200 μm ; O-BWF8: 464 (n=6) vs. Mittelwert Zellzahl O-BWF8/TGF: 435 (n=6)), sondern vor allem von der Ausbreitung der Zellen her deutlich von Differenzierung O-BWF8 zu unterscheiden. (vgl. Abb. 30 C vs. D) Wie an Tag 30 ersichtlich, scheinen die randständigen Zellen der Differenzierung O-BWF8/TGF wallartige Ansammlungen zu bilden, die Fläche ist stark reduziert. Auffällig viele der Zellen in der Differenzierung O-BWF8/TGF scheinen jetzt morphologisch einem gleichen Zelltyp mit großer runder Zellfläche zu entsprechen. In der Differenzierung O-BWF8 hingegen zeigt sich an Tag 30 eine breitflächige Ausdehnung über das ganze Deckglas hinweg. (Abb. 30). Es zeigen sich verschiedenartige

oft kreisrunde Zellansammlungen, mit ausgedehntem Wachstum nicht nur in der horizontalen, sondern auch in der vertikalen Achse, erkennbar an übereinander liegenden Zellschichten.

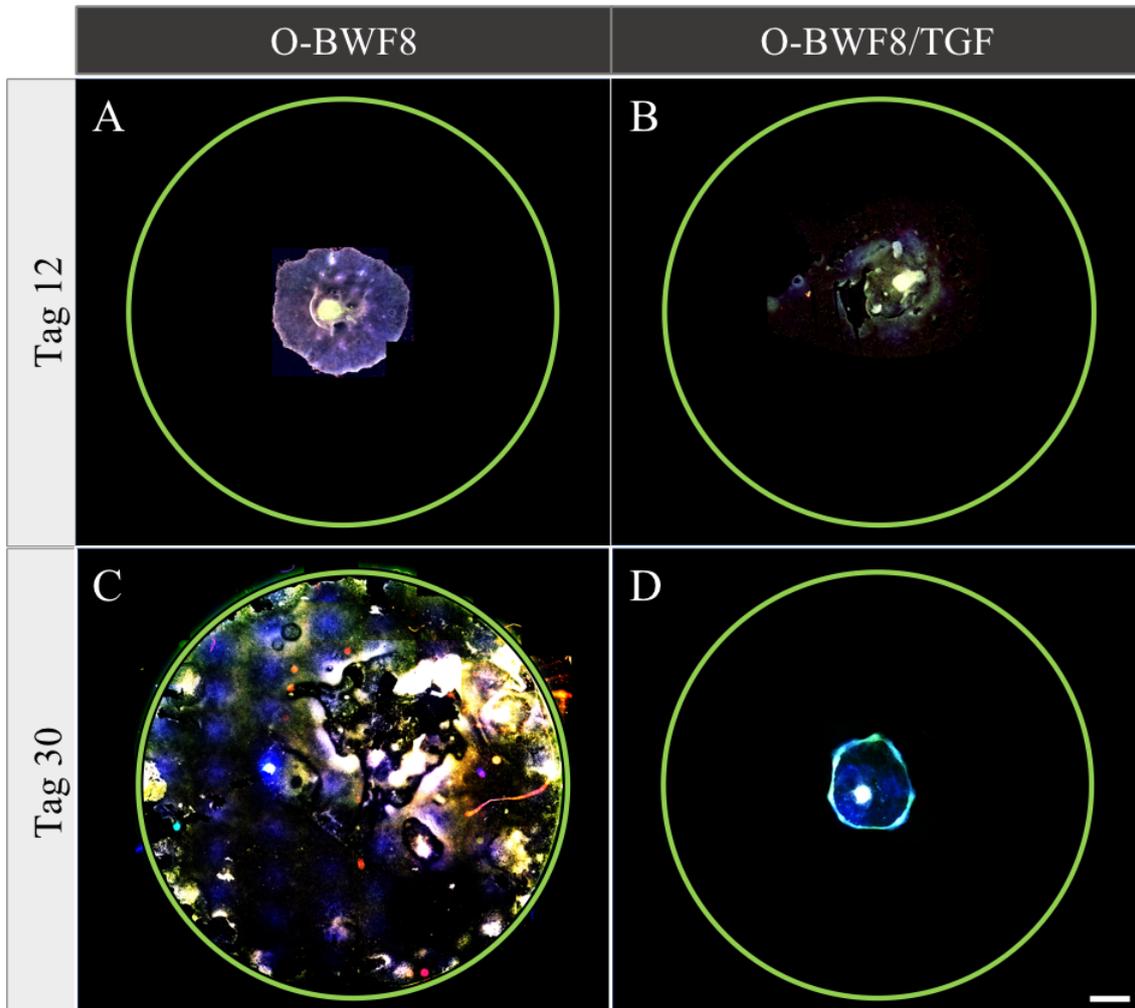


Abbildung 30: Fluoreszenzaufnahme von O-BWF8 und O-BWF8/TGF an Tag 30
Morphologischer Vergleich der Differenzierungen O-BWF8 (A, C) und O-BWF8/TGF (B,D) an den Tagen 12(A,B) und 30 (C,D). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von immunhistochemischen Färbungen mit SIX1 (grün), SIX4 (rot), SOX1 (weiß) und der Kernfärbung DAPI (blau). Maßstab 1200 μ m

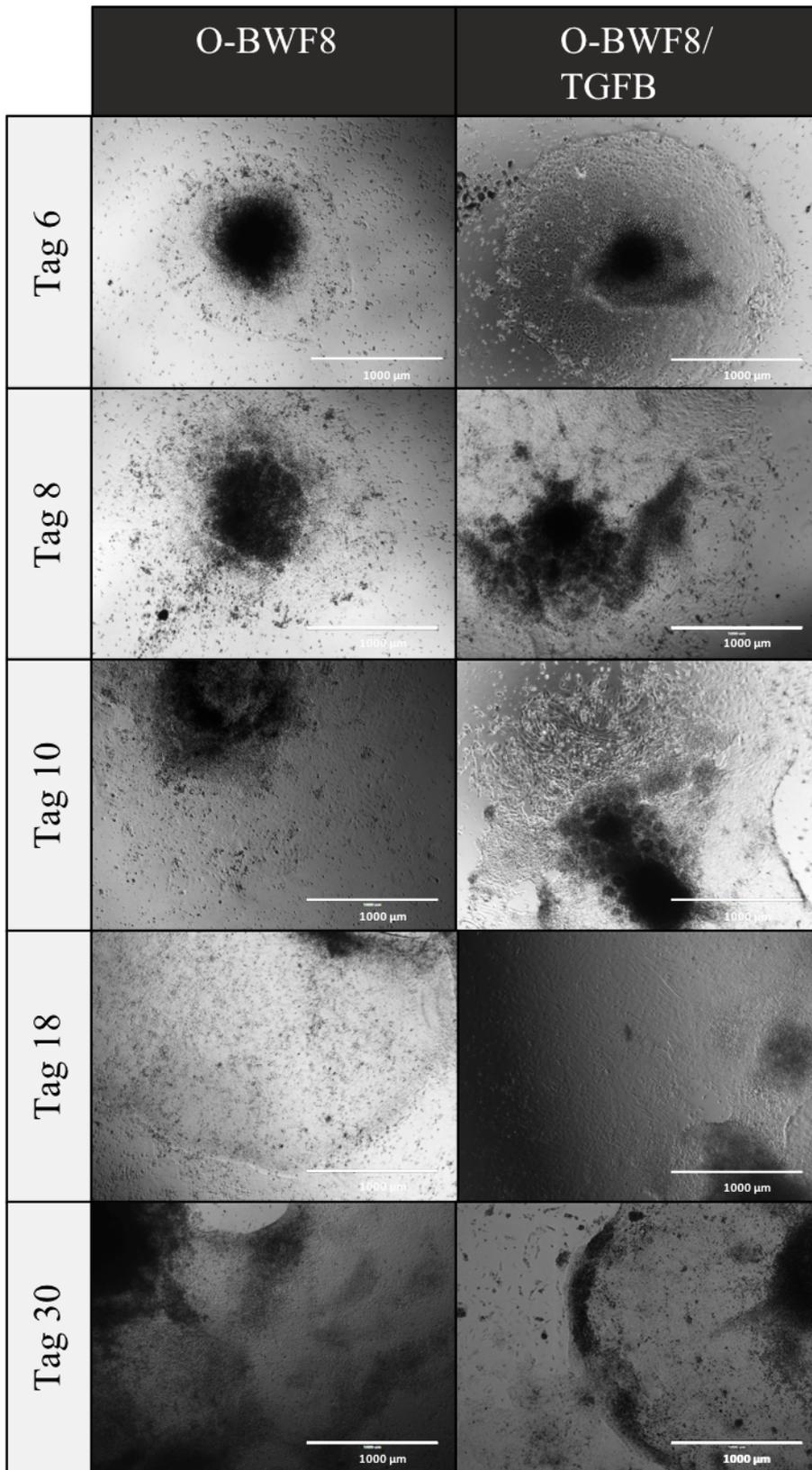


Abbildung 31: Lichtmikroskopische Aufnahmen von O-BWF8 und O-BWF8/TGF
 Gezeigt werden Lichtmikroskopische Aufnahmen der Differenzierungsprotokolle O-BWF8 und O-BWF8/TGF an den Tagen 6, 8, 10, 18 und 30. Der Maßstab ist einheitlich 1000 μm .

4.3 Analyse des Differenzierungsprotokolls O-BWF8 auf RNA-Ebene

Auf Grundlage der Ergebnisse der Kultivierung und Proteinanalyse der Differenzierungsprotokolle O-BWF8 und O-BWF8/TGF wurde eine weiterführende Analyse auf RNA-Ebene nur für die Differenzierung O-BWF8 durchgeführt.

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der RNA-Analyse hinsichtlich der Entwicklung einer PPR sowie einer OP vorgestellt.

Die Expressionsdaten werden im Verlauf an Tag 16, 20, 25 und 30 dargestellt. Die Expressionen von spezifischen Markern werden hier hinsichtlich ihres zeitlichen Verlaufs aufgezeigt. Alle Expressionen wurden auf das Referenzgen GAPDH bezogen. Als Referenzgruppe wurden hiPSZ eingesetzt.

Die differenzierten Zellen wurden auf RNA-Ebene auf die spezifischen PPR-Marker *SIX* und *EYA*, sowie auf die zusätzlichen Marker *DLX5*, *SIX3*, *EBF2* und *FOXP1* hin untersucht. Zusätzlich eingesetzt wurden *SOX1* sowie *FOXE3*.

SIX1 zeigt als spezifischer präplakodaler und plakodaler Marker (mit Ausnahme der Linsenplakode) bis Tag 25 einen flachen Anstieg, um dann an Tag 30 mit vielfacher (ca. 68-fache) Expression aufzufallen. *PAX8* gilt als Marker für die posteriore PPR zeigt wie *SIX3* einen konstanten Anstieg im Expressionsverlauf mit einzeitigem Abfall an Tag 25. *SIX3* wird als wichtiger Marker für die anteriore Plakodenregion gehandelt.

Der präplakodale Marker *EYA2* zeigt einen signifikanten Expressionsanstieg an Tag 16, dann jedoch einen konstanten leicht abfallenden Verlauf. Der präplakodale Marker *EYA1* zeigt konstant ansteigende Expressionsdaten mit Signifikanz an Tag 16.

EBF2, früher Marker für das embryonale Nervensystem und später Marker für olfaktorische Progenitoren zeigt ebenfalls konstant ansteigende Expressionsdaten mit Signifikanz an Tag 20.

DLX5 gilt als wichtiger Faktor bei der Entwicklung der Grenzregion und der Differenzierung der PPR. Es zeigt sich eine deutliche höchste RNA-Expression von *DLX5* an Tag 20 und ein steiler Abfall der Expression an Tag 25.

Die Expressionsdaten von *FOXE3*, Marker für die PPR, spezifisch für die frühe Linsenplakode, zeigen einen steilen Expressionsgipfel an Tag 25 mit anschließender starker Reduktion der Ausprägung an Tag 30. Dabei fallen die Expressionsdaten unter die Ergebnisse von Tag 20.

Die Expressionsanalysen von *SOX1* zeigen einen konstant ansteigenden Verlauf mit ebenfalls drastischem Peak an Tag 25. Anschließend reduziert sich die RNA-Expression, zeigt aber im Vergleich zu Tag 20 weiterhin erhöhte Expressionen.

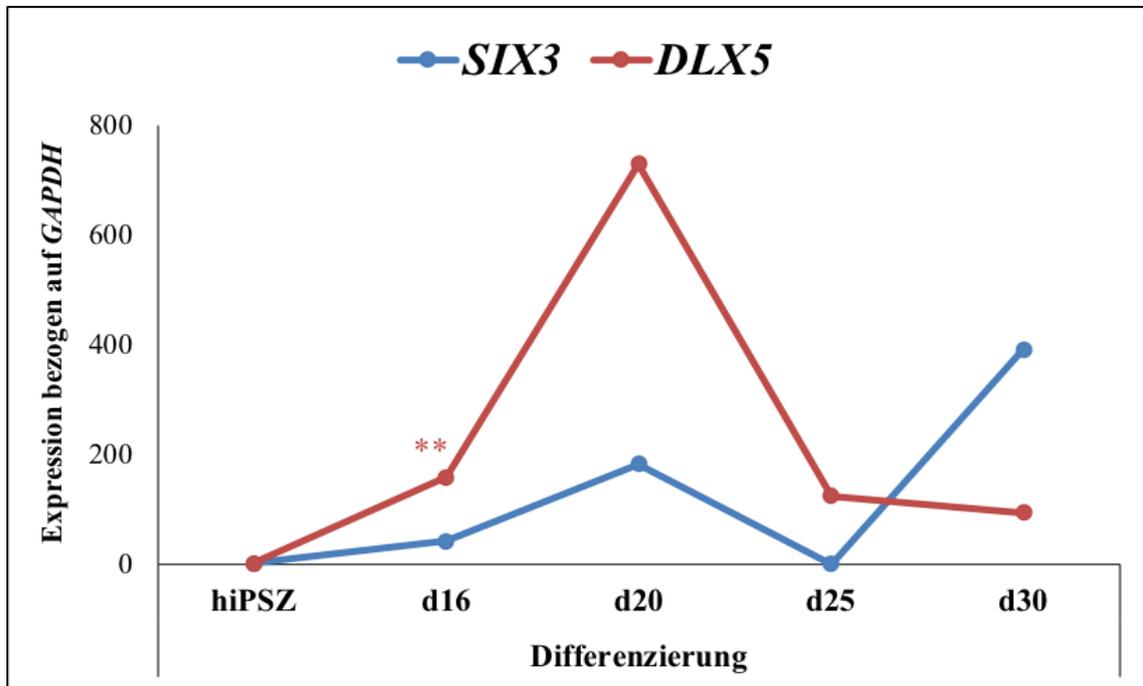


Abbildung 25: *SIX3* und *DLX5* Genexpressionsanalyse

Die Grafik zeigt die relative RNA-Expression von *SIX3* und *DLX5* an den Tagen 16, 20, 25 und 30. Die Daten sind bezogen auf hiPSZ und mit dem Referenzgen *GAPDH* verrechnet. Die Signifikanz bezieht sich auf hiPSZ: $p \leq 0,005$: **

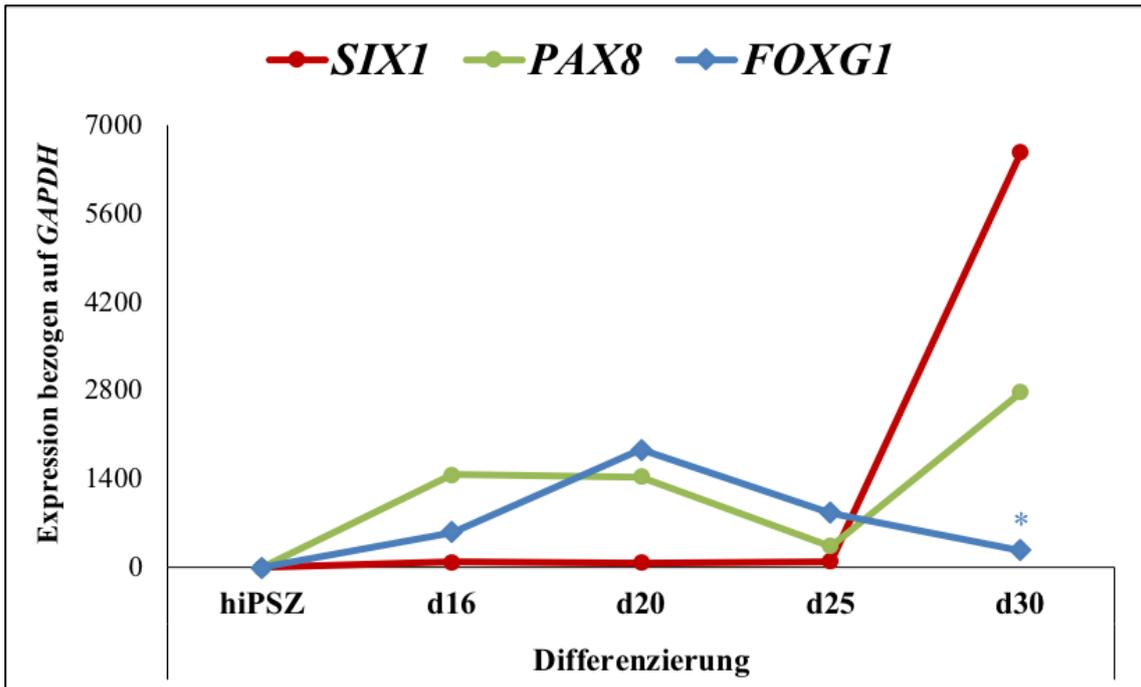


Abbildung 26: SIX1, PAX8 und FOXG1 Genexpressionsanalyse

Die Grafik zeigt die relative RNA-Expression von SIX1, PAX8 und FOXG1 an den Tagen 16, 20, 25 und 30. Die Daten sind bezogen auf hiPSZ und mit dem Referenzgen GAPDH verrechnet. Die Signifikanz bezieht sich auf hiPSZ: $p \leq 0,05$: *

