

**Entwicklung und Anwendung neuer Analyseverfahren zur
Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen**

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von

Thomas Wilhelm

aus Bad Salzungen
vorgelegte

D i s s e r t a t i o n

2008

Tag der mündlichen Prüfung:	21. Mai 2008
Dekan:	Prof. Dr. H. A. Mallot
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. A. Nordheim
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. S. Stevanovic

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Biologie embryonaler Stammzellen und ihre Anwendung	1
1.1.1 Eigenschaften undifferenzierter ES-Zellen	1
1.2 Hämatopoese in vivo und in vitro	6
1.2.1 Ursprung hämatopoetischer Stammzellen <i>in vivo</i>	6
1.2.2 Hämatopoetische Differenzierung <i>in vitro</i>	8
1.2.3 Ansatzpunkte die eine adulte Repopulation des Knochenmarks ermöglichen	11
1.3. Neuronale Differenzierung embryonaler Stammzellen	12
1.4 Einfluss von Retinoinsäure auf die ES-Zell Differenzierung	14
1.4.1 Entwicklungsbiologische Rolle von Retinoinsäure <i>in vivo</i>	14
1.4.2 Signalweg der Retinoinsäure	17
1.4.3 RA-induzierte Differenzierung <i>in vitro</i>	18
1.5 Herausforderungen und Probleme der Differenzierung embryonaler Stammzellen	20
1.6 Ziel der Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Abkürzungen	22
2.2 Chemikalien- und Verbrauchsmaterialienverzeichnis	24
2.2.1 Chemikalien	24
2.2.2 Geräte und Werkzeuge	25
2.2.3 Kits, Standards und Enzyme	26
2.3 Antikörper	26
2.4 Oligonukleotide für die RT-PCR	27
2.5 Zelllinie	28
2.6 Zellbiologische Methoden	29
2.6.1 Zellkultur-Medien	29
2.6.1.1 ES-Zellmedium und Differenzierungsmedien	29
2.6.1.2 Lösungen für die ES-Zelldifferenzierung	31
2.6.2 Zellkultur muriner ES Zellen	32
2.6.3 Passagieren muriner ES-Zellen	32
2.6.4 Einfrieren von murinen ES-Zellen	32
2.6.5 Auftauen von murinen ES-Zellen	33
2.6.6 Alkalischer Phosphatase Nachweis	33
2.6.7 <i>drop array</i>	34
2.6.8 Ansatz von <i>embryoid bodies</i>	35
2.6.9 Ernten von <i>embryoid bodies</i>	36
2.7 EB-Analyse-Verfahren	37
2.7.1 EB-Dokumentation-System	37
2.7.2 Live-EB-Imaging	37
2.7.3 Anfertigung von Cryogewebeschnitten	38
2.7.4 Hämalaun- und Eosin-Färbung	38