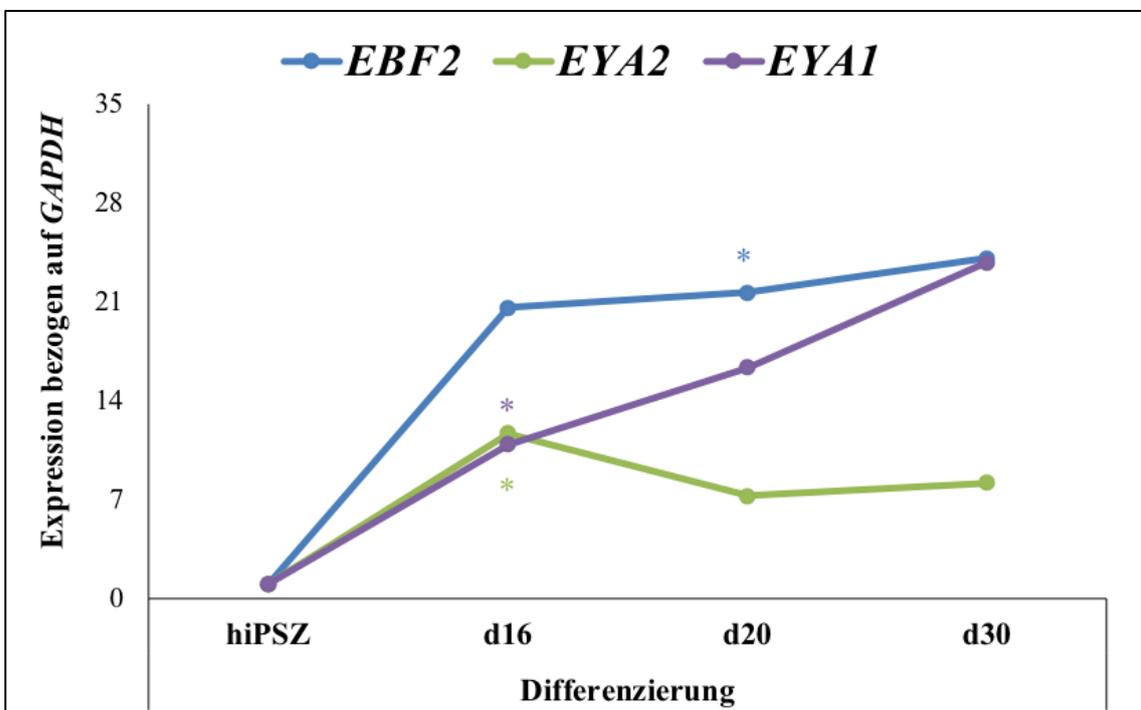


Abbildung 27: EBF2, EYA2 und EYA1 Genexpressionsanalyse

Die Grafik zeigt die relative RNA-Expression von EBF2, EYA2 und EYA1 an den Tagen 16, 20 und 30. Die Daten sind bezogen auf hiPSZ und mit dem Referenzgen GAPDH verrechnet. Die Signifikanz bezieht sich auf hiPSZ: $p \leq 0,05$: *

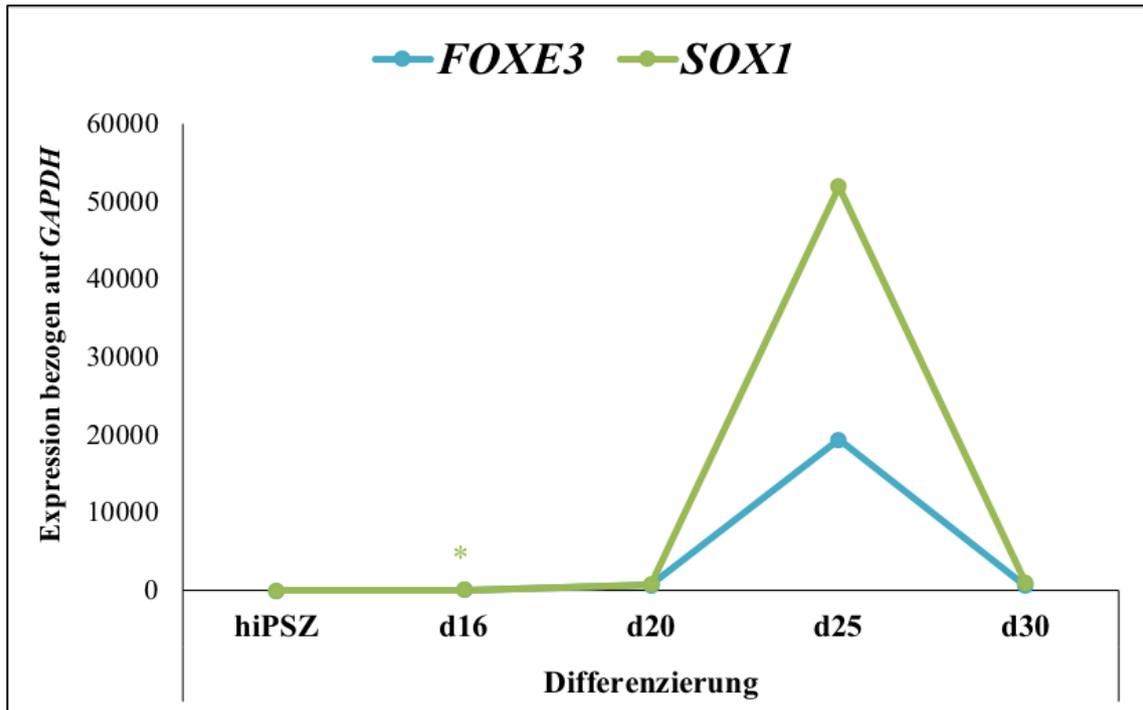


Abbildung 28: FOXE3 und SOX1 Genexpressionsanalyse

Die Grafik zeigt die relative RNA-Expression von FOXE3 und SOX1 an den Tagen 16, 20, 25 und 30. Die Daten sind bezogen auf hiPSZ und mit dem Referenzgen GAPDH verrechnet. Die Signifikanz bezieht sich auf hiPSZ: $p \leq 0,05$: *

4.3.4 Zusammenführende Analyse des Differenzierungsprotokolls O-BWF8 hinsichtlich der Generierung der PPR

Zusammenfassend konnten die präplakodalen Marker SIX1 sowie EYA2 auf Protein- und RNA-Ebene detektiert werden, wobei sich EYA2 jedoch nur zytoplasmatisch darstellt. Während SIX4-positive Zellen bereits ab Tag 12 analysiert werden können, können einzelne SIX1-positive Zellen erst ab Tag 15 detektiert werden. Auf RNA Ebene konnte zusätzlich *EYA1* detektiert werden. Eine gesteigerte Expression von *SIX4* konnte jedoch auf RNA-Ebene nicht detektiert werden.

Auch der neuroembryonale Marker EBF2 lässt zu diesen Zeitpunkten bereits analysieren. Zum Teil liegen Co-Lokalisationen der präplakodalen Marker untereinander, sowie auch mit den Markern MSX1, SOX1, SOX9 vor.

4.3.5 Zusammenführende Analyse des Differenzierungsprotokolls O-BWF8 an Tag 25 und 30

Zusammenfassend lassen sich an Tag 25 und 30 sowohl auf Proteinebene als auch auf RNA-Ebene weiterhin positive SIX1-Signale analysieren. Dabei zeigen die Ergebnisse

wesentlich stärkere Signale an Tag 30, einerseits mit erhöhter Expression auf RNA-Ebene, andererseits mit flächendeckender nukleärer Lokalisation in der immunhistochemischen Färbung.

SIX4 lässt sich weiterhin auf Proteinebene detektieren, zu diesen späteren Zeitpunkten jedoch vermehrt ohne Co-Lokalisation mit neuronalen Markern. Auf RNA-Ebene bleibt die Expression aus. *EYA1* und *EYA2* lassen sich weiterhin auf RNA-Ebene detektieren, auf Proteinebene zeigt *EYA2* an Tag 30 auch nukleäre Lokalisationen.

EBF2 lässt sich als Marker für olfaktorische Vorläuferzellen sowohl auf Protein-, als auch auf RNA-Ebene mit ansteigendem Expressionsverlauf analysieren. Der ebenfalls spezifische olfaktorische Marker für Vorläuferzellen *FOXG1* lässt sich ebenfalls auf RNA-Ebene detektieren.

Auch eine starke Ausprägung der Linsenmarker *FOXE3* und *SOX1* an Tag 25 sowie ein deutlicher Expressionsanstieg des posterioren Plakodenmarkers *PAX8* an Tag 30 wurden analysiert.

4.4. Generierung olfaktorischer Rezeptorneurone

Im folgenden Abschnitt wird untersucht, ob im Rahmen der *in vitro* Differenzierung mit dem Protokoll O-BWF8/RA ORN generiert werden können. Dabei wurden die Zellen im Langzeitversuch bis Tag 140 kultiviert. Protokoll O-BWF8/RA weicht dabei von Protokoll O-BWF8 hinsichtlich der Beschichtung, eines verlängerten Einsatzes des BMP4-Antagonisten Dorsomorphin und der Zugabe von Retinsäure sowie neurotrophen Substanzen ab (vgl. Tabelle 2.7). Die differenzierten Zellen wurden auf Proteinebene und auf RNA-Ebene zu den Zeitpunkten Tag 78, Tag 100, Tag 120 und Tag 140 analysiert.

Besonderes Augenmerk liegt dabei auf dem Marker OMP, der als spezifisch für reife ORN angesehen wird.

4.4.1 Analyse des Differenzierungsprotokolls O-BWF8/RA auf Proteinebene

Auf Proteinebene wurden alle Analysen neben OMP zusätzlich auf den neuronalen Marker TUBB3 hin analysiert, welcher hier als Abgrenzung reifer ORN zu anderen Neuronen herangezogen wird. Definiert wurden ORN als bipolare Neurone mit positiver OMP-Färbung und negativer TUBB3-Färbung. Zusätzlich wurden auf Proteinebene Faktoren der

olfaktorischen Signalkaskade (GOLF und TMEM16B), Marker heranreifender ORN (CALB2) sowie weitere Marker reifer Neurone (NCAM2) zur Analyse herangezogen. Die differenzierten Zellen wurden auf Proteinebene an Tag 100, 120 und 140 auf die spezifischen Marker hin analysiert.

Auf Proteinebene können ab Tag 100 OMP-positive Neurone ohne Co-Lokalisation mit TUBB3 detektiert werden (Abb. 36). Die Neurone besitzen eine eindeutige bipolare Morphologie (vgl. Abb. 38). An Tag 100 können außerdem NCAM2-positive Zellen in Co-Färbung mit OMP, ohne TUBB3 Co-Färbung detektiert werden. Auch an Tag 120 lassen sich Populationen von OMP-positiven, TUBB3-negativen bipolaren Neuronen analysieren. Es können auch OMP-positive sowie TUBB3-positive Neurone an Tag 120 detektiert werden, die zusätzlich CALB2, einen Vorläufermarker, exprimieren. Diese Art der Neurone werden hier als ORN in einer intermediären Reifungsstufe eingestuft. TMEM16B-positive Neurone treten kaum auf, wenn, dann mit Lokalisation im Zellkörper. Die erwartete Lokalisation von TMEM16B in den Dendriten der Neurone konnte nicht detektiert werden.

Die OMP-positiven und TUBB3-negativen Neurone sind morphologisch bipolar und nicht nur einzeln in der Kultur zu finden, sondern in kleinen Populationen angeordnet. Eine Präferenz der Lokalisation oder der Anordnung der Populationen lässt sich nicht feststellen. Die Populationen scheinen an Tag 140 zuzunehmen und größer zu werden, eine Auszählung wurde jedoch nicht durchgeführt.

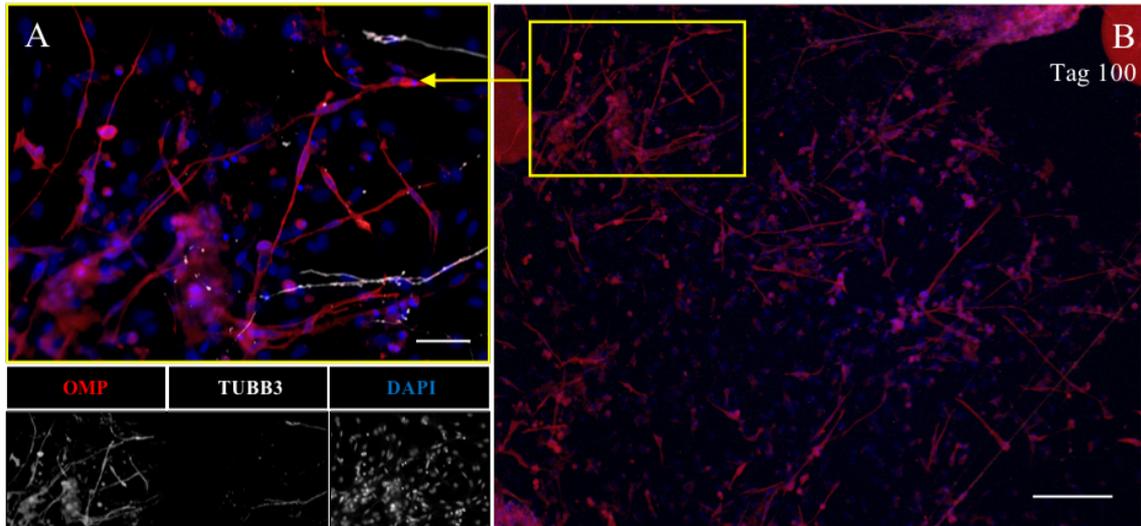


Abbildung 29: OMP-Analyse auf Proteinebene an Tag 100 – Übersichtsbild gruppierter ORN
 Immunologische Detektion von OMP (rot) an Tag 100 in bipolaren Neuronen ohne Co-Lokalisation mit TUBB3 (weiß). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. A Vergrößerungsaufnahme von B. Maßstab A: 50 μm , B: 200 μm

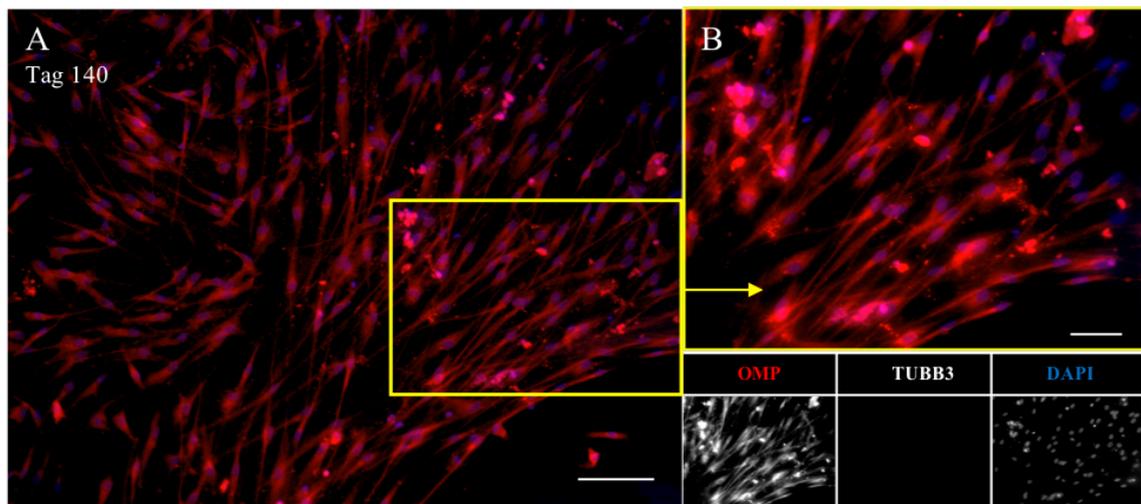


Abbildung 30: OMP-Analyse auf Proteinebene an Tag 140 – Übersichtsbild gruppierter ORN
 Immunologische Detektion von OMP (rot) an Tag 140 in bipolaren Neuronen ohne Co-Lokalisation mit TUBB3. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. B Vergrößerungsaufnahme von A. Maßstab A: 100 μm , B: 50 μm

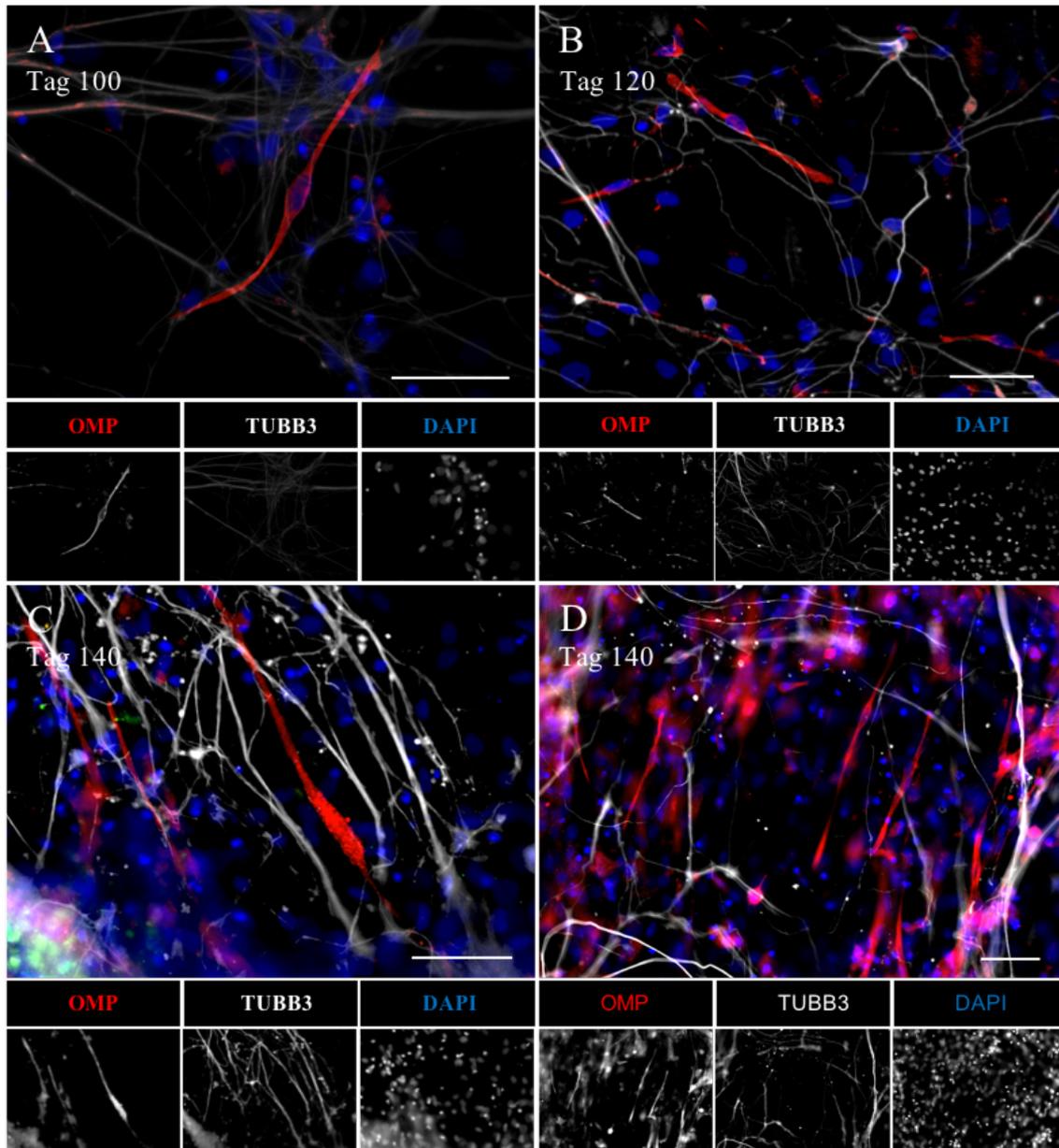


Abbildung 31: Darstellung bipolarer Neurone - Proteinanalyse von OMP und TUBB3 an Tag 100, 120 und 140

Immunologische Detektion von OMP (rot) an Tag 100 (A), 120 (B) und Tag 140 (C, D) in bipolaren Neuronen ohne Co-Lokalisation mit TUBB3 (weiß). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Maßstab A-D: 50 μ m

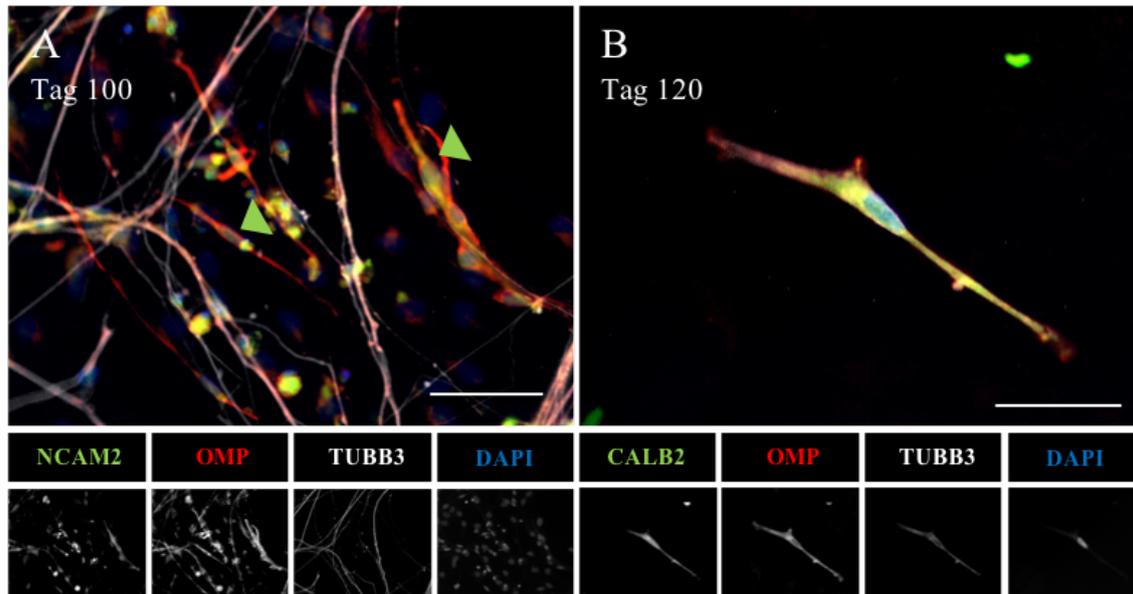


Abbildung 32: NCAM2- und CALB2- Analyse auf Proteinebene an Tag 100 und 120
 Immunologische Detektion von NCAM2 (A) an Tag 100 in bipolaren Neuronen in Co-Lokalisation mit OMP, ohne CO-Lokalisation mit TUBB3. Detektion von CALB2 an Tag 120 (C) in einem bipolaren Neuron mit Co-Lokalisation von OMP und TUBB3. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Maßstab A-D: 50 µm

4.4.2 Analyse der RNA-Expressionen des Differenzierungsprotokolls O-BWF8/RA im Verlauf

Im Folgenden werden die RNA-Expressionsdaten im Verlauf an Tag 78, Tag 100 und Tag 120 dargestellt. Die Expressionen von *OMP*, *TUBB3*, *TMEM16B*, *GOLF*, *NCAM2* und *CALB2* wurden bestimmt. Zusätzlich wurden weitere Marker für olfaktorische Vorläufergene (*EBF2*, *ASCL1*, *NGN1*, *NEUROD1*) sowie zwei olfaktorische Rezeptorgene (*ORIG1*, *OR1A1*) analysiert. Alle Expressionen wurden auf das Referenzgen *GAPDH* bezogen. Als Referenzexpression werden hiPSZ eingesetzt.