2.8 Differenzierung embryonaler Stammzellen	39
2.8.1 RA-induzierte neuronale Differenzierung	39
2.8.1.1 Beschichten von Deckgläsern	39
2.8.1.2 Immuncytochemie	40
2.8.2 Hämatopoetische Differenzierung von embryonalen Stammzellen	40
2.8.2.1 Isolierung von hämatopoetischen Zellen	41
2.8.2.2 <i>Colony Forming Unit-Assay</i>	41
2.8.2.3 Degranulierung von Mastzellen	42
2.9 Molekularbiologische Methoden	42
2.9.1 Isolierung von RNA	42
2.9.2 Reverse Transkription	42
2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.9.4 Westernblot	44
2.10 Proteomische Analyseverfahren	46
2.10.1 Lösungen für die Proteomanalytik	46
2.10.2 Proteinbestimmung nach Bradford	48
2.10.3 Probenaufbereitung und Rehydratisierung	48
2.10.4 Isoelektrische Fokussierung–die erste Dimension der 2D-Gel-Elektrophorese	49
2.10.5 Equilibrierung von IPGs	50
2.10.6 SDS-PAGE–die zweite Dimension der 2D-Gelelektrophorese	50
2.10.7 Färbung von analytischen 2D-Gelen: Silberfärbung	51
2.10.8 Färbung von präparativen 2D-Gelen: Färbung mit kolloidalem Coomassie	52
2.10.9 Digitalisieren und Dokumentation von 2D-Gelen	52
2.10.10 Computergestützte Auswertung von 2D-Gelen mit der Software PDQuest	53
2.10.11 Präparation von Zellkernen aus vereinzelt EB-Zellen (Kernpräparation)	53
2.10.12 Proteomische Probenvorbereitung von Zellkernen	54
2.11 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen	54
2.11.1 MALDI	54
2.11.2 LC-MS/MS	54
2.11.3 Tryptischer In-Gel-Verdau von Proteinspots	55
3. Ergebnisse	57
3.1 Experimentelle Grundlagen	57
3.1.1 Kultur von undifferenzierten embryonalen Stammzellen	58
3.1.2 Differenzierung von ES-Zellen in <i>embryoid bodies</i> unter Verwendung von <i>drop arrays</i>	59
3.1.3 Verwendung des EB–Dokumentations-Systems	60
3.1.4 EB-Entwicklungs-Analyse mit dem Live-Imaging-System	62
3.2. Analyse der frühen hämatopoetischen Differenzierung muriner ES-Zellen in vitro	63
3.2.1 Visuelle Analyse der EB-Entwicklung und früher hämatopoetischer Differenzierungsprozesse (<i>Live- EB-Imaging</i>)	63
3.2.2 Lokalisation des hämatopoetischen Gewebes und Beobachtung endothelumgebener Kavitäten	66
3.2.3 Molekularer Nachweis hämatopoetischer Marker	68
3.2.4 Isolierung des hämatopoetischen Kompartimentes	70
3.2.5 Erzeugung hämatopoetischer Kolonien (<i>Colony-Forming Unit-Assay</i>)	71
3.2.6 Detektion von Mastzellen	73
3.2.7 Zusammenfassung der EB-Analyse-Verfahren früher Differenzierungsprozesse	75

3.3 Retinoidsäure induzierte ES-Zell-Differenzierung in embryoid bodies unter Verwendung von drop arrays	76
3.3.1 Der Einfluss von RA auf das EB-Wachstumsverhalten und Analyse der Cytotoxizität von Lösungsmitteln	76
3.3.2 Einfluss von RA auf die pluripotente ES-Zell-Differenzierung	79
3.3.3 RA-induzierte neuronale Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen	82
3.4 Proteomanalyse der RA induzierten Differenzierung im Nukleus	86
3.4.1 Isolierung von Zellkernen aus ES-Zellen	87
3.4.2 Bedingungen für die 2D-Gel-Elektrophorese	89
3.4.3 Experimentelle Durchführung	92
3.4.4 Auswertung der massenspektrometrisch identifizierten Proteine	97
3.4.4.1 Zuordnung zu zellulären Kompartimenten	97
3.4.4.2 Funktionelle Zuordnung der nukleären Proteine	100
3.4.4.3 Analyse der nukleären Proteine: Nucleophosmin	104
3.4.4.4 Analyse der nukleären Proteine: Nucleolin	107
4. Diskussion	108
4.1 Kultivierung von EBs im drop array-System	108
4.2 Die hämatopoetische Differenzierung	109
4.3 Retinoidsäure abhängige Differenzierung	112
4.4 Retinoidsäure induzierte neuronale Differenzierung	114
4.5 Proteomanalyse von RA regulierten Faktoren im Nukleus	116
4.5.1 Isolierung von Zellkernen aus ES-Zellen	117
4.5.2 Funktionelle Zuordnung der nukleären Proteine	118
4.5.3 Analyse der nukleären Proteine: Nucleolin und Nucleophosmin	122
5. Zusammenfassung	126
Anhang	128
A: Relative Spotintensitäten der detektierten differentiell regulierten Proteinspots	128
B: Übersicht der massenspektrometrisch identifizierten Proteine	130
Literaturverzeichnis	133
Danksagung	145
Lebenslauf	146
Erklärung	146