Die Marker für reife Neurone *NCAM2* und *TUBB3* zeigen in der Analyse einen vergleichbaren Verlauf mit bereits erheblich gesteigerter Expression an Tag 78. Auch *OMP*, das Markerprotein für reife ORN, zeigt bereits an Tag 78 einen eindeutigen Anstieg der Expression. Ähnlich zum Verlauf der Expression von *NCAM2* und *TUBB3* stellt sich ein Abfall der Expressionsdaten an Tag 100 mit erneuter steiler Zunahme der Expression an Tag 120 dar. Auch die Expressionen der olfaktorischen Rezeptorgene *ORIG1* und *OR1A1* zeigen einen vergleichbaren Verlauf. Die RNA-Expression von *GOLF*, Faktor der olfaktorischen Signalkaskade, zeigt einen leichten Anstieg an Tag 78 und anschließend einen konstanten bis leicht abfallenden Verlauf.

Die Expressionsdaten der olfaktorischen Vorläufergene *EBF2*, *CALB2*, *ASCL1*, *NGN1* und *NEUROD1* zeigen einen ähnlichen Verlauf wie *OMP* mit signifikantem Anstieg an Tag 120. *FOXG1*, ebenfalls Marker für olfaktorischer Vorläufer, zeigt seine höchste RNA-Expression an Tag 100. Die Expressionsverläufe deuten eventuell darauf hin, dass die olfaktorischen Neuronenpopulationen an Tag 100 einer vergleichsweise geringeren Ausprägung unterliegen.

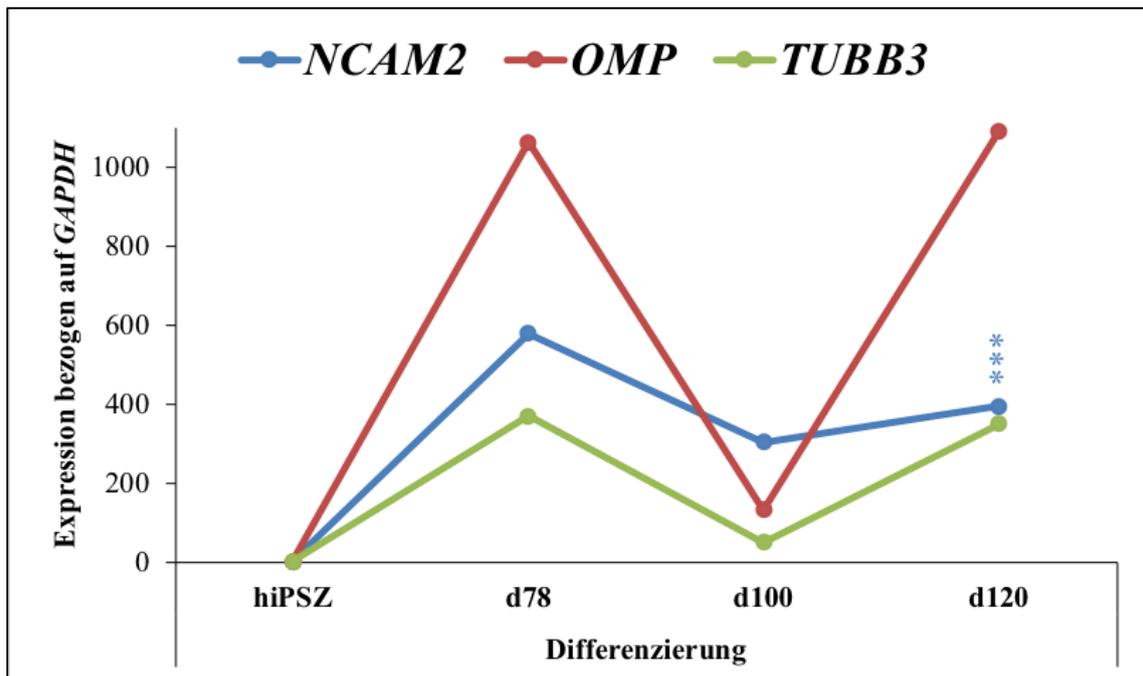


Abbildung 33: NCAM2, OMP und TUBB3 Genexpressionsanalyse

Die Grafik zeigt die relative RNA-Expression von NCAM2, OMP und TUBB3 an den Tagen 78, 100 und 120. Die Daten sind bezogen auf hiPSZ und mit dem Referenzgen GAPDH verrechnet. Die Signifikanz bezieht sich auf hiPSZ: $p \leq 0,005$: ***

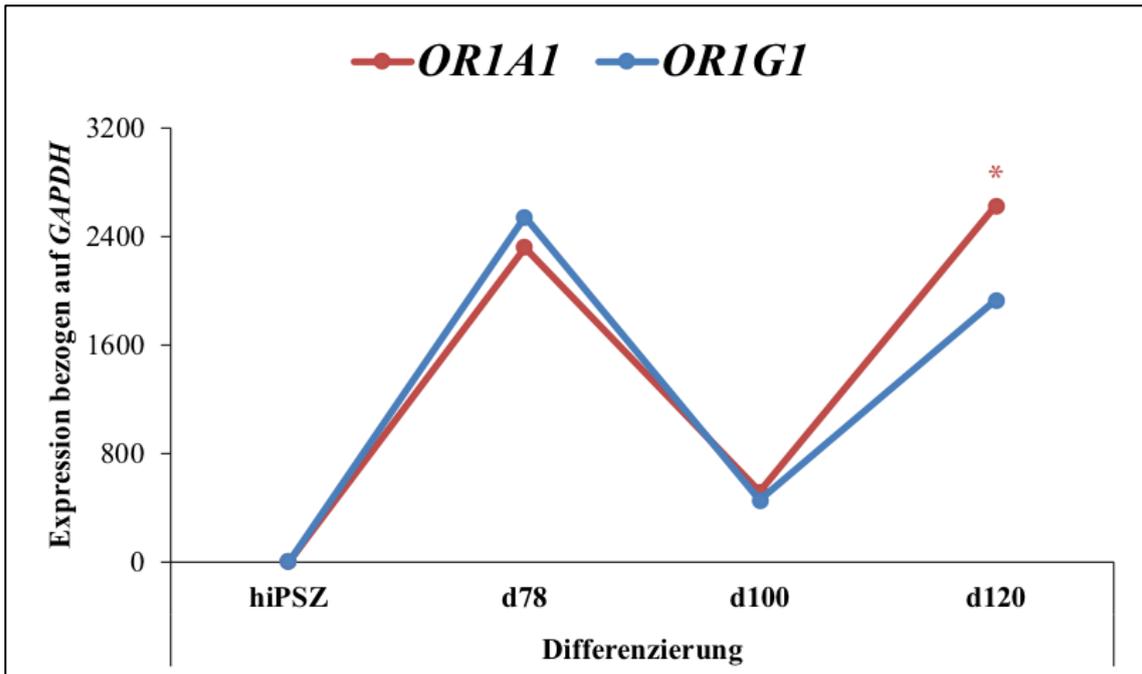


Abbildung 34: OR1A1 und ORIG1 Genexpressionsanalyse

Die Grafik zeigt die relative RNA-Expression von OR1A1 und ORIG1 an den Tagen 78,100 und 120. Die Daten sind bezogen auf hiPSZ und mit dem Referenzgen GAPDH verrechnet. Die Signifikanz bezieht sich auf hiPSZ: $p \leq 0,05$: *

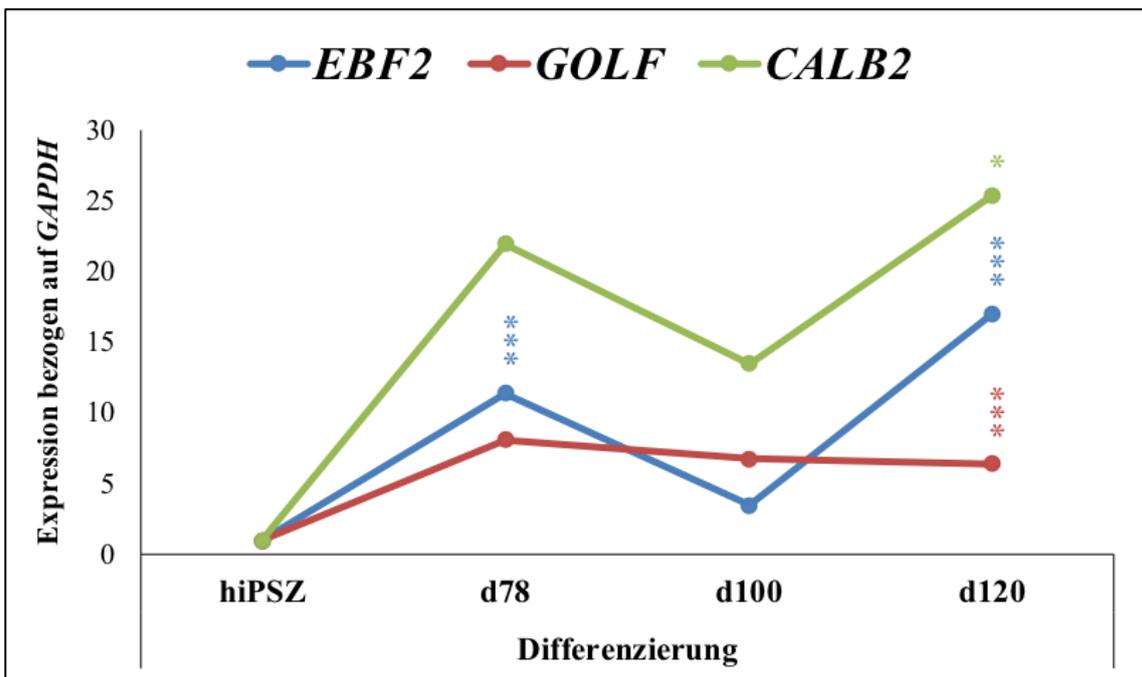


Abbildung 35: EBF2, GOLF und CALB2 Genexpressionsanalyse

Die Grafik zeigt die relative RNA-Expression von EBF2, GOLF und CALB2 an den Tagen 78,100 und 120. Die Daten sind bezogen auf hiPSZ und mit dem Referenzgen GAPDH verrechnet. Die Signifikanz bezieht sich auf hiPSZ: $p \leq 0,05$: *, $p \leq 0,005$: ***

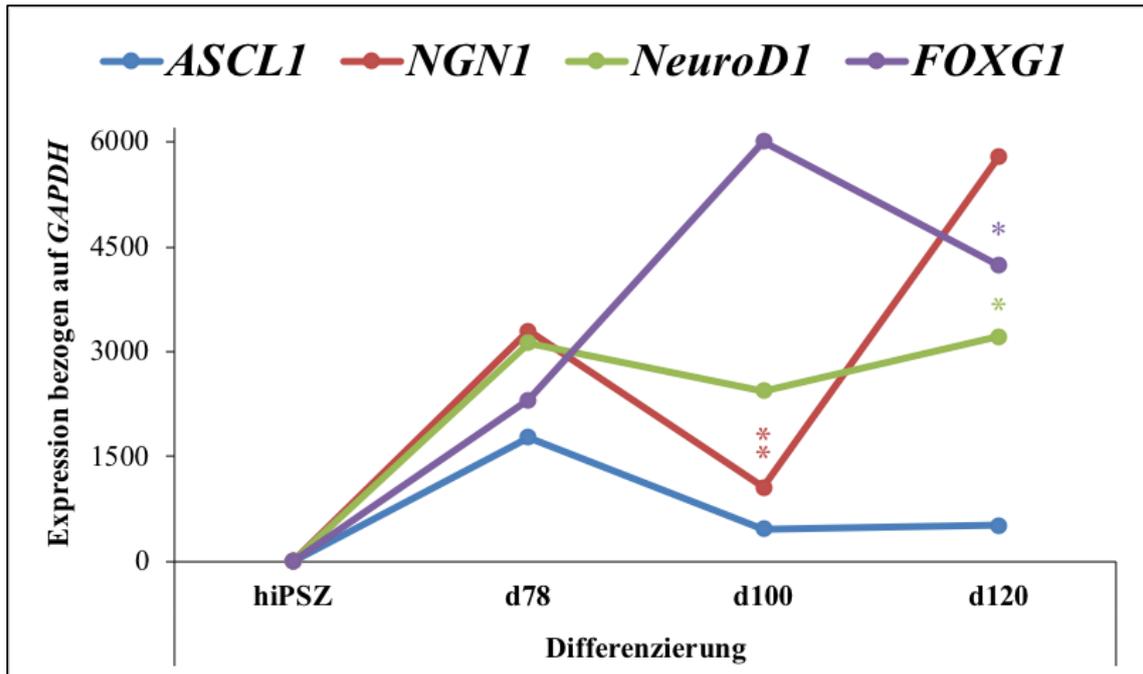


Abbildung 36: ASCL1, NGN1, NEUROD1 und FOXG1 Genexpressionsanalyse

Die Grafik zeigt die relative RNA-Expression von ASCL1, NGN1 und NEUROD1 an den Tagen 78, 100 und 120. Die Daten sind bezogen auf hiPSZ und mit dem Referenzgen GAPDH verrechnet. Die Signifikanz bezieht sich auf hiPSZ: $p \leq 0,05$: *, $p \leq 0,01$: **

4.4.4 Zusammenführende Analyse des Differenzierungsprotokolls O-BWF8/RA

Sowohl auf Proteinebene als auch auf RNA-Ebene konnten deutlich OMP-positive Signale nachgewiesen werden. In der immunhistochemischen Färbung zeigten sich auch morphologisch typische bipolare Neurone, teils vereinzelt, teils in Populationen angeordnet. Es konnte ein deutlicher Expressionsanstieg aller getesteten Vorläufermarker auf RNA-Ebene detektiert werden. Auch bei den Markern der olfaktorischen Rezeptoren sowie der olfaktorischen Signalkaskade konnte ein deutlicher Expressionsanstieg analysiert werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Differenzierungsprotokoll O-BWF8/RA dazu geeignet ist, sowohl auf Proteinebene OMP-positive Neurone zu generieren, als auch auf RNA-Ebene alle getesteten Marker für olfaktorische Vorläuferneurone und ORN in gesteigerter Expression zu detektieren.

5. Diskussion

Humane induziert pluripotente Stammzellen (hiPSZ) stellen eine enorme Errungenschaft für den Fortschritt der Stammzellforschung dar. Die Technik bietet im Vergleich zu embryonalen Stammzellen die Möglichkeit einer ethisch weitaus unbedenklicheren Forschung mit einer großen Zahl an Wiederholungs- und Anpassungsmöglichkeiten. Dabei ist die Stammzellforschung mit hiPSZ, mit der Entdeckung durch Takahashi et al. im Jahr 2007 [17] ein sehr junges Feld und auch die Differenzierung sensorischer Systeme ist noch unausgereift. Nach heutigem Wissenstand erfolgte bislang keine erfolgreiche spezielle Generierung von olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) aus der hiPSZ-Differenzierung außerhalb der Forschungsgruppe Scensation der Neuroanatomie Tübingen. *In vitro* Modelle anderer sensorischer Systeme aus hiPSZ und embryonalen Stammzellen, wie z.B. reife Linsenfaser, trigeminale Neurone, hormonproduzierende Adenohypophysenzellen und otische Vorläuferzellen konnten bereits generiert werden [22, 23, 40]. Olfaktorische Modelle aus embryonalen Mausstammzellen konnten mithilfe der Zugabe von adultem Gewebe bereits erfolgreich induziert werden [85].

Die Komplexität der embryologischen Entwicklung und des Zusammenspiels aus induzierenden Faktoren erschwert eine olfaktorische Differenzierung *in vitro* ohne Gewebeszusätze. Nichtsdestotrotz sind eine tiefere Analyse und ein Nachvollziehen der embryologischen Vorgänge sowie die Generierung olfaktorischen Gewebes ungemein wichtig. Dabei wird gewährleistet, in Zukunft ein besseres Verständnis sowohl für das Riechen an sich entwickeln zu können, als auch Modelle zur Erforschung von Krankheiten, von Behandlungskonzepten und Medikamenten zu erschaffen.

Das Ziel dieser Arbeit ist, ORN und ihre embryologischen Entwicklungsschritte, die präplakodale Region (PPR) und die olfaktorische Plakode (OP) zu erfassen.

Im Folgenden werden die Auswertungen diskutiert, sowie die verwendeten induzierenden Signalwege und die zur Analyse herangezogenen Marker hinsichtlich ihrer Eignung betrachtet.