1. Einleitung

1.1 Biologie embryonaler Stammzellen und ihre Anwendung

1.1.1 Eigenschaften undifferenzierter ES-Zellen

Pluripotente embryonale Stammzellen besitzen das einzigartige Potential, zu allen Geweben, die von den drei Keimblättern abgeleitet sind, zu differenzieren und sind damit das ideale Objekt der regenerativen Stammzellbiologie. Außerdem können frühe Entwicklungsprozesse, wie sie im Embryo ablaufen, in Modellsystemen imitiert und analysiert werden.

Zunächst werden aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse dargestellt, die der Einführung in das Gebiet der embryonalen Stammzellbiologie dienen.

Die Isolierung embryonaler Stammzellen aus der inneren Zellmasse (ICM) muriner Embryonen im Blastocystenstadium (E3.5) (Evans und Kaufman 1981; Martin 1981) war ein wissenschaftlicher Meilenstein, denn sie begründete das neue Anwendungsgebiet der regenerativen Medizin (Stammzelltherapie) und ermöglicht die Untersuchung früher entwicklungsbiologischer Vorgänge in Modellsystemen.

ES-Zellen sind durch folgende Eigenschaften charakterisiert: Im undifferenzierten Zustand besitzen sie *in vitro* eine unlimitierte Proliferationsfähigkeit, wenn sie auf einer Lage muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs), oder mit differenzierungssupprimierenden Faktoren, wie LIF (*Leukaemia Inhibitory Factor*), einem Cytokin der Interleukin (IL)-6 Familie, kultiviert werden (Smith et al. 1988; Williams et al. 1988; Stewart et al. 1992) und behalten im Gegensatz zu Tumorzellen ihren Karyotyp (Pease et al. 1990).

Die Charakterisierung undifferenzierter ES-Zellen erfolgt über membrangebundene Rezeptoren (gp130) (Niwa et al. 1998; Burdon et al. 1999), Enzymaktivitäten wie alkalische Phosphatase (AP) (Wobus et al. 1984) und Telomerase (Thomson et al. 1998), Transkriptionsfaktoren wie Oct-4 (Scholer et al. 1990) und den Homeobox-Transkriptionsfaktor Nanog (Chambers et al. 2003), sowie spezifische Zelloberflächen-Antigene (SSEA-1) (Solter und Knowles 1978).

Signalwege, die an der Regulation der Aufrechterhaltung des undifferenzierten pluripotenten Potentials von ES-Zellen beteiligt sind, wie Oct-4, gp130/ STAT3 (Niwa et al. 1998) und Nanog wurden von Boiani und Schöler zusammengefasst (Abb.1.1) (Boiani und Scholer 2005).