5.1 Kulturverhältnisse

Nicht ganz eindeutig ist die Entscheidung über den Zeitpunkt der Anwendung der verschiedenen Zusätze. Im Differenzierungsprotokoll O-BWF8 werden im ersten Schritt EBs generiert, welche als 3D-Kultur in den ersten 4/5 Tagen eine adäquate Differenzierung nach möglichst naturgemäßem Modell ermöglichen sollen. Die dreidimensionale Kultur ermöglicht die Entstehung von komplexen Zelladhäsionen und parakriner Signaltransduktion, welche die Differenzierung und Morphogenese von nativem Gewebe-Ersatz fördern [86, 87]. Dabei wird zu Beginn der Rock-Inhibitor Y-27632 eingesetzt, um protektiv auf die vereinzelt hiPSZ zu wirken [88]. Die anschließende Ausplattierung der EBs als 2D-Kultur an Tag 4/5 ermöglicht eine einfachere und schnellere Beobachtung und Analyse der auswachsenden Zellkultur. Die Kombination aus 3D- und 2D-Kultur soll eine möglichst „reale“ Ausgangssituation mit einfachen Analyse- und Kulturbedingungen schaffen [89]. Viele andere Modelle mit pluripotenten Stammzellen arbeiten nur in 2D-Kultur [21, 22, 62], was einen Vergleich des zeitlichen Ablaufs der Differenzierung erschwert.

5.2 Wurden im Laufe der Differenzierung die richtigen Signalwege beachtet?

Im Laufe der Differenzierung wurden zu bestimmten Zeitpunkten Signalmoleküle und Wachstumsfaktoren zugegeben, um eine adäquate Differenzierung der PPR zu gewährleisten.

Dabei wurden in einer sehr frühen Phase, von Tag 3-5 der TGF-Inhibitor SB431542 sowie BMP4 zugegeben, um eine Induktion in Richtung nicht neurales Ektoderm zu bewirken. BMP4 wird zwar benötigt, um nicht-neurales Ektoderm zu induzieren, jedoch nicht, um es aufrechtzuerhalten oder weiter zu differenzieren [65].

Eine längere Induktion mit dSMADi (BMP4- und TGF-Inhibition) führt zu einer Differenzierung in Richtung neuraler Zellen (ZNS), weshalb der TGF-Beta-Inhibitor SB431542 in Protokoll O-BWF8 an Tag 4 abgesetzt wird [22]. Mit Beginn der BMP4-Antagonisierung durch Dorsomorphin an Tag 5 soll die Differenzierung in Richtung PPR gelenkt werden [58]. Der Zusatz von FGF2 induziert im frühen Stadium eher SIX1-positive Zellkulturen als der Zusatz von FGF8, weshalb erst an Tag 8 von FGF2 auf FGF8 gewechselt wurde [62]. FGF8 unterdrückt im Anschluss die frühe Linsendifferenzierung

und fördert die Generierung olfaktorischer Vorläuferzellen [48]. Auch der Zusatz eines Wnt-Inhibitors ab Tag 5 fördert die Ausbildung der PPR auf Kosten der Neuralleistenzellen [24, 28, 29]. Die anterioren Plakoden werden durch ein vermindertes Wnt-Signal und die posterioren Plakoden durch ein verstärktes Wnt-Signal gefördert [24]. Die kombinierten Zusätze der Signalwege scheinen zu einer Generierung sowohl von PPR als auch von plakodalen Zellen geeignet sein. Nicht zu unterschätzen sind dabei jedoch auch die parakrinen Signalwege zwischen den verschiedenen Zelltypen. Es wurde in Protokoll O-BWF8 untersucht, ob ein verlängertes Signal des BMP4-Antagonisten Dorsomorphin und des Wnt-Antagonisten IWR1e sowie ein verlängerter Einsatz des TGF- β -Inhibitors zu einer verstärkten Ausbildung anteriorer Plakodenregionen beitragen (s.u.).

Zusammenfassung:

→ Variationen im zeitlichen Einsatz der Signalwege sollten weiter überprüft werden eventuell auch hinsichtlich der Dosierung

5.2.1 Stellen die Anpassungen hinsichtlich des TGF- β Signalwegs eine Verbesserung der Differenzierung in Protokoll O-BWF8/TGF im Vergleich zu O-BWF8 dar?

Schon hinsichtlich der Morphologie lassen sich Unterschiede in den Differenzierungen feststellen. Mithilfe des Differenzierungsprotokolls O-BWF8/TGF entwickeln sich weit- aus mehr Rosetten, was für eine stärkere Induktion neuraler Zellen spricht [90, 91]. Auch können in der Zellkultur bereits an Tag 30 morphologisch Neurone detektiert werden, was in der Differenzierung mit O-BWF8 nicht der Fall ist (nicht gezeigt). TGF- β -Signale spielen eine große Rolle bei der Differenzierung des neuralen Systems und scheinen so auch hier eher neurale Zellen zu induzieren [61, 92]. Nichtsdestotrotz werden im Zeitraum Tag 12-18 die präplakodalen Marker SIX1, SIX4, EYA1 und EYA2 detektiert. Dabei weisen SIX4 und EYA2 teilweise Co-Lokalisationen mit PAX6 auf, was für die Entwicklung anteriorer PPR-Zellen spricht. Die fehlenden Co-Lokalisationen mit SOX1 deuten darauf hin, dass die analysierten Zellen (noch) keinen plakodalen Charakter entwickelt haben.

Besonders positiv ist hier die erstmalige Detektion von EYA1 auf Proteinebene sowohl an Tag 12 als auch an Tag 30, sowie die Detektion von EYA2 an Tag 18, welche in der Differenzierung mit Protokoll O-BWF8 ausbleibt. Dafür ist jedoch die Analyse von SIX1 nicht so eindeutig und ergiebig wie in der Differenzierung O-BWF8 und auch an Tag 30

bleiben flächendeckende SIX1 Populationen aus. Der olfaktorische Vorläufermarker EBF2 ist selten und nur in sehr kleinen Populationen aufzufinden und zeigt Co-Lokalisationen mit dem Linsenmarker SOX1, ohne dabei jedoch Marker der Neuralleiste zu exprimieren, was eher für die Entwicklung plakodaler Zellen spricht.

In der Zellauszählung zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse, SIX4 tritt zu allen Zeitpunkten in Protokoll O-BWF8/TGF gehäuft auf. Die Ergebnisse der Auszählung von SIX1 sind zu allen Zeitpunkten sehr niedrig (zwischen 10-20 %), leicht überlegen jedoch in Differenzierung mit O-BWF8. Beachtet werden muss, dass zufällig ein Bereich in unmittelbarer Nähe des ausplattierten EBs ausgewählt wurde und zu frühen Zeitpunkten oft nur einzelne Bereiche/Zellen z.B. SIX1 positiv sind. An Tag 30 konnten als Vergleich in speziell ausgewählten Regionen 86 % der Zellen als SIX1-positiv identifiziert werden. Auch wird in allen Differenzierungen ersichtlich, dass Marker der Neuralleiste gehäuft in Nähe des ausplattierten EBs auftreten, was die hohe Expression von MSX1 erklärt. Die hohe Expression von SOX1 in Differenzierung O-BWF8 an Tag 30 deutet darauf hin, dass in dieser Differenzierung wesentlich mehr plakodale Zellen, wenn auch mit phakalem Charakter, differenziert wurden. Zu erwähnen ist hierbei, dass auch SOX1 gehäuft in der Nähe des ausplattierten EBs, bzw. um Zellanhäufungen wie z.B. Rosetten herum auftritt. Das hier vorgenommene Auswertungsmodell sowie die ausgewählten Zahlfelder sind zu Analyse und Vergleich der Protokolle nicht optimal geeignet. Zudem sind die Unterschiede in der Zellauszählung nicht signifikant. Eine flächendeckendere Auszählung oder Analyse via FACS wäre hilfreich, um genauere Angaben über die Effizienz der Protokolle geben zu können.

Allerdings fällt besonders an Tag 30 ein eklatanter Unterschied in der Zellzahl und der Zellausbreitung auf (Abb. 28). Das Protokoll O-BWF8/TGF scheint zwar, ersichtlich anhand der positiven Analyse der spezifischen präplakodalen Marker, zu Beginn die Ausbildung der PPR ähnlich stark zu fördern wie das Protokoll O-BWF8. Im Zeitraum von 30 Tagen scheint jedoch die Differenzierung der plakodalen Zellen nicht explizit gefördert zu werden und allgemein Zellwachstum verhindert zu werden. Beachtet werden muss hierbei jedoch auch, dass in Protokoll O-BWF8/TGF ein Grundmedium ohne den Zusatz von B27 verwendet wurde, was beim Wachstum differenzierter Neurone eine Rolle spielt [93]. Möglicherweise ist ein verlängerter Zusatz von TGF-Inhibitoren zu Beginn eines Differenzierungsprotokolls förderlich für die Ausbildung der PPR, günstig für die

Ausbildung der OP scheint eine dauerhafte TGF-Beta-Antagonisierung sowie der verlängerte Einsatz von IWR1e und Dorsomorphin aber nicht zu sein. Um explizitere Aussagen treffen zu können, muss das Protokoll O-BWF8/TGF jedoch auch auf RNA-Ebene noch eindeutiger untersucht werden. Ebenso sollte eine Untersuchung hinsichtlich der Beeinflussung des Grundmediums untersucht werden. Schon aufgrund der Kulturunterschiede, aber auch aufgrund der deutlich positiven Ergebnisse von Protokoll O-BWF8 wurde die nachfolgende Analyse und Differenzierung mit O-BWF8 fortgeführt. Auch die nachfolgende Diskussion orientiert sich hieran.

Zusammenfassung:

→ das hier vorgenommene Auswertungsmodell zur Analyse ist nicht optimal geeignet, um die Protokolle miteinander zu vergleichen

→ O-BWF8/TGF scheint die Ausbildung der PPR zu Beginn ähnlich stark zu fördern wie O-BWF8, im 30-tägigen Zeitraum scheint die Differenzierung plakodaler Zellen jedoch nicht explizit gefördert und Zellwachstum generell verhindert zu werden

→ aufgrund der positiven Ergebnisse von O-BWF8 sowie der Kultivierungsunterschiede wurde die nachfolgende Analyse und Differenzierung mit dem Grundprotokoll O-BWF8 fortgeführt

5.3 Ist eine Identifikation der Präplakodalen Region durch das Differenzierungsprotokoll O-BWF8 möglich?

5.3.1 Betrachtung von SIX und EYA hinsichtlich der Differenzierung der PPR

Die Lokalisation der präplakodalen Zellen *in vitro* ist nicht spezifisch, wird aber im Zusammenhang mit der Ausbildung der Rosetten beschrieben [94], weshalb die deutliche Ausprägung der Rosetten zwischen Tag 12-20 (vgl. Abb. 16, C) als günstig für eine Analyse der präplakodalen Marker in diesem Zeitraum angesehen wurde.

Eine besondere Rolle in der Analyse spielen die spezifischen PPR-Marker SIX und EYA [29, 31, 34, 95]. In unserer Analyse konnten auf Proteinebene erst ab Tag 15 vereinzelte SIX1-positive Populationen in den randständigen Bereichen analysiert werden. In anderen Publikationen konnten im 2D-Kulturmodell SIX1-positive Zellen bereits an Tag 11 [22], bzw. Tag 8 [21] nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, ist jedoch ein zeitlicher

Vergleich der Expressionen zwischen 2D und 3D bzw. 3D+2D Kultur nicht adäquat. Zusätzlich müssen Unterschiede im verwendeten Zellmodell beachtet werden, da in anderen Publikationen heSZ verwendet wurden.

In Experimenten im *Xenopus* wurde bewiesen, dass ein Knock-Down von *Six1*-Genen in der Grenzregion die Expression von anderen präplakodalen Markern reduziert und dagegen Neuralleisten- und epidermale Signale verstärkt werden [44]. Bei Gain-of function Experimenten im *Xenopus* traten dementsprechend umgekehrte Ergebnisse auf. Auch in Mäusen führen *Six1*-Knock-out Experimente zu schweren Defekten in sensorischen Strukturen des olfaktorischen Systems sowie des Innenohrs [24, 28, 31]. Außerdem entstehen weitere Defizite, unter anderem im muskulären oder nephrologischen Bereich, da wie bereits beschrieben auch hier *Six1* eine Rolle in der Entwicklung spielt [22]. Zwar kann *Six1* auch in der PPR der Maus detektiert werden, jedoch lassen sich Defekte bei *Six1*-Knock-out Mäusen eher in der späteren plakodalen Morpho- und Neurogenese als in der PPR finden. Vermutlich formiert sich die PPR aufgrund der verbleibenden Aktivität von *Six2* und *Six4* [24]. Präplakodale Gene werden bei *Six1*-Missexpression so zwar weiterhin exprimiert, es können aber weder *Pax*-Proteine, noch reife Plakoden ausgebildet werden [28]. Dies deutet darauf hin, dass die PPR (in evtl. reduzierter Form) auch ohne Expression von *Six1* induziert werden kann, während *Six1* für die Entwicklung der Plakoden von essentieller Bedeutung ist. Möglicherweise ist dies eine Erklärung für die lokal begrenzten und vereinzelt Expressionen von SIX1 an Tag 15-25 und die erst an Tag 30 ausgedehnten SIX1 Expressionen in der Differenzierung O-BWF8. Diese Erkenntnisse würden die Annahme erhärten, dass an Tag 12-25 vor allem präplakodale Zellen generiert werden, während an Tag 30 bereits eine spezifischere plakodale Kultur vorliegt. Gleichzeitig deuten die Erklärungen darauf hin, dass eine effizientere Differenzierung der PPR vonnöten wäre und damit eine noch effizientere Ausbeute hinsichtlich plakodaler Zellen möglich wäre.

SIX4 ist schon ab Tag 12 großflächig nukleär lokalisiert, wie in Abbildung 18 ersichtlich ist. Zu einem früheren Zeitpunkt wurde keine Färbung durchgeführt, weshalb keine Angaben darüber gemacht werden können, ab wann SIX4 positive Zellen zu detektieren sind. Die Co-Lokalisationen mit dem neuroektodermalen Marker SOX1 [41] und dem nicht-neuroektodermalen Marker MSX1 [28] sprechen jedoch für ein sehr frühes Stadium der Differenzierung, der neuralen Grenzzone, in welcher nicht-neurales und neurales

Ektoderm weitgehend überlappen [28]. Im Verlauf spielt *Sox1* eine Rolle bei der Entwicklung der Linsenplakode und ist im Huhn bereits in Stadium 14 (ca. 50 h, 22 Somiten) in Linsenvorläufern zu detektieren [42]. *Msx1*-Genexpressionen gelten im *Xenopus* im frühen Entwicklungsstadium als Marker für die Epidermis. Schwache Signale zeigen sich auch in der Grenzregion anterior der Neuralplatte, stärkere Expressionen finden sich später im posterioren Teil der PPR. Im Verlauf wird *Msx1* als spezifisch für die Neuralleiste angesehen [30, 31, 33]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen auf Proteinebene lassen sich keine aussagekräftigen Ergebnisse der *SIX4*-Expression auf RNA-Ebene treffen, da die biologische Varianz sehr hoch ist. Es könnte entweder tatsächlich keine *SIX4*-RNA zu detektieren sein, oder bei der Analyse lagen technische Probleme vor. Die eindeutige Analyse auf Proteinebene macht wahrscheinlich, dass bei der Analyse technische Probleme vorlagen.

Die Detektion von *EYA2* erfolgte an Tag 12 nur im Zytoplasma (Abb. 19), was darauf hindeutet, dass die Interaktion mit den Six-Proteinen, welche Eya in den Nukleus translozieren [46, 96], an Tag 12 noch nicht gegeben ist. Es wird vermutet, dass die Funktion des Eya2-Proteins sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus erfüllt wird. [45] Auch die RNA-Expressionen stützen das Ergebnis, dass positive *EYA2* Populationen bei der Differenzierung mit Protokoll O-BWF8 entstehen. Auf Proteinebene konnten zu keinem Zeitpunkt (weder Tag 12, 18 oder 20) eindeutige *EYA1*-positive Zellpopulationen detektiert werden. Auf RNA-Ebene konnten hingegen sowohl an Tag 16 als auch an Tag 20 erhöhte Expressionen von *EYA1* analysiert werden. Wichtig zu beachten ist hierbei der Unterschied zwischen Transkriptom und Proteom, da nicht jede transkribierte RNA ein Protein erzeugt. Die Expression auf Proteinebene unterliegt höchstwahrscheinlich Fluktuationen und in der vorliegenden Analyse können unter anderem der passende Zeitpunkt der immunhistochemischen Fixierung verfehlt worden sein, technische Fehler bei der Anwendung unterlaufen sein oder Komplikationen im Hinblick auf den Antikörper bestehen. Die wiederholte negative Färbung deutet darauf hin, dass mit geringer Wahrscheinlichkeit ein technischer Fehler bei der Anwendung vorliegt.

Die Expression von Eya1 und Eya2 hängt in hohem Maß auch mit der Expression von Pax6 zusammen [97]. Pax6 gilt als früher Marker für die anteriore Plakodenregion, in welcher auch die olfaktorische Plakode generiert wird [13, 27]. PAX6 konnte hier an Tag 12 in Co-Lokalisation mit SIX4 detektiert werden, dabei ist das Signal jedoch schwach.

Vor allem im Hinblick auf die restlichen Abläufe vermute ich, dass PAX6 bereits vor der Expression in der anterioren PPR eine frühe Funktion in präplakodalen Zellen in der Grenzregion besitzt und deshalb schon so früh exprimiert ist.

Alle vier spezifischen PPR-Marker, SIX1, SIX4, EYA1 und EYA2 lassen sich zwischen Tag 12 und Tag 20 entweder auf RNA- oder auf Proteinebene detektieren, was rückwärts lässt, dass sich zu diesem Zeitraum präplakodale Zellen ausbilden. Dabei sind die Populationen (bis auf SIX4) nicht flächendeckend, was entweder an einer unzureichenden Induktion oder an einer Analyse zu den falschen Zeitpunkten liegt. Die Komplexität der Entwicklung des neuralen und nicht neuralen Ektoderms ist im humanen Modell noch nicht vollständig verstanden. Durch die beigefügten Zusätze wird versucht, eine gerichtete Differenzierung in Richtung PPR und OP zu induzieren, gleichzeitig entstehen jedoch auch viele neurale Zellen, Neuralleistenzellen und andere verschiedene Zelltypen, die hier nicht näher getestet wurden. Die unterschiedlichen Zellverbände liegen auch in der natürlichen Umgebung eng beieinander und beeinflussen sich während der embryologischen Entwicklung gegenseitig, um Grenzen zu definieren und Differenzierung zu gewährleisten.

5.3.2 Betrachtung weiterer Markeranalysen hinsichtlich der Differenzierung der PPR

Die gesteigerte RNA- und Protein- Expression des Markers SOX1 zeigt, dass auch neuroektodermale Zellen entstehen. Der Annahme von Bailey et al., folgend, dass die PPR vorerst Signale phakaler Progenitoren exprimiert und sich die Subdomänen der Region erst durch eine Unterdrückung dieser Linsensignale generieren, kann auch angenommen werden, dass SOX1 hier bereits spezifisch in frühen phakalen Zellen exprimiert wird. [48] Der Übergang vom allgemeinen neuroektodermalen Marker zum spezifischen phakalen Marker ist dabei vermutlich genauso fließend wie der Übergang von Grenzregion zu PPR.

Im *Xenopus* wird die Funktion von *Msx1* als Induktionssignal für die Epidermis und die Neuralleiste beschrieben [24, 98]. In der späten Gastrulation lassen sich die Signale einiger *Msx*-Gene wie oben beschrieben noch sowohl in der PPR als auch in der Neuralleiste analysieren [33]. Die Aktivierung eines *Msx1* Konstrukts führt im *Xenopus* in der späten Gastrulation aber zur Verstärkung von Neuralleistenmarkern [33]. Im Lauf der Differenzierung reduziert sich die Expression von *Msx1* im *Xenopus* auf den posterioren Teil

der PPR. Ein schwaches Signal lässt sich jedoch weiterhin auch in der zukünftigen Linsenplakode analysieren [31].

Expressionen des Grenzregion-Markers *DLX5* wurden nur auf RNA-Ebene bestimmt. *Dlx5* definiert gemeinsam mit *Msx1* in der frühen Differenzierung die Abstufung der Grenzregion zu anderen Geweben sowie die Differenzierung zwischen PPR und Neuralleiste. [34] Dabei beschränkt sich *Dlx5* im Laufe der Gastrulation auf das nicht-neurale Ektoderm, fördert durch seine Expression die Differenzierung der PPR und definiert – neben anderen Genen – zu Beginn das präplakodale Ektoderm. So überlappt es in seiner Expression später mit *Six1*-positiven Populationen [24, 32] 33].

Im Huhn wurde gezeigt, dass *Dlx5* und *Pax6* bis zu HH12 in der PPR in phakalen und in olfaktorischen Zellen co-exprimiert sind. Sobald die Linsenzellen eine säulenartige Morphologie annehmen, ist *Dlx5* in der Linsenplakode herunter und in der OP heraufreguliert. Im Verlauf der plakodalen Entwicklung reduziert sich die Expression von *Dlx5* auf die olfaktorischen Vorläuferzellen und auf den hinteren Teil des otischen Vesikels [31, 35]. Die hier vorliegende deutliche Steigung der RNA-Expression an Tag 20 deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt viele nicht-neurale ektodermale Zellen, zu welchen auch präplakodale Zellen zählen, in der Kultur zu finden sind.

Ebf-Gene spielen eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung von Progenitoren des zentralen Nervensystems. Insbesondere *Ebf2* wirkt auch bei der Differenzierung von unreifen olfaktorischen Vorläuferzellen und reifen ORN mit [55, 99]. Bereits ab Tag 12 konnten *EBF2*-positive Zellpopulationen detektiert werden, jedoch nur in Co-Lokalisation mit dem neuroektodermalen Marker *SOX1* und dem Marker *SOX9*, welcher als spezifisch für die Neuralleiste gilt. Neben der Neuralleiste ist *Sox9* jedoch auch in nicht-neuralem Ektoderm und der otischen Plakode exprimiert [32]. Dabei geht die Expression von *Sox9* der tatsächlichen Differenzierung der Neuralleiste voraus [100], was wiederum dafür spricht, dass im Zeitraum Tag 12- 18 eher ein frühes Stadium der Entwicklung vorliegt und *Sox9* hier nicht-neurales Ektoderm markiert. Die vielen Co-Expressionen der neuronalen, epidermalen, Neuralleisten- und präplakodalen Markern verstärken die Annahme, dass sich die Zellen zu Beginn noch im Stadium der neuronalen Grenzregion befinden, in welcher alle Zelltypen eingestreut sind. Der Übergang zur PPR ist wie alle embryologischen Entwicklungen fließend. Es lässt sich feststellen, dass präplakodale Zellen generiert wurden, in genau welchem Stadium der Differenzierung die Zellen sich jedoch

an welchem Tag befinden, bleibt spekulativ und bedarf weiterer Analysen. Das Ziel dieses Protokolls, präplakodale Zellen zu generieren, scheint erreicht zu sein. Um eine effektivere Differenzierung zu gewährleisten, sollte das hier verwendete Protokoll jedoch weiter verbessert werden.

Zusammenfassung 5.3:

→ die Detektion aller spezifischen präplakodalen Marker spricht für die Generierung präplakodaler Zellen

→ die Co-Expressionen mit neuralen, epidermalen, neuroektodermalen, phakalen und Neuralleistenmarkern spricht außerdem für die Generierung verschiedener Zelltypen, wie zum Zeitpunkt der Gastrulation in der Grenzregion

5.4 Ist eine Identifikation der olfaktorischen Plakode durch das Differenzierungsprotokoll O-BWF8 möglich?

5.4.1 Betrachtung von SIX und EYA hinsichtlich der Differenzierung plakodaler Zellen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Generierung der OP in der Differenzierung des Protokolls O-BWF8 diskutiert.

Eine besondere Rolle spielen dabei weiterhin die Six- und Eya- Gene. Six1, Six4 und Eya1 scheinen die einzigen Gene zu sein, die weiterhin konstant in allen Plakoden, außer der Linsenplakode, exprimiert sind. Expressionen von Six4 fehlen zudem in der trigeminalen und der hypophysealen Plakode [13, 31, 43, 101].

Six1 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der olfaktorischen Vorläuferzellen. Knock-out Experimente in der Maus zeigen, dass Six^{-/-} Mäuse keine reifen ORN ausbilden [102]. Dementsprechend wurde auch in dieser Analyse ein besonderes Augenmerk auf die Expressionen von SIX1 gelegt. Sowohl auf Proteinebene als auch auf RNA-Ebene lässt sich ein deutlicher Anstieg der SIX1-Expressionen von Tag 25 auf Tag 30 detektieren. Während an Tag 25 SIX1-positive Populationen noch vereinzelt peripher im Zellverbund zu lokalisieren sind, zeigt SIX1 an Tag 30 großflächige deutliche Färbungen über die gesamte Kultur verteilt. Dies legt nahe, dass an Tag 30 plakodale Zellen, die keinen Linsencharakter besitzen, generiert wurden, und die ausgezählten Zellpopulationen lassen vermuten, dass die Induktion mit 86 % auch effizient ist. Auch die stark angestiegene

RNA-Expression an Tag 30 unterstützt diese These. Kritisch zu betrachten ist hierbei jedoch, dass die Auszählung nur in den flächendeckenden SIX1-Populationen erfolgte und nicht im gesamten Zellverbund. Eine Analyse der Effizienz per FACS oder ausführlicher Auszählung wäre nötig, um eine tatsächliche Aussage über die Effizienz des Protokolls zu treffen. Die Kultur zeigt weiterhin spezifische und auch flächendeckende SIX4-positive Populationen. Im Unterschied zu den vorherigen Analysen jedoch ohne Co-Lokalisation mit SOX1 oder MSX1. Dies deutet auch darauf hin, dass in der Differenzierung ein Zelltyp entstanden ist, der weder Signale der Neuralleiste (MSX1) noch Signale der Linsenplakode (SOX1) exprimiert, gleichzeitig aber plakodalen Charakter (SIX4) hat. Im Gegensatz zu den Ergebnissen auf Proteinebene lassen sich wieder keine aussagekräftigen Ergebnisse der *SIX4*-Expression auf RNA-Ebene treffen. Auch hier deutet die eindeutige Analyse auf Proteinebene darauf hin, dass bei der Analyse des Markers ein technisches Problem vorlag.

Eya1 soll insbesondere eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der otischen Plakode spielen [97]. Darüber hinaus ist *Eya1* in der Entwicklung des Zebrafisch weiterhin in den Plakoden der Adenohypophyse, der olfaktorischen, otischen und den lateralen Plakoden exprimiert [103]. *Eya2* ist ebenfalls in der olfaktorischen/nasalen Plakode und der Linsenplakode, sowie den epibranchialen und trigeminalen Ganglien exprimiert, nicht jedoch in der otischen oder adenohypophysealen Plakode [103]. An Tag 31 können erstmals auch nukleäre Lokalisationen von *EYA2* nachgewiesen werden. Teilweise Co-Lokalisationen mit *SOX1* und *PAX6* lassen in dieser Analyse vermuten, dass auch phakale Zellen generiert wurden. Auffällig ist dabei die häufige Lokalisation um Rosetten herum (Abb. 25). Zu Beginn ist *Pax6* sowohl in der olfaktorischen als auch in der phakalen Plakode exprimiert, wird aber mit der Ausdifferenzierung der Linsenplakode in der OP herunter- und in der phakalen Region heraufreguliert [27, 48]. Bei Loss-of-Pax-6-function werden weder die Linsenplakode, noch die OP ausgebildet [27, 104]. Es kann vermutet werden, dass neben den nicht phakalen plakodalen Zellen, die *SIX1* exprimieren, eben auch phakale plakodale Zellen generiert werden, die *EYA2*, *SOX1* und *PAX6* exprimieren, eher rosettennah. Analysen zu späteren Zeitpunkten sollten durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob auch in den *SIX1*-positiven Populationen *EYA2*-positive nukleäre Co-Lokalisationen zu finden sind.

Die deutlichen *EYA1*- und *EYA2*- Expressionen auf RNA-Ebene zeigen im Verlauf konstant erhöhte Expressionswerte, was ebenfalls darauf schließen lässt, dass aus den zuvor präplakodalen Zellen plakodale Zellen entstanden sind. Die konstant steigenden Expressionswerte von *EYA1* können in Zusammenhang mit der steigenden Zellzahl (vgl. Abb. 28) stehen. Die leicht abfallenden Expressionswerte von *Eya2* können einerseits durch technische Ungenauigkeiten entstanden sein, andererseits aber auch darauf zurückzuführen sein, dass *Eya2* im Gegensatz zu *Eya1* nur in einigen der sich entwickelnden Subdomänen exprimiert ist.

Zusammenfassung:

- flächige *SIX1*-positive Populationen mit starkem Expressionsanstieg von *SIX1* unterstützen die Annahme, dass plakodale Zellen um Tag 30 entstehen
- flächige *SIX4*-positive Populationen ohne Co-Lokalisationen mit *MSX1* oder *SOX1* unterstützen die These, dass einige dieser plakodalen Zellpopulationen an Tag 30 keinen Linsencharakter besitzen
- eine gemischte Zellkultur entsteht, auch mit Populationen mit Linsencharakter sowie Neuralleistenzellen vor allem in Rosettennähe

5.4.2 Betrachtung weiterer Markeranalysen hinsichtlich der Differenzierung einer olfaktorischen Plakode

Die Analyse des frühen Markers der OP *EBF2* deutet auf die Entwicklung olfaktorischer Plakodenzellen hin. In einigen *EBF2*- positiven Populationen ließen sich jedoch Co-Lokalisationen mit den Neuralleistemarkern *SOX9* und *MSX1* identifizieren. Da *Ebf2* allgemein auch als Marker für neuronale Progenitoren gilt [55, 99], lässt sich somit anhand der immunhistochemischen Färbung keine eindeutige Angabe über die Entstehung der OP machen. Eine Analyse des olfaktorischen Plakodenmarkers *FOXG1* [105] auf Proteinebene blieb aufgrund von technischen Problemen erfolglos. Eine adäquate zusätzliche Analyse der olfaktorischen Plakodenmarker *FOXG1* und *EMX2* [106, 107] auf Proteinebene wäre angebracht, um eine eindeutigere Aussage über die Entstehung der OP treffen zu können. Auch die Kombination von *Pax6* und *Dlx5* scheint spezifisch für die OP zu sein und sollte auf Proteinebene untersucht werden [108]. Auf RNA-Ebene lassen eindeutig gesteigerten Expressionen von *EBF2* und *FOXG1* trotz der unklaren Ergebnisse

auf Proteinebene vermuten, dass olfaktorische Vorläuferzellen generiert wurden. FoxG1 ist jedoch auch nicht ausschließlich spezifisch für die Entwicklung des olfaktorischen Epithels aus der OP [105]. Es ist in der frühen Gastrulation im Oberflächenektoderm und später auch in den otischen, hypophysealen und epibranchialen Plakoden exprimiert [109]. Zusätzlich spielt es eine Rolle bei der Entwicklung optischer Anteile. [110] Außerdem scheint FoxG1 bei der Abgrenzung von Neuralleistenzellen zu plakodalen Zellen eine Rolle zu spielen [109]. Vermutlich zeigt sich aus diesem Grund eine gesteigerte RNA-Expression von FOXG1 besonders an Tag 20/25, an welchen diese Abgrenzung zu plakodalem Charakter vermutet werden kann. In Zusammenhang mit den fehlenden MSX1-Signalen in SIX1 oder SIX4-positiven Populationen lässt sich sagen, dass zwar die Entwicklung einer OP nicht eindeutig bestätigt werden kann, jedoch eine Differenzierung zugunsten plakodaler Zellen auf Kosten von Neuralleistenzellen mit großer Sicherheit erreicht wurde.

Zusammenfassung:

→ die Generierung einer OP wird vermutet, kann aufgrund der Proteinanalysen aber nicht eindeutig bestätigt werden, weitere Analysen mit EMX2, FOXG1, DLX5 und PAX6 sind notwendig - eine Differenzierung zugunsten plakodaler Zellen kann aber angenommen werden

5.4.3 Betrachtung der Verlaufsanalysen der RNA-Expression hinsichtlich der Differenzierung einer olfaktorischen Plakode

Im Allgemeinen gilt, dass bei der Analyse der hier aufgeführten RNA-Expressionsdaten darauf geachtet werden muss, dass die untersuchten RNA-Sequenzen in hiPSZ so gut wie nicht aufzufinden sein sollten und besonders hohe Unterschiede der Expressionslevel dementsprechend betrachtet werden müssen. Daher ist die Analyse der Verlaufsdaten im Vergleich für eine Interpretation besser geeignet. Bei Betrachtung der Verlaufsexpressionen der verschiedenen Marker lassen sich mehrere Schlüsse ziehen.

Six3 spielt eine essentielle Rolle bei der Definition der anterioren Plakodenregion [50, 111], beeinflusst die Entwicklung der OP und phakalen Plakode und eignet sich im späteren Stadium der Neuralplatte gemeinsam mit Pax6 als spezifischer Marker für die Linse [36, 112].

Der Anstieg der RNA-Expression von *SIX3* an Tag 30 spricht für die Entwicklung anteriorer Plakodenzellen, sprich OP, Linsenplakode oder adenohipophysäre Plakode. Eine zeitgleiche RNA-Analyse von *Pax6*, sowie eine immunhistochemische Analyse beider Marker könnte zur Charakterisierung spezifischer phakaler Plakodenzellen in Abgrenzung zu olfaktorischen Zellen beitragen.

Die ebenfalls gesteigerte Expression von *PAX8*, was als bedeutend für die Entwicklung der posterioren Plakodenregion gilt [24], verdeutlicht wiederum, dass das Differenzierungsprotokoll zur Entwicklung verschiedener Zelltypen beigetragen hat. Neben plakodalen Zellen des anterioren Typs sind dementsprechend auch Zellen des posterioren Typs entstanden.

Dlx5 als früher nicht-neuraler ektodermaler Marker mit Expressionen in der Grenzregion ist maßgeblich beteiligt an der Definition der PPR. Im weiteren Verlauf der Differenzierung spielt *Dlx5* eine Rolle bei der Differenzierung von phakaler und OP. Es zeigt stärkere Expressionen in olfaktorischen Zellen mit zusätzlicher Expression in Teilen der otischen Plakode [24, 31-33, 35]. Dabei scheint *Dlx5* jedoch nicht bei der Induktion der OP, sondern eher bei der darauffolgenden Entwicklung von Bedeutung zu sein [59]. Der deutliche Höhepunkt der RNA-Expressionen an Tag 20 lässt vermuten, dass zu diesem Zeitpunkt viele nicht-neurale ektodermale Zellen differenziert wurden. Derartige Zellzusammensetzungen finden sich in der Grenzregion und auch im weiteren Verlauf der Entwicklung der PPR. Die Abnahme der RNA-Expressionen an Tag 30 lässt vermuten, dass *Dlx5* in der weiteren Entwicklung nur in den spezifischen Subdomänen, unter anderem den olfaktorischen Zellen, exprimiert ist. Die gemischte Kultur aus unterschiedlichen Zelltypen ruft dementsprechend in Relation eine niedrigere Expression hervor als zum Zeitpunkt der PPR.

FoxE3 gilt als spezifisch für die früh entwickelte Linsenplakode, welche den Grundzustand der frühen plakodalen Region definiert [48, 110]. Die einzeitig extrem gesteigerte Expression von *FOXE3* an Tag 25 deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt der phakale Grundzustand der plakodalen Region eingeleitet ist. Auch der phakale Marker *SOX1* zeigt an Tag 25 einen deutlichen Expressionspeak, was diese These stützt. Die Zusammenhänge lassen vermuten, dass in der weiteren Entwicklung bis Tag 30 die Differenzierung in Subdomänen stattfindet. Die Expression des Markers *FOXE3* fällt an Tag 30 unter das Level von Tag 20, während die Expressionen von *SOX1* im Vergleich zu Tag 20

weiterhin erhöht sind. *Sox1* scheint als Marker der Linsenplakode im Gegensatz zu *FoxE3* vor allem im späteren Verlauf der Entwicklung der Linsenzellen von Bedeutung zu sein [42].

Dies zeigt auf, dass sich im Zellverbund auch plakodale Linsenzellen finden lassen und bestätigt damit erneut die Annahme, dass sich eine gemischte Kultur mit unterschiedlichen Zelltypen entwickelt hat. Die positiven Ergebnisse der Proteinanalysen von SIX1 und SIX4 ohne SOX1 Co-Lokalisationen machen aber deutlich, dass plakodale Linsenzellen nur einen Teil der entstehenden Zelltypen ausmachen. Weitere Analysen hinsichtlich olfaktorischer Plakodenmarker sollten durchgeführt werden.

Die Analyse der Expressionsdaten der frühen Grenzregion- und PPR-Marker *DLX5*, *SIX3*, *PAX8*, *FOXE3* und *SOX1* im Verlauf lässt eine Ausprägung der PPR an Tag 20-25 mit anschließender Differenzierung in Richtung spezialisierter Subgruppen innerhalb der PPR an Tag 30 vermuten. Dabei scheint die starke Ausprägung der Linsenmarker *FOXE3* und *SOX1* darauf hinzudeuten, dass der „Grundzustand Linse“ der PPR an Tag 25 eingeleitet ist. Die erhöhten Expressionen von *EBF2*, *PAX8* und *SOX1* deuten darauf hin, dass bis Tag 30 neben olfaktorischen Plakodenzellen auch phakale Plakodenzellen und Zellen der posterioren Plakodenregion generiert wurden (vgl. Abb. 44).