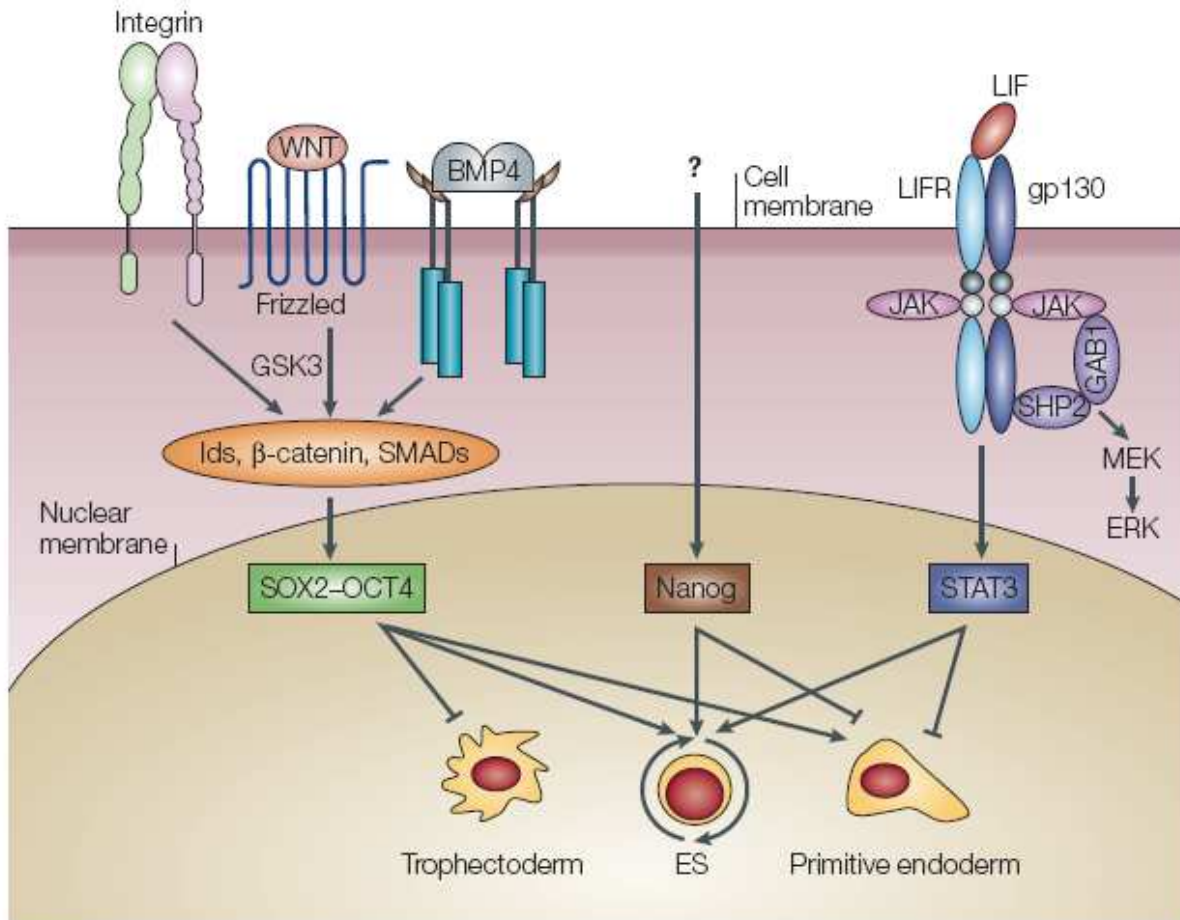


Abb. 1.1: Übersicht der Signalwege die an der Regulation der Pluripotenz muriner ES-Zellen involviert sind

Die Pluripotenz wird durch Oberflächen-Rezeptoren reguliert, die Signale auf Schlüssel-Transkriptionsfaktoren zum Nukleus vermitteln, wie Oct-4 (*Octamer Binding Transcription Factor-4*) und Nanog, sowie weiterer Transkriptionsfaktoren der Selbsterneuerung, wie STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-3*).

Der LIF-Rezeptor (LIFR)-STAT3 Signalweg ist im Detail definiert. Das Cytokin LIF (*Leukaemia Inhibitory Factor*) übt seine Funktion durch Bindung an den LIFR an der Zelloberfläche aus und bewirkt eine Heterodimerisierung mit einem anderen Transmembran Protein, dem Glycoprotein-130 (gp130), dadurch werden Kinasen die das Signal in den Nukleus vermitteln aktiviert und das Andocken weiterer Faktoren an den aktivierten LIFR-gp130 Rezeptor-Komplex ermöglicht. Die intrazelluläre Domäne des LIFR-gp130 Heterodimers kann die *nonreceptor* Janus Tyrosin Kinase (JAK) und die *antiphosphotyrosine immunoreactive* Kinase (TIK) rekrutieren, die diese phosphorylieren. Die phosphorylierte intrazelluläre Domäne des LIFR-gp130-Heterodimers fungiert als Bindungsstelle für Proteine, die eine *Src-homology-2* Domäne (SH2) besitzen, darunter der Transkriptionsfaktor STAT3.