Zusammenfassung 5.4:

- eine gemischte Kultur mit unterschiedlichen Zelltypen wurde generiert; auch Marker für Neuralleistenzellen (*MSX1*, *SOX9*) lassen sich weiterhin finden
- Grundzustand der plakodalen Linsenregion vermutlich um Tag 25
- flächige Populationen plakodaler Zellen wurden generiert; *PAX8* und *EYA1* sprechen für posteriore, insbesondere auch otische Zelltypen, *SIX3*, *FOXE3*, *SOX1*, *SIX1* und *SIX4* sprechen für anteriore Zelltypen
- Analysen von *EBF2* und *FOXG1* in Zusammenschau mit *SIX1* lassen vermuten, dass auch olfaktorische Plakodenzellen generiert wurden
- ➔ das Protokoll O-BWF8 ist geeignet plakodale Zellen zu generieren, inwiefern olfaktorische Zellen daran einen Anteil haben, ist durch die hier durchgeführten Analysen nicht eindeutig zu klären

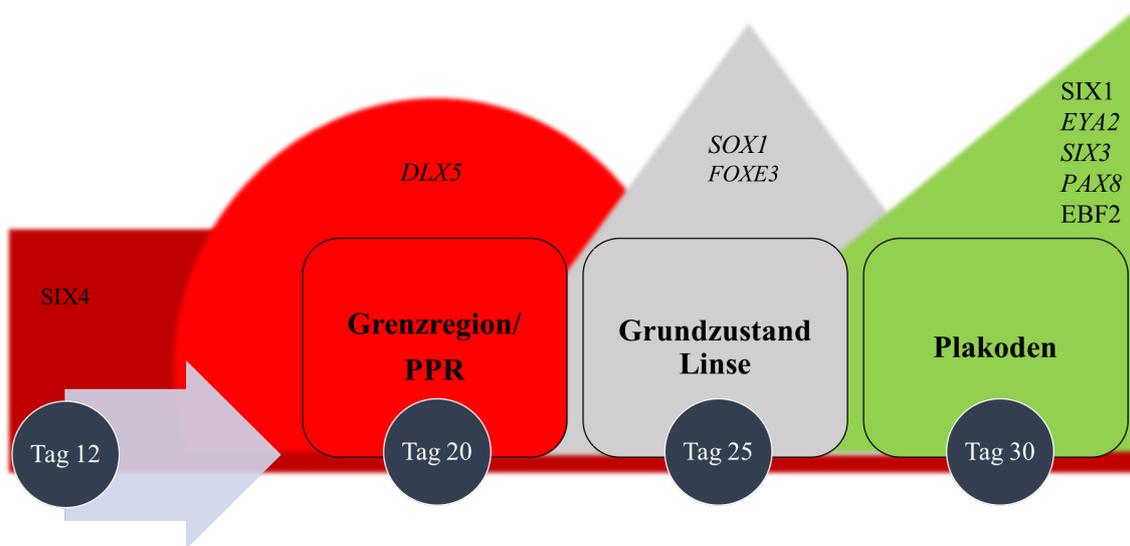


Abbildung 37: Schematische Darstellung der analysierten Stufen der Differenzierung
 Die Entwicklungsstufen der Grenzregion/PPR (*DLX5*), des Grundzustand der plakodalen Region mit Expression verschiedener Linsensignale (*SOX1*, *FOXE3*) sowie die Entwicklung der Plakoden (*SIX1*, *EYA2*, *SIX3*, *PAX8* und *EBF2*) sind schematisch dargestellt an Tag 20, 25 und 30. Durchgehende Analyse des präplakodalen Markers *SIX4* ab Tag 12. Beigefügt jeweils die definierenden Marker, korrelierend mit der jeweiligen Expression auf RNA- bzw. Proteinebene.

5.5 Ist eine Identifikation olfaktorischer Rezeptorneurone durch das Differenzierungsprotokoll O-BWF8/RA möglich?

5.5.1 Wurden reife ORN generiert? – Analyse anhand von OMP, TUBB3 und NCAM2

Als einer der wichtigsten Anhaltspunkte für die Interpretation der Differenzierung von ORN gilt die Analyse des olfaktorischen Markerproteins (OMP). Die Expression von OMP in der olfaktorischen Region wird als spezifisch für reife ORN beschrieben, eine Expression in unreifen ORN im adulten OE ist bisher nicht bekannt [113]. Die Expression von OMP ist vornehmlich zytoplasmatisch [114].

Beta-3-Tubulin gilt als Marker für unreife Neurone und kann schon im Entwicklungsstadium der OP detektiert werden (Abb. 45). In reifen ORN können immunhistochemische Beta-Tubulin-Färbungen nur noch in Dendriten und Axonen analysiert werden, der Zellkörper bleibt ohne Signal [115-118].

Omp wird nicht nur in ORN, sondern auch in anderen Neuronen exprimiert [119]. Beispielsweise in der Ratte lassen sich Expressionen zusätzlich im Hypothalamus und in der präoptischen Region finden [119]. In Verbindung mit Beta-3-Tubulin gefärbten Neurone können somit andere Zelltypen wie z.B. optische Neurone darstellen. OMP wird, zum Beispiel auch in superfizialen Zellen des kornealen Epithels exprimiert, diese Zellen

weisen jedoch morphologisch keinen neuronalen Charakter auf. *Omp* scheint nicht in den bipolaren Zellen der Retina exprimiert zu werden [120].

In dieser Analyse wurden aufgrund dieser Erkenntnisse nur *OMP*- positive und gleichzeitig *TUBB3*- negative Zellen (*OMP*⁺/*TUBB3*⁻) als reife ORN gewertet. (Abb. 45)

In der Differenzierung mit Protokoll O-BWF8/RA wurde eine neuronale Kultur erschaffen, was an den vielen *TUBB3*-positiven Zellen und morphologisch unschwer zu erkennen ist. In den durchgeführten immunhistochemischen Färbungen zeigt sich deutlich eine bipolare Morphologie der *OMP*-positiven Zellen. Diese bipolare Morphologie unterstützt die Annahme, dass in der neuronalen Kultur spezialisierte sensorische Neurone differenziert wurden.

Überraschend ist die hohe RNA-Expression von *OMP* an Tag 78, da zu diesem frühen Zeitpunkt noch keine reifen ORN erwartet werden. Obwohl in unreifen ORN bisher keine Expression beschrieben wurde, scheint *Omp* schon in der Entwicklung der olfaktorischen Region eine bedeutende Rolle zu spielen, die eindeutige Funktion ist allerdings noch nicht vollständig erforscht [121]. Eventuell lassen sich die RNA-Daten darauf zurückführen. Der Abfall der RNA-Expressionen von sowohl *OMP* als auch *TUBB3* an Tag 100 lässt sich nicht eindeutig erklären. Auffällig ist im Verlauf der RNA-Expressionen die Korrelation zwischen *OMP* und *TUBB3*. Möglich wäre ein Rückgang der Neuronenpopulationen an Tag 100, Probleme in der Kultivierung wurden jedoch nicht registriert. Eventuell lagen aber auch technische Probleme bei der Extraktion der RNA vor. Sowohl an Tag 100 als auch an Tag 120 lassen sich *OMP*⁽⁺⁾/*TUBB3*⁽⁻⁾ -Neurone in der immunhistochemischen Färbung detektieren, vermehrt vereinzelt, oft auch in kleinen Populationen angeordnet. Dabei sind die Lokalisationen verstreut in der dichten Zellkultur und lassen kein Muster erkennen. An Tag 140 lassen sich dahingegen kleine Ansammlungen von *OMP*⁽⁺⁾/*TUBB3*⁽⁻⁾ -Neuronen über die ganze Zellkultur verteilt finden. An Tag 140 wurde keine RNA-Analyse durchgeführt, ein Anstieg der Expression von *OMP* wäre aber aufgrund der gehäuften positiven Zellansammlungen zu erwarten.

Die Verbindung aus typisch bipolarer Morphologie, positiver *OMP*-Färbung und negativer *TUBB3*-Färbung lässt rückschließen, dass es gelungen ist, in dieser neuronalen Kultur auch reife ORN zu generieren.

Eine Differenzierung über einen längeren Zeitraum wäre angebracht, um die weitere Entwicklung der Kultur beobachten und genaue Aussagen über die Effizienz des Protokolls treffen zu können. Außerdem sollte eine weitergehende Charakterisierung der ORN durchgeführt werden, unter anderem sollte bei adäquater Effizienz des Protokolls auch die Funktionalität der ORN überprüft werden.

Das Neural Cell Adhesion Molecule (Ncam2) ist ein weiterer Marker für ORN, exprimiert vor allem in den Axonen. Dabei ist Ncam2 jedoch nicht spezifisch und wird deshalb nur in Kombination mit Omp als Marker für ORN verwendet [122]. *NCAM2* zeigt auf RNA-Ebene seine höchsten Expressionen an Tag 78, was nicht unerwartet ist, da es auch in unreifen ORN exprimiert sein soll [118]. (Abb. 45) Auf Proteinebene konnten an Tag 100 OMP-positive, TUBB3-negative und NCAM2 positive bipolare Neurone analysiert werden, was eigentlich für die Ausbildung reifer ORN spricht. Dabei ist NCAM2 jedoch nicht wie erwartet axonal, sondern im Zellkörper lokalisiert. Es könnte sein, dass doch eher eine frühe Reifungsstufe vorliegt und NCAM2 erst im Reifungsprozess in seine funktionellen Bereiche abwandert

Zusammenfassung:

→ eine neuronale Kultur wurde generiert in welcher OMP(+)/TUBB3(-)- Neurone zu finden sind, die hier aufgrund ihrer immunhistochemischen Eigenschaften, ihrer RNA-Expressionen sowie ihrer bipolaren Morphologie als olfaktorische Rezeptorneurone eingeordnet werden können

5.5.2 Betrachtung der Signalkaskade *GOLF* und *TMEM16B* sowie der olfaktorischen Rezeptoren *ORIG1* und *OR1A1*

Wie in Absatz 1.4.1 betrachtet, spielt Golf eine tragende Rolle in der Signalkaskade des Riechens [81]. In olfaktorischen Biopsien lässt sich eine deutliche Expression von Golf in den Zilien erkennen [123]. In dieser Arbeit konnten positive GOLF-Expressionen jedoch nur im Zellkörper detektiert werden. Dies liegt eventuell an dem erschwerten Auffinden der Zilien in der Neuronenkultur sowie an einer noch nicht adäquaten Reifung der Neurone, stellt aber auch die Frage nach der Funktionalität der generierten Rezeptorneurone. Auf RNA-Ebene zeigt *GOLF* konstant erhöhte Expressionen ab Tag 78, was

vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass Golf auch in unreifen ORN detektiert werden kann [118]. Golf lässt sich in der Ratte aber auch in anderen Teilen des Gehirns, wie z.B. dem Striatum analysieren [124].

TMEM16B zeigt sich in olfaktorischen Biopsien in den Dendriten der ORNs [123]. Die deutliche Expression auf RNA-Ebene deutet darauf hin, dass auch auf Proteinebene in der generierten Neuronenkultur TMEM16B-positive Zellen zu finden sein müssten. Auf Proteinebene konnten jedoch Signale des Markers TMEM16B nur im Zellkörper analysiert werden, was darauf hindeuten kann, dass die Zellen zwar schon OMP exprimieren, aber unter anderem funktionell noch keine adäquate Reifung vollzogen haben. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Marker mit zunehmender Reifung ihre vorgesehene Lokalisation (Zilien bzw. Dendriten) einnehmen und deshalb schwierig aufzufinden sind. Eine eindeutige Aussage ist hier nicht möglich und die Differenzierung bedarf in dieser Hinsicht weiterer Analyse.

Zur Analyse der olfaktorischen Rezeptoren wurden *ORIG1* und *OR1A1* ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass entsprechende Rezeptoren schon untersucht wurden und auf möglichst viele Odoranten ansprechen [123]. Die Rezeptoren weisen auf RNA-Ebene beide einen ähnlichen Expressionsverlauf auf wie *OMP* und *TUBB3*, mit deutlichem Abfall an Tag 100. Dieser Abfall lässt sich wieder nicht eindeutig erklären. Der erneute Anstieg an Tag 120 deutet im Zusammenhang mit den detektierten ORN jedoch darauf hin, dass die ORN auch olfaktorische Rezeptoren exprimieren. Da keine Analyse auf Proteinebene erfolgte, kann über die Lokalisation der Rezeptoren keine Angabe gemacht werden.

Zusammenfassung:

→ der Zusammenhang der erhöhten RNA-Expressionen von *OMP*, *GOLF*, *NCAM2*, *ORIG1*, *OR1A1* und *TMEM16B* deuten darauf, dass die generierten ORN auch funktionell sein könnten

→ weitere Analysen müssen jedoch auch auf Proteinebene durchgeführt werden, um diese These zu stützen.

5.5.3 Betrachtung der Signalkaskaden der Vorläufermarker *ASCL1*, *NGN1* und *NEUROD1* sowie *EBF2* und *CALB2*

Proteine der Klasse Basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) spielen eine zentrale Rolle bei der Differenzierung verschiedener Zellarten, insbesondere von Muskel- und Nervenzellen. In Neuronen finden sich *Ascl1* und *Ngn1* in sich teilenden Vorläuferzellen und induzieren die Expression von anderen bHLH-Genen wie *NeuroD1*. Dementsprechend werden *Ascl1* und *Ngn1* als Faktoren zur Determination einer Zelle betrachtet, während *NeuroD1* als Faktor der Differenzierung angesehen wird [125].

Ascl1 soll außerdem im zerebralen Cortex daran beteiligt sein, Neuralzellen zu fördern und die Entwicklung von Gliazellen zu hemmen [126]. In Analysen in der Maus wurde gezeigt, dass *Ascl1* für die Generierung von olfaktorischen Vorläuferzellen benötigt wird [16, 125].

Ngn1 scheint bei der Generierung von olfaktorischen Vorläuferzellen eine untergeordnete Rolle zu spielen, die Weiterentwicklung zu ORN scheint jedoch bei Verlust von *Ngn1* gestört. Im zeitlichen Verlauf scheint zuerst *Ascl1* exprimiert zu sein, anschließend überlappend *Ngn1* und dann wie oben bereits erwähnt *NeuroD1* [102, 125] (Abb. 45). Der Peak der RNA-Expression von *ASCL1* an Tag 78 lässt sich hierdurch erklären. In der Kultur wurden rein morphologisch auch Gliazellen generiert, was möglicherweise mit den recht niedrigen Expressionen von *ASCL1* an Tag 100 und 120 zusammenhängt. *NGN1* folgt in seinem Verlauf wieder einem ähnlichen Muster wie *OMP*, mit einer deutlichen Senke der Expression an Tag 100.

NEUROD1 zeigt in Korrelation zu den bisherigen Erkenntnissen nur einen leichten Anstieg bis Tag 120. Eine Expression von *NEUROD1* in reifen ORN ist bisher nicht beschrieben. Die hohe Expression von *NGN1* an Tag 120 lässt vermuten, dass auch die durch *NGN1* induzierte Expression von *NEUROD1* weiter ansteigen würde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei einer längeren Differenzierung von O-BWF8/RA mehr reife ORNs zu finden wären.

Ebf2 gehört ebenfalls zur Klasse der bHLH und ist in olfaktorischen Vorläuferzellen exprimiert. Zusätzlich ist es im Mesencephalon, im Rhombencephalon, im Epithalamus und

im Hypothalamus zu finden [99, 107]. Auch in Bezug auf Ebf2 ist eine Kaskade auffällig. Ngn1 scheint die Expression von Ebf2 zu beeinflussen. Ebf2 scheint bei der Expression von Ncam eine entscheidende Rolle zu spielen [107] (Abb. 45). Zu einem späteren Zeitpunkt scheint das Ebf-Gen an der Spezifizierung der olfaktorischen Rezeptoren beteiligt zu sein [127]. Damit ließe sich die gesteigerte *EBF2*-RNA-Expression an Tag 120 erklären. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass sich auch an Tag 120 noch viele ORN im unreifen Stadium befinden und *EBF2* exprimieren. Zusätzlich ist wahrscheinlich, dass wie oben erwähnt auch andere Zelltypen zur gesteigerten Expression beitragen. Der Einbruch der RNA-Expressionen an Tag 100 lässt sich erneut nicht eindeutig erklären. Die Korrelation mit dem Verlauf von *NGN1* bestätigt die oben genannte Theorie einer Induktionskaskade (Abb. 45), wobei *NCAM2* an Tag 120 noch keine stark gesteigerten Expressionen aufweist. In Zusammenhang mit den anderen Ergebnissen lässt sich vermuten, dass bei einer weiterführenden Differenzierung entsprechend höhere Expressionslevel detektiert werden könnten.

Calb2 wird als Marker für unreife ORN gehandelt, mit Expressionen, die sich sowohl mit dem Ende der *Tubb3*-Expression, als auch mit dem Anfang der *Omp*-Expression überschneiden. Damit gilt Calb2 als Marker für eine intermediäre Reifungsstufe [117] (Abb. 45). Der Verlauf der Expression von *CALB2* korreliert ebenfalls mit der Expression von *TUBB3* und *OMP*. Auch hier wirft die Absenkung an Tag 100 Fragen auf, über deren Antworten wie oben nur spekuliert werden kann. Auf Proteinebene konnte *CALB2* an Tag 120 in Co-Lokalisation mit *OMP* und *TUBB3* detektiert werden, was die Annahme einer intermediären Reifungsstufe an Tag 120 stützt.

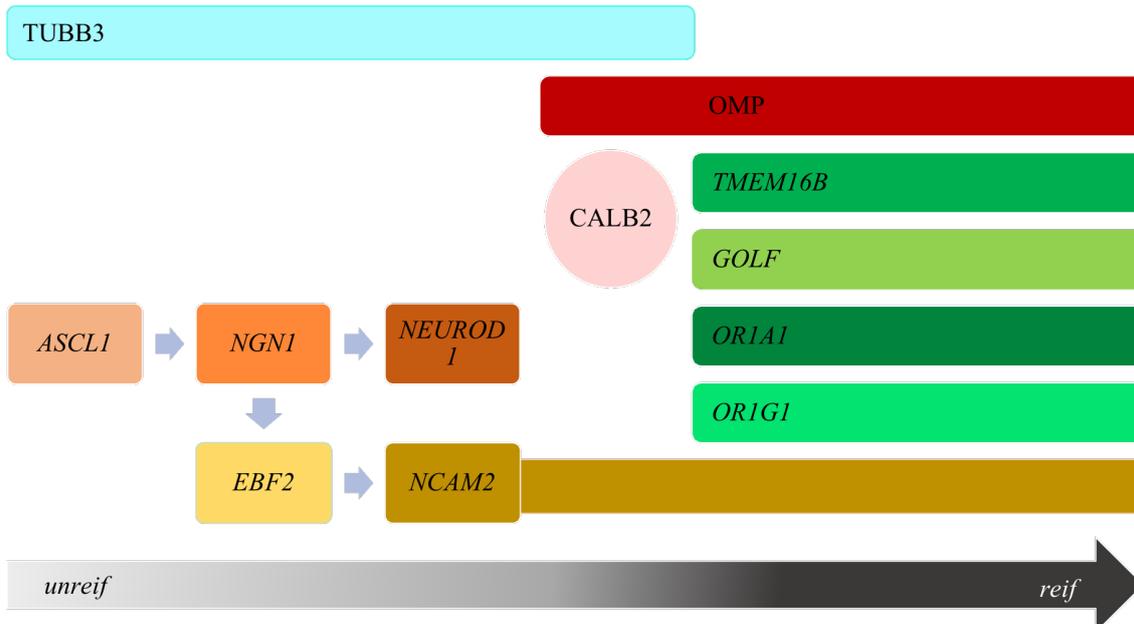


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Zusammenhänge der verwendeten Marker für ORN

Im unreifen Entwicklungsstadium spielen die Signalkaskaden ASCL1-NGN1-NEUROD1 eine Rolle bei der Entwicklung olfaktorischer Neurone. NGN1 beeinflusst weiter die Faktoren EBF2 sowie NCAM2, welches auch in reifen Neuronen gefunden werden kann. CALB2 wird im intermediären Stadium der Entwicklung exprimiert und kann sich mit der Expression von TUBB3 und OMP überschneiden. TUBB3 ist in reifen olfaktorischen Neuronen nicht exprimiert. In reifen ORN sind OMP, TMEM16B, GOLF, OR1A1 und ORIG1 exprimiert.

Zusammenfassung 5.5:

- der Anstieg der RNA-Expressionen der olfaktorischen Vorläuferzellen bis Tag 120 lässt vermuten, dass zu späteren Zeitpunkten mehr reife ORN zu analysieren wären, was durch die zahlreicheren OMP(+)/TUBB3(-) – Färbungen auf Proteinebene an Tag 140 bestätigt wird
- das Protokoll O-BWF8/RA ist geeignet ORN zu generieren, die Ausbeute ist gering, zeigt aber eine zeitliche Zunahme
- das Protokoll sollte über einen längeren Zeitraum hinweg differenziert und analysiert werden und auch auf seine Effizienz und Funktionalität hin getestet werden
- Verbesserungen des Protokolls hinsichtlich der Effizienz der Induktion von PPR und olfaktorischer Plakode sollten im Langzeitversuch auch auf ORN angewendet werden

5.5.4 Tabellarische Übersicht aller verwendeten Marker

Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Marker mit Expressionsanalysen bezogen auf Protokoll O-BWF8 und O-BWF8/RA

Marker	Expressionsgebiete (bezüglich des olfaktorischen Systems)		Analyse RNA	Analyse Protein
	Früh	später		
Six1	PPR	alle Plakoden außer Linse	+	+
Six4	PPR	alle Plakoden außer Linse, trigeminal, hypophyseal	-	+
Eya1	PPR	alle Plakoden	+	-
Eya2	PPR	olfaktorische, phakale, epibranchiale und trigeminale Plakode	+	+
Msx1	Grenzregion, nicht-neurales Ektoderm	Neuralleiste	o	+
Dlx5	Grenzregion, Nicht-neurales Ektoderm	olfaktorische Plakode	+	o
Pax6	Grenzregion, anteriore PPR	Linse	o	+
Sox1	Neuroektodermal	Linse	+	+
FoxE3	PPR, Linse		+	o
Six3	Anteriore PPR		+	o
Pax8	Posteriore PPR	o	+	o
Ebf2	Neurale Vorläuferzellen	Olfaktorische Vorläuferzellen, Mesencephalon, Rhombencephalon, Hypothalamus, Epithalamus	+	+

Foxg1	Oberflächenektoderm	Olfaktorische, otische, epibranchiale, hypophyseale Plakode, optische Gebiete	+	-
Sox2	Neurale Stammzellen		o	+
Sox9	Neuralleiste	Neuralleiste	o	+
OMP		Reife und unreife ORN	+	+
Tubb3		unreife ORN, Axone und Dendriten reifer ORN, generell Neurone	+	+
OR1A1		Olfaktorischer Rezeptor	+	o
OR1G1		Olfaktorischer Rezeptor	+	o
TMEM16B		Olfaktorische Signalkaskade, Chloridkanal	+	
GOLF		Olfaktorische Signalkaskade	+	
CALB2		Zwischenstufe zwischen reifen und unreifen ORN	+	
NCAM2		(Un-)reife ORN v.a. axonal	+	
Ascl1		Olfaktorische Progenitoren	+	
NGN1		Unreife ORN	+	o
NeuroD1		Unreife ORN	+	o

+ = positive Expression, - = negative Expression, o = Analyse nicht durchgeführt

5.6 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnten drei Entwicklungsschritte des olfaktorischen Systems, von PPR über plakodale Regionen bis hin zu ORN, generiert und analysiert werden. Bestärkt wurde damit die Annahme, dass sowohl der FGF- und der Wnt-Signalweg als auch die TGF- und BMP4-Signalwege an der Differenzierung des olfaktorischen Systems beteiligt sind. Hinsichtlich der Effizienz der Protokolle sollten weiterführende Analysen durchgeführt und Anpassungen hinsichtlich der Zusatzdauer und des Zusatzzeitpunktes untersucht werden, besonders im Hinblick auf den TGF-Beta Signalweg. Außerdem sollten neue Ansatzpunkte ins Auge gefasst werden, um ein effektives Protokoll zur Generierung von ORN zu erzeugen. So sind z.B. Somatostatin und Nociceptin Neuropeptide, die die Differenzierung der anterioren PPR mit beeinflussen sollen. Dabei fördert das mesodermale Somatostatin die ektodermale Nociceptin Expression und beide regulieren die Pax6-Expression in phakalen und olfaktorischen Vorläuferzellen [24].

Um eine Analyse der Differenzierungen zu verbessern und zu vereinfachen wird derzeit an Promotorkonstrukten für SIX und EYA gearbeitet. Wird ein Gen abgelesen, aktiviert sich der angehängte fluoreszierende GFP-Anteil. Mit Hilfe dieser Promotorkonstrukte lassen sich bereits in noch lebenden Zellen Gene analysieren und fixierte Präparationen können vermieden werden. So werden auch schnellere Anpassungen ermöglicht. Die Identifikation positiver Zellen ermöglicht außerdem die Separation dieser Zellen von anderen Zelltypen und ermöglicht damit eine noch genauere Untersuchung der notwendigen Induktions-Signalwege, ohne parakrine Signale anderer Zelltypen miteinzubeziehen. Auch hinsichtlich der Analyse der zeitlichen Abfolge der jeweiligen Entwicklungsschritte ist diese neue Technik hervorragend geeignet, da die Zellkultur in kurzen zeitlichen Abschnitten (ohne Zellverlust durch Fixierung) untersucht werden kann.

Mithilfe dieser neuen Modelle sollte es möglich sein, die hier bereits untersuchten Protokolle noch eingehender zu untersuchen und hinsichtlich ihrer Effizienz zu verbessern.

Die erfolgreiche Generierung plakodaler Zellen ist jedoch auch für die Differenzierung anderer plakodaler Systeme, wie z.B. der Linse oder der Adenohypophyse von Bedeutung und kann auch im Hinblick auf weitere Forschung in anderen Bereichen genutzt werden.

In medizinischer Hinsicht kann ein erfolgreich etabliertes Protokoll dazu dienen, die bisher vernachlässigte Olfaktion genauer zu verstehen sowie spezifische Mutationen genauer zu untersuchen und Therapeutika zu testen. Olfaktorische Krankheiten wie das Kallmann-Syndrom könnten besser verstanden werden und auch die Branchio-Otogenen-Syndrome könnten eingehender erforscht werden. In ferner Zukunft könnte eine Kultivierung funktionaler und reifer ORN in einem Olfaktorischen Epithel auf Basis hiPSZ auch dazu dienen, Menschen mit Riechstörungen aufgrund von Traumata oder viralen Infektionen eine Therapieoption zu bieten.

Zusammenfassung

Der Geruchssinn findet trotz seiner psychologischen Relevanz und alltäglichen Funktion noch vergleichsweise wenig Beachtung. Dementsprechend beschäftigt sich auch die olfaktorische Forschung noch weitgehend mit grundlegenden Erkenntnissen und gewinnt nur langsam an Stellenwert, etwa in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Parkinson. Durch seine Fähigkeit zur Regeneration und der einzigartigen Konstellation einer direkten Verbindung primärer Sinnesneurone zur Außenwelt hat das olfaktorische System jedoch besonderes Interesse verdient.

In dieser Arbeit wurden auf Basis humaner induziert pluripotenter Stammzellen Differenzierungen durchgeführt und diese auf die Entstehung olfaktorischer embryonaler Entwicklungsstadien hin untersucht. Dabei wurde der Fokus auf die Stadien der präplakodalen Region, der olfaktorischen Plakode sowie olfaktorischer Rezeptorneurone (ORN) gelegt. Hier wurden auf Grundlage neuronaler Differenzierungsprotokolle unter anderem FGF-, BMP-, WNT- und TGF-Beta-Signalwege beeinflusst. Zur Analyse wurden jeweils immunhistochemische Färbungen und qRT-PCR verwendet.

Im ersten Schritt wurden zwei Protokolle mit Anpassungen hinsichtlich der Signalwegstransduktion bezüglich ihrer Eignung zur Generierung präplakodaler Zellen sowie olfaktorischer Plakodenzellen verglichen.

Auf präplakodaler Ebene konnte in jeweils gemischten Zellkulturen unter anderem durch die Detektion der spezifischen präplakodalen Marker SIX und EYA in beiden Differenzierungen die Generierung präplakodaler Zellen bestätigt werden.

Jedoch zeigten sich in der Differenzierung mit Fokus auf dem TGF-Beta-Signalweg deutliche Schwierigkeiten in der Zellkultivierung. Es zeigte sich verstärkt Apoptose und die Entstehung plakodaler Zellen konnte nicht eindeutig bestätigt werden. Im Differenzierungsprotokoll mit Fokus auf dem FGF8-Signalweg konnten wiederum an Tag 30 über die Zellkultur verteilt breitflächige SIX1- und SIX4-positive Populationen generiert werden, in diesen spezifischen Regionen zeigten sich im Mittel 86 % der Zellen SIX1-positiv (n=3). Die Zusammenschau von RNA und Protein-Analysen ließ zwar auch hier auf die Entstehung einer gemischten Zellkultur schließen, die Generierung plakodaler Zellen konnte aber gezeigt werden. Um einen olfaktorischen Charakter der differenzierten

plakodalen Zellen zu bestätigen, sind jedoch weitere Analysen mit spezifischen olfaktorischen Markern wie beispielsweise *EMX2* notwendig.

Im zweiten Schritt erfolgte entsprechend des oben genannten Protokollvergleichs die Langzeitdifferenzierung hinsichtlich ORN, ebenfalls mit Fokus auf *FGF8*. Es entstand eine neuronale Mischkultur, in welcher *OMP*-positive/*TUBB3*-negative Neurone detektiert wurden, die aufgrund ihrer immunhistochemischen Eigenschaften, ihrer RNA-Expressionen sowie ihrer bipolaren Morphologie als ORN eingeordnet wurden. Die Analyse der Transkriptionsfaktoren *OMP*, *GOLF*, *NCAM2*, *ORIG1*, *OR1A1* und *TMEM16B* deutete darauf hin, dass die generierten ORN auch funktionell sein könnten. Die Differenzierung erfolgte hier nur bis Tag 140, eine Testung hinsichtlich Effizienz und Funktionalität sollte zur genaueren Analyse auch zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen, da sich die Generierung von ORN zwar gering, aber im zeitlichen Verlauf deutlich zunehmend zeigte. Die hier durchgeführten Differenzierungen zeigen erste positive Ergebnisse auf dem Weg zur Generierung dieses komplizierten sensorischen Systems. Jedoch müssen die hier verwendeten Protokolle eindeutiger analysiert und hinsichtlich ihrer Effizienz noch verbessert werden.

Summary

Despite its psychological relevance and its everyday life function, olfaction still finds little attention. Thus, olfactory research is still dealing with basic understanding and gains limited significance e.g. in relation to neurodegenerative diseases like Morbus Parkinson. The olfactory system is nonetheless of particular interest due to its ability of regeneration and the unique direct connection of primary sensory neurons to the outside world.

In this thesis, differentiations were performed with human induced pluripotent stem cells and the development of olfactory embryologic stages was evaluated. Hereby, special focus was placed on the development of the preplacodal region, the olfactory placode and olfactory receptor neurons (ORN). Neuronal differentiation protocols were adjusted with regard to the signal pathways FGF, BMP, WNT and TGF-Beta. Immunohistochemical stainings and qRT-PCR were used for analysis.

In the first step, two differentiation protocols, differing in signal pathway induction, were compared regarding the development of preplacodal and placodal cells.

Preplacodal cells could be identified in the developed mixed cell cultures by the detection of the specific preplacodal markers SIX and EYA in both differentiations.

But cell cultivation in the differentiation with special focus on the TGF-Beta signal pathway showed severe difficulties. Increased apoptosis led to a significant impairment of cell differentiation and placodal cells could not be clearly detected. In the differentiation with focus on the FGF8 signal pathway, wide SIX1- and SIX4-positive populations could be detected on day 30, in these specific positive regions 86 % of the cell population was SIX1-positive (n=3). The results of RNA and protein analysis still indicated the formation of a mixed cell culture but the development of placodal cells could be clearly identified. Further analysis with specific olfactory markers like EMX2 is necessary to verify the olfactory character of the differentiated placodal cells.

In the second step, long-term differentiation regarding the development of ORN took place with focus on the FGF8 signal pathway in accordance with the results of the protocol comparison. A neuronal mix culture was created in which OMP-positive/TUBB3-negative neurons could be detected. These were classified as ORN because of their bipolar morphology, immunohistochemical characteristics and RNA expression patterns. The

analysis of *OMP*, *GOLF*, *NCAM2*, *ORIG1*, *OR1A1* and *TMEM16B* indicated that these ORN could also be functional. Differentiation was only pursued until day 140. Further testing regarding efficacy and functionality should take place at a later timepoint since development of ORN was still low but noticeable increasing over time.

The differentiations presented here show positive results in the attempt of the development of a complicated sensory system. However, the applied differentiation protocols have to be further analyzed and improved regarding to their efficacy.

Literaturverzeichnis

1. Philpott, C.M., A. Bennett, and G.E. Murty, *A brief history of olfaction and olfactometry*. J Laryngol Otol, 2008. **122**(7): p. 657-62.
2. Boesveldt, S., et al., *Anosmia-A Clinical Review*. Chemical senses, 2017. **42**(7): p. 513-523.
3. Philpott, C.M. and D. Boak, *The impact of olfactory disorders in the United kingdom*. Chem Senses, 2014. **39**(8): p. 711-8.
4. Hummel, T., *Umfangreiche Informationen zum Thema „Riech- und Schmeckstörungen“*.
5. Hüttenbrink, K.-B.H., Thomas; Berg, Daniela; Gasser, Thomas; Hähner, Antje, *Riechstörungen- Häufig im Alter und wichtiges Frühsymptom neurodegenerativer Erkrankungen*. Deutsches Ärzteblatt, 2013.
6. Albrecht, J. and M. Wiesmann, *Das olfaktorische System des Menschen*. Der Nervenarzt, 2006. **77**(8): p. 931-939.
7. Temmel, A.F., et al., *Characteristics of olfactory disorders in relation to major causes of olfactory loss*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2002. **128**(6): p. 635-41.
8. Stevenson, R.J., *An initial evaluation of the functions of human olfaction*. Chem Senses, 2010. **35**(1): p. 3-20.
9. *Geruchssinn*, in *Lexikon der Biologie* 1999.
10. Hummel, T. and S. Nordin, *Olfactory disorders and their consequences for quality of life*. Acta Otolaryngol, 2005. **125**(2): p. 116-21.
11. Nonnenmacher, A., *Anosmie*. MedLexi.de, 2018.
12. de m Freitas, P., et al., *[Neuroradiology of Kallmann's syndrome]*. Acta Med Port, 2001. **14**(1): p. 123-6.
13. Baker, C.V. and M. Bronner-Fraser, *Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction*. Dev Biol, 2001. **232**(1): p. 1-61.
14. Rugarli, E.I., *Kallmann syndrome and the link between olfactory and reproductive development*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(4): p. 943-8.
15. Sailani, M.R., et al., *Isolated Congenital Anosmia and CNGA2 Mutation*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2667.
16. Schwob, J.E., *Neural regeneration and the peripheral olfactory system*. Anat Rec, 2002. **269**(1): p. 33-49.
17. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
18. Fusaki, N., et al., *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, 2009. **85**(8): p. 348-62.
19. Zakrzewski, W., et al., *Stem cells: past, present, and future*. Stem Cell Res Ther, 2019. **10**(1): p. 68.
20. Tabar, V. and L. Studer, *Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(2): p. 82-92.
21. Leung, A.W., D. Kent Morest, and J.Y. Li, *Differential BMP signaling controls formation and differentiation of multipotent preplacodal ectoderm progenitors from human embryonic stem cells*. Dev Biol, 2013. **379**(2): p. 208-20.

22. Dincer, Z., et al., *Specification of Functional Cranial Placode Derivatives from Human Pluripotent Stem Cells*. Cell reports, 2013. **5**(5): p. 10.1016/j.celrep.2013.10.048.
23. Chen, W., et al., *Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors*. Nature, 2012. **490**(7419): p. 278-82.
24. Saint-Jeannet, J.-P. and S.A. Moody, *Establishing the pre-placodal region and breaking it into placodes with distinct identities*. Developmental Biology, 2014. **389**(1): p. 13-27.
25. Maier, E.C., et al., *Sensational placodes: neurogenesis in the otic and olfactory systems*. Developmental biology, 2014. **389**(1): p. 50-67.
26. Knouff, R.A., *The developmental pattern of ectodermal placodes in Rana Pipiens*. Journal of Comparative Neurology, 1935. **62**(1): p. 17-71.
27. Bhattacharyya, S., et al., *Segregation of lens and olfactory precursors from a common territory: cell sorting and reciprocity of Dlx5 and Pax6 expression*. Dev Biol, 2004. **271**(2): p. 403-14.
28. Streit, A., *The preplacodal region: an ectodermal domain with multipotential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia*. Int J Dev Biol, 2007. **51**(6-7): p. 447-61.
29. Litsiou, A., S. Hanson, and A. Streit, *A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head*. Development, 2005. **132**(18): p. 4051-4062.
30. Moody, S.A. and A.S. LaMantia, *Transcriptional regulation of cranial sensory placode development*. Curr Top Dev Biol, 2015. **111**: p. 301-50.
31. Schlosser, G. and K. Ahrens, *Molecular anatomy of placode development in Xenopus laevis*. Dev Biol, 2004. **271**(2): p. 439-66.
32. Pieper, M., et al., *Differential distribution of competence for panplacodal and neural crest induction to non-neural and neural ectoderm*. Development, 2012. **139**(6): p. 1175-87.
33. Phillips, B.T., et al., *Zebrafish msxB, msxC and msxE function together to refine the neural-nonneural border and regulate cranial placodes and neural crest development*. Dev Biol, 2006. **294**(2): p. 376-90.
34. McLarren, K.W., A. Litsiou, and A. Streit, *DLX5 positions the neural crest and preplacode region at the border of the neural plate*. Developmental Biology, 2003. **259**(1): p. 34-47.
35. Riley, B.B. and B.T. Phillips, *Ringin in the new ear: resolution of cell interactions in otic development*. Developmental Biology, 2003. **261**(2): p. 289-312.
36. Ogino, H., et al., *Transcription factors involved in lens development from the preplacodal ectoderm*. Developmental Biology, 2012. **363**(2): p. 333-347.
37. Mizuseki, K., et al., *Xenopus Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction*. Development, 1998. **125**(4): p. 579-87.
38. Panaliappan, T.K., et al., *Sox2 is required for olfactory pit formation and olfactory neurogenesis through BMP restriction and Hes5 upregulation*. Development, 2018. **145**(2).
39. Pevny, L. and M. Placzek, *SOX genes and neural progenitor identity*. Curr Opin Neurobiol, 2005. **15**(1): p. 7-13.

40. Mengarelli, I. and T. Barberi, *Derivation of multiple cranial tissues and isolation of lens epithelium-like cells from human embryonic stem cells*. Stem Cells Transl Med, 2013. **2**(2): p. 94-106.
41. Suter, D.M., et al., *A Sox1 to Pax6 switch drives neuroectoderm to radial glia progression during differentiation of mouse embryonic stem cells*. Stem Cells, 2009. **27**(1): p. 49-58.
42. Kamachi, Y., et al., *Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction*. Development, 1998. **125**(13): p. 2521-32.
43. Pandur, P.D. and S.A. Moody, *Xenopus Six1 gene is expressed in neurogenic cranial placodes and maintained in the differentiating lateral lines*. Mech Dev, 2000. **96**(2): p. 253-7.
44. Brugmann, S.A., et al., *Six1 promotes a placodal fate within the lateral neurogenic ectoderm by functioning as both a transcriptional activator and repressor*. Development, 2004. **131**(23): p. 5871.
45. Kohrt, D., et al., *CDK6 binds and promotes the degradation of the EYA2 protein*. Cell Cycle, 2014. **13**(1): p. 62-71.
46. Fan, X., et al., *The alpha subunits of Gz and Gi interact with the eyes absent transcription cofactor Eya2, preventing its interaction with the six class of homeodomain-containing proteins*. J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 32129-34.
47. Chambers, S.M., et al., *Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(3): p. 275-80.
48. Bailey, A.P., et al., *Lens Specification Is the Ground State of All Sensory Placodes, from which FGF Promotes Olfactory Identity*. Developmental Cell, 2006. **11**(4): p. 505-517.
49. Schlosser, G., *Induction and specification of cranial placodes*. Developmental Biology, 2006. **294**(2): p. 303-351.
50. Redl, E., et al., *Expression of six3 and otx in Solenogastres (Mollusca) supports an ancestral role in bilaterian anterior-posterior axis patterning*. Evol Dev, 2018. **20**(1): p. 17-28.
51. Matsuo, I., et al., *Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head*. Genes Dev, 1995. **9**(21): p. 2646-58.
52. Graham, A. and S.M. Shimeld, *The origin and evolution of the ectodermal placodes*. Journal of Anatomy, 2013. **222**(1): p. 32-40.
53. Hilal, E.M., J.H. Chen, and A.J. Silverman, *Joint migration of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and neuropeptide Y (NPY) neurons from olfactory placode to central nervous system*. J Neurobiol, 1996. **31**(4): p. 487-502.
54. Graziadei, P.P.C. and A.G. Monti-Graziadei, *The influence of the olfactory placode on the development of the telencephalon in Xenopus laevis*. Neuroscience, 1992. **46**(3): p. 617-629.
55. Dubois, L. and A. Vincent, *The COE – Collier/Olf1/EBF – transcription factors: structural conservation and diversity of developmental functions*. Mechanisms of Development, 2001. **108**(1): p. 3-12.
56. Burns, C.J. and M.L. Vetter, *Xath5 regulates neurogenesis in the Xenopus olfactory placode*. Dev Dyn, 2002. **225**(4): p. 536-43.
57. Kwon, H.-J., et al., *Identification of Early Requirements for Preplacodal Ectoderm and Sensory Organ Development*. PLOS Genetics, 2010. **6**(9): p. e1001133.

58. Ahrens, K. and G. Schlosser, *Tissues and signals involved in the induction of placodal Six1 expression in Xenopus laevis*. Dev Biol, 2005. **288**(1): p. 40-59.
59. Esterberg, R. and A. Fritz, *dlx3b/4b are required for the formation of the preplacodal region and otic placode through local modulation of BMP activity*. Dev Biol, 2009. **325**(1): p. 189-99.
60. Sjodal, M., T. Edlund, and L. Gunhaga, *Time of exposure to BMP signals plays a key role in the specification of the olfactory and lens placodes ex vivo*. Dev Cell, 2007. **13**(1): p. 141-9.
61. Kitisin, K., et al., *Tgf-Beta signaling in development*. Sci STKE, 2007. **2007**(399): p. cm1.
62. Tchieu, J., et al., *A Modular Platform for Differentiation of Human PSCs into All Major Ectodermal Lineages*. Cell Stem Cell, 2017. **21**(3): p. 399-410.e7.
63. Beites, C.L., et al., *Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium*. Exp Cell Res, 2005. **306**(2): p. 309-16.
64. Cvekl, A. and M.K. Duncan, *Genetic and epigenetic mechanisms of gene regulation during lens development*. Progress in retinal and eye research, 2007. **26**(6): p. 555-597.
65. Groves, A.K. and C. LaBonne, *Setting appropriate boundaries: fate, patterning and competence at the neural plate border*. Dev Biol, 2014. **389**(1): p. 2-12.
66. DeHamer, M.K., et al., *Genesis of olfactory receptor neurons in vitro: Regulation of progenitor cell divisions by fibroblast growth factors*. Neuron, 1994. **13**(5): p. 1083-1097.
67. LaMantia, A.S., M.C. Colbert, and E. Linney, *Retinoic acid induction and regional differentiation prefigure olfactory pathway formation in the mammalian forebrain*. Neuron, 1993. **10**(6): p. 1035-48.
68. LaMantia, A.S., et al., *Mesenchymal/epithelial induction mediates olfactory pathway formation*. Neuron, 2000. **28**(2): p. 411-25.
69. Mic, F.A., et al., *RALDH3, a retinaldehyde dehydrogenase that generates retinoic acid, is expressed in the ventral retina, otic vesicle and olfactory pit during mouse development*. Mechanisms of Development, 2000. **97**(1): p. 227-230.
70. Farbman, A.I., *Developmental biology of olfactory sensory neurons*. Semin Cell Biol, 1994. **5**(1): p. 3-10.
71. Toba, Y., et al., *Immunohistochemical localization of calbindin D-28k in the migratory pathway from the rat olfactory placode*. J Neuroendocrinol, 2001. **13**(8): p. 683-94.
72. Burbach, J.P., *[The 2004 Nobel Prize for Physiology or Medicine for research into smell receptors and the organization of the olfactory system]*. Ned Tijdschr Geneesk, 2004. **148**(52): p. 2576-9.
73. Hoskison, E.E., *Olfaction, pheromones and life*. J Laryngol Otol, 2013. **127**(12): p. 1156-9.
74. Chen, C.R., et al., *Anatomy and cellular constituents of the human olfactory mucosa: a review*. Journal of neurological surgery. Part B, Skull base, 2014. **75**(5): p. 293-300.
75. Iwai, N., et al., *Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium*. Stem cells (Dayton, Ohio), 2008. **26**(5): p. 1298-1306.

76. Barraud, P., et al., *Neural crest origin of olfactory ensheathing glia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(49): p. 21040-5.
77. Nedelec, S., C. Dubacq, and A. Trembleau, *Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special?* J Neurocytol, 2005. **34**(1-2): p. 49-64.
78. Palmer, M.J., *Characterisation of bipolar cell synaptic transmission in goldfish retina using paired recordings*. The Journal of physiology, 2010. **588**(Pt 9): p. 1489-1498.
79. Monti-Graziadei, G.A., et al., *Immunocytochemistry of the olfactory marker protein*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1977. **25**(12): p. 1311-1316.
80. Farbman, A.I. and F.L. Margolis, *Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization*. Dev Biol, 1980. **74**(1): p. 205-15.
81. Menco, B.P., et al., *Ultrastructural localization of olfactory transduction components: the G protein subunit Golf alpha and type III adenylyl cyclase*. Neuron, 1992. **8**(3): p. 441-53.
82. Bakalyar, H.A. and R.R. Reed, *Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection*. Science, 1990. **250**(4986): p. 1403-6.
83. Jones, D.T. and R.R. Reed, *Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction*. Science, 1989. **244**(4906): p. 790-5.
84. Pifferi, S., V. Cenedese, and A. Menini, *Anoctamin 2/TMEM16B: a calcium-activated chloride channel in olfactory transduction*. Exp Physiol, 2012. **97**(2): p. 193-9.
85. Shan Xiong*, S.Z., Lina Guan, Jing Chen, Xiang Tu, Qiang Li, Hongqun Jiang, *Differentiation of induced pluripotent stem cells for future olfactory repair using an indirect co-culture technique*. Int J Clin Exp Pathol 2017, 2017.
86. Brickman, J.M. and P. Serup, *Properties of embryoid bodies*. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2017. **6**(2).
87. Chandrasekaran, A., et al., *Comparison of 2D and 3D neural induction methods for the generation of neural progenitor cells from human induced pluripotent stem cells*. Stem Cell Res, 2017. **25**: p. 139-151.
88. Watanabe, K., et al., *A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(6): p. 681-6.
89. Zhang, M., H.R. Scholer, and B. Greber, *Rapid and efficient generation of neurons from human pluripotent stem cells in a multititre plate format*. J Vis Exp, 2013(73): p. e4335.
90. Elkabetz, Y., et al., *Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage*. Genes Dev, 2008. **22**(2): p. 152-65.
91. Wilson, P.G. and S.S. Stice, *Development and differentiation of neural rosettes derived from human embryonic stem cells*. Stem Cell Rev, 2006. **2**(1): p. 67-77.
92. Meyers, E.A. and J.A. Kessler, *TGF-beta Family Signaling in Neural and Neuronal Differentiation, Development, and Function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(8).
93. Brewer, G.J., *Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus*. J Neurosci Res, 1995. **42**(5): p. 674-83.
94. Raab, S., *Entwicklung und Charakterisierung eines iPSZ basierten Differenzierungsprotokolls zu olfaktorischen Rezeptorneuronen*, in

- Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät und Medizinische Fakultät
Tübingen. 2017, Eberhard Karls Universität Tübingen. p. 147.*
95. Sato, S., et al., *Conserved expression of mouse Six1 in the pre-placodal region (PPR) and identification of an enhancer for the rostral PPR*. *Developmental Biology*, 2010. **344**(1): p. 158-171.
 96. Ohto, H., et al., *Cooperation of six and eya in activation of their target genes through nuclear translocation of Eya*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(10): p. 6815-24.
 97. Xu, P.X., et al., *Mouse Eya homologues of the Drosophila eyes absent gene require Pax6 for expression in lens and nasal placode*. *Development*, 1997. **124**(1): p. 219.
 98. Tribulo, C., et al., *Regulation of Msx genes by a Bmp gradient is essential for neural crest specification*. *Development*, 2003. **130**(26): p. 6441.
 99. Wang, S.S., R.Y. Tsai, and R.R. Reed, *The characterization of the Olf-1/EBF-like HLH transcription factor family: implications in olfactory gene regulation and neuronal development*. *J Neurosci*, 1997. **17**(11): p. 4149-58.
 100. Cheung, M. and J. Briscoe, *Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9*. *Development*, 2003. **130**(23): p. 5681.
 101. Zou, D., et al., *Eya1 and Six1 are essential for early steps of sensory neurogenesis in mammalian cranial placodes*. *Development*, 2004. **131**(22): p. 5561.
 102. Ikeda, K., et al., *Six1 is indispensable for production of functional progenitor cells during olfactory epithelial development*. *Int J Dev Biol*, 2010. **54**(10): p. 1453-64.
 103. Sahly, I., P. Andermann, and C. Petit, *The zebrafish eya1 gene and its expression pattern during embryogenesis*. *Development Genes and Evolution*, 1999. **209**(7): p. 399-410.
 104. Grindley, J.C., D.R. Davidson, and R.E. Hill, *The role of Pax-6 in eye and nasal development*. *Development*, 1995. **121**(5): p. 1433-42.
 105. Kawauchi, S., et al., *Fgf8 expression defines a morphogenetic center required for olfactory neurogenesis and nasal cavity development in the mouse*. *Development*, 2005. **132**(23): p. 5211-23.
 106. Yoshida, M., et al., *Emx1 and Emx2 functions in development of dorsal telencephalon*. *Development*, 1997. **124**(1): p. 101.
 107. Huang, X., et al., *The doublesex-related gene, XDmrt4, is required for neurogenesis in the olfactory system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(32): p. 11349-54.
 108. Bhattacharyya, S. and M. Bronner-Fraser, *Competence, specification and commitment to an olfactory placode fate*. *Development*, 2008. **135**(24): p. 4165-77.
 109. Hatini, V., et al., *Dynamics of placodal lineage development revealed by targeted transgene expression*. *Dev Dyn*, 1999. **215**(4): p. 332-43.
 110. Medina-Martinez, O., et al., *Severe defects in proliferation and differentiation of lens cells in Foxe3 null mice*. *Molecular and cellular biology*, 2005. **25**(20): p. 8854-8863.
 111. Hintze, M., et al., *Cell interactions, signals and transcriptional hierarchy governing placode progenitor induction*. *Development*, 2017. **144**(15): p. 2810-2823.

112. Liu, W., et al., *Six3 activation of Pax6 expression is essential for mammalian lens induction and specification*. *Embo j*, 2006. **25**(22): p. 5383-95.
113. Holbrook, E.H., et al., *Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue*. *Laryngoscope*, 2011. **121**(8): p. 1687-701.
114. Weiler, E. and A. Benali, *Olfactory epithelia differentially express neuronal markers*. *J Neurocytol*, 2005. **34**(3-5): p. 217-40.
115. Lee, V.M. and S.K. Pixley, *Age and differentiation-related differences in neuron-specific tubulin immunostaining of olfactory sensory neurons*. *Developmental Brain Research*, 1994. **83**(2): p. 209-215.
116. Roskams, A.J.I., X. Cai, and G.V. Ronnett, *Expression of neuron-specific beta-III tubulin during olfactory neurogenesis in the embryonic and adult rat*. *Neuroscience*, 1998. **83**(1): p. 191-200.
117. Wei, H., M.-F. Lang, and X. Jiang, *Calretinin is expressed in the intermediate cells during olfactory receptor neuron development*. *Neuroscience Letters*, 2013. **542**: p. 42-46.
118. Cunningham, A.M., et al., *Olfactory receptor neurons exist as distinct subclasses of immature and mature cells in primary culture*. *Neuroscience*, 1999. **93**(4): p. 1301-12.
119. Baker, H., M. Grillo, and F.L. Margolis, *Biochemical and immunocytochemical characterization of olfactory marker protein in the rodent central nervous system*. *J Comp Neurol*, 1989. **285**(2): p. 246-61.
120. Pronin, A., et al., *Expression of olfactory signaling genes in the eye*. *PloS one*, 2014. **9**(4): p. e96435-e96435.
121. Lee, A.C., J. He, and M. Ma, *Olfactory marker protein is critical for functional maturation of olfactory sensory neurons and development of mother preference*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2011. **31**(8): p. 2974-2982.
122. Yoshihara, Y., et al., *OCAM: A new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons*. *J Neurosci*, 1997. **17**(15): p. 5830-42.
123. Klingenstein, M., *Charakterisierung von in vitro differenzierten olfaktorischen Rezeptorneuronen aus induziert pluripotenten Stammzellen*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche und Medizinische Fakultät der Universität Tübingen. 2017*, Eberhard Karls Universität Tübingen. p. 142.
124. Herve, D., M. Rogard, and M. Levi-Strauss, *Molecular analysis of the multiple Golf alpha subunit mRNAs in the rat brain*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995. **32**(1): p. 125-34.
125. Cau, E., S. Casarosa, and F. Guillemot, *Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage*. *Development*, 2002. **129**(8): p. 1871-80.
126. Nieto, M., et al., *Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors*. *Neuron*, 2001. **29**(2): p. 401-13.
127. Monahan, K., et al., *Cooperative interactions enable singular olfactory receptor expression in mouse olfactory neurons*. *eLife*, 2017. **6**: p. e28620.
128. Raab, S., et al., *A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation*. *Stem Cells International*, 2014. **2014**: p. 12.
129. Ruf, R.G., et al., *SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYAI-SIX1-DNA complexes*. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(21): p. 8090-8095.

130. Kaiser, R., *Branchio-Oculo-Facial Syndrom - Segregationsanalysen und Mutationssuche zur Identifizierung von Kandidatengenegen*, in *Open Access Repositorium der Universität Ulm*. 2007.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der zweiblättrigen Keimscheibe und der Gastrulation	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Neurulation mit Entstehung der Grenzregion	13
Abbildung 4: Schematische Übersicht der definierenden Faktoren im Stadium der Neurulation	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Differenzierung der Plakoden	18
Abbildung 6: Schematische Übersicht der definierenden Faktoren von PPR zu Plakoden	19
Abbildung 7: Schematische Übersicht der Lokalisation der Plakoden	19
Abbildung 8: Signalwege in der frühen Gastrulation und der frühen Neurulation	24
Abbildung 9: Signalwege der Achsenteilung der PPR	25
Abbildung 10: Schematische Darstellung des olfaktorischen Epithels	28
Abbildung 11: Übersicht der Arbeitsabschnitte	30
Abbildung 16: Olfaktorische Differenzierung in vitro	55
Abbildung 17: SIX1-Analyse der PPR auf Proteinebene	57
Abbildung 18: SIX4-Analyse der PPR auf Proteinebene	58
Abbildung 19: EYA-Analyse der PPR auf Proteinebene	59
Abbildung 20: EBF2-Analyse der PPR auf Proteinebene	60
Abbildung 21: SOX2-Analyse der PPR auf Proteinebene	60
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Auszählung der analysierten SIX1-positiven Zellpopulationen	61
Abbildung 23: SIX1-Analyse der OP auf Proteinebene	63
Abbildung 24: SIX4-Analyse der OP auf Proteinebene	64
Abbildung 25: EYA-Analyse der OP auf Proteinebene	65
Abbildung 26: EBF2-Analyse der OP auf Proteinebene	66
Abbildung 27: Auswertung der Zellauszählung zum Vergleich von O-BWF8 zu O-BWF8/TGF an Tag 12	67
Abbildung 28: Auswertung der Zellauszählung zum Vergleich von O-BWF8 zu O-BWF8/TGF an Tag 18	68
Abbildung 29: Auswertung der Zellauszählung zum Vergleich von O-BWF8 zu O-BWF8/TGF an Tag 31	68
Abbildung 30: Lichtmikroskopische Aufnahmen von O-BWF8 und O-BWF8/TGF	71
Abbildung 31: Fluoreszenzaufnahme von O-BWF8 und O-BWF8/TGF an Tag 30	70
Abbildung 32: SIX3 und DLX5 Genexpressionsanalyse	73

Abbildung 33: SIX1, PAX8 und FOXC1 Genexpressionsanalyse	74
Abbildung 34: EBF2, EYA2 und EYA1 Genexpressionsanalyse	74
Abbildung 35: FOXC3 und SOX1 Genexpressionsanalyse	75
Abbildung 36: OMP-Analyse auf Proteinebene an Tag 100 – Übersichtsbild gruppiertes ORN	78
Abbildung 37: OMP-Analyse auf Proteinebene an Tag 140 – Übersichtsbild gruppiertes ORN	78
Abbildung 38: Darstellung bipolarer Neurone - Proteinanalyse von OMP und TUBB3 an Tag 100, 120 und 140	79
Abbildung 39: NCAM2- und CALB2- Analyse auf Proteinebene an Tag 100 und 120	80
Abbildung 40: NCAM2, OMP und TUBB3 Genexpressionsanalyse	81
Abbildung 41: OR1A1 und OR1G1 Genexpressionsanalyse	82
Abbildung 42: EBF2, GOLF und CALB2 Genexpressionsanalyse	82
Abbildung 43: ASCL1, NGN1, NEUROD1 und FOXC1 Genexpressionsanalyse .	83
Abbildung 44: Schematische Darstellung der analysierten Stufen der Differenzierung	99
Abbildung 45: Schematische Darstellung der Zusammenhänge der verwendeten Marker für ORN	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien	31
Tabelle 2: Grundmedien	31
Tabelle 3: Grundmedien der Differenzierungsprotokolle	32
Tabelle 4: Zusätze	33
Tabelle 5: Zusammensetzung der Medien	34
Tabelle 6: Differenzierung Protokoll O-BWF8	35
Tabelle 7: Differenzierung Protokoll O-BWF8/TGF	35
Tabelle 8: Differenzierung Protokoll O-BWF8/RA	36
Tabelle 9: Chemikalien, Enzyme, Zusätze	36
Tabelle 10: Vektoren	38
Tabelle 11: Kits	39
Tabelle 12: Primer	39
Tabelle 13: Primärantikörper	39
Tabelle 14: Sekundärantikörper	41
Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien	42
Tabelle 16: Geräte	43
Tabelle 17: Software	44
Tabelle 18: Mastermix	52
Tabelle 19: PCR-Laufzeiten	52
Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Marker mit Expressionsanalysen bezogen auf Protokoll O-BWF8 und O-BWF8/RA	106

In Liebe meinen Eltern gewidmet