Auf nukleärem Level verursachen die Transkriptionsfaktoren STAT3, OCT4 und Nanog Veränderungen in der Genexpression, die zu phänotypischen Veränderungen führen. OCT4 ist mit dem *SRY-related high-mobility Group* (HMG) Box Protein-2 (SOX2) verbunden und bestimmt mit anderen Co-Faktoren die Regulation von Zielgenen.

Die anderen Aspekte der Abbildung sind spekulativ, in einigen Fällen sind die Oberflächenrezeptoren bekannt, nicht aber die Signalüberträger, bei anderen müssen sie noch identifiziert werden (aus Boiani und Scholer 2005).

Der experimentelle Nachweis des pluripotenten Potentials gelang durch Injektion von ES-Zellen in murine Empfänger-Blastocysten, aus der chimäre Mäuse resultierten, deren Merkmale in Geweben aller drei Keimblätter, inklusive der Keimbahn, nachgewiesen werden konnten (Bradley et al. 1984). Diese pluripotenten Zellen konnten experimentell manipuliert und anschließend in Empfänger-Blastocysten integriert werden.

Insbesondere durch Anwendung der homologen Rekombination und Selektion konnten *knockout*-ES-Zellen erzeugt werden, die zum Generieren von Mäuselinien mit Deletionen in Zielgenen (Thomas und Capecchi 1987) genutzt werden.

Dies war ein Durchbruch in der Entwicklungsbiologie der Säuger, mit dieser Strategie konnten Studien des Verhaltens dieser Zellen und des veränderten genetischen Expressionsmusters während der Säugerentwicklung durchgeführt werden.

Im Oktober 2007 wurden Evans, Smithies und Capecchi dafür mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

In vitro bereitet das Differenzierungspotential der *knockout*-ES-Zellen eine wichtige Ergänzung zu *in vivo* Studien, wenn z.B. die Inaktivierung von Zielgenen (*loss of function*) *in vivo* zu einer frühen embryonischen Letalität führt (Arsenian et al. 1998).

Das pluripotente Potential von ES-Zellen konnte ebenfalls *in vitro* durch zahlreiche Publikationen nachgewiesen werden. Gewebespezifische Zelltypen der drei Keimblätter: Endoderm, Mesoderm und Ectoderm konnten durch Verwendung unterschiedlicher Differenzierungsprotokolle generiert werden (Tab. 1.1, NIH 2001), die dann zum Ausgleich von Gewebedefiziten in der regenerativen Medizin genutzt werden können.

Eine Induktion der Differenzierung von ES-Zellen erfolgt *in vitro* durch den Entzug von inhibitorischen Faktoren wie LIF und einer Kultur in dreidimensionalen Aggregaten, den sogenannten *embryoid bodies* (EBs) (Doetschman et al. 1985). Daneben werden Protokolle basierend auf einer Co-Kultur mit stromalen Zelllinien (Nakano et al. 1994), oder eine Monolayerkultur auf extrazellulären Matrixproteinen (Nishikawa et al. 1998) verwendet.

Zur Erzeugung von *embryoid bodies* werden drei Hauptmethoden angewandt, wie die im hängenden Tropfen (Wobus et al. 1991), in Suspensionskultur (Doetschman et al. 1985) und in semiviskoser Methylzellulose (Wiles und Keller 1991).

Zelltyp	Referenz
Adipozyten	Dani et al. 1997
Astrozyten	Fraichard et al. 1995
Cardiomyozyten	Doetschman et al. 1985; Maltsev et al. 1993
Chondrozyten	Kramer et al. 2000
Definitive hämatopoetische Zellen	Wiles und Keller 1991; Nakano et al. 1996; Nishikawa et al. 1998
Dendritische Zellen	Fairchild et al. 2000
Endotheliale Zellen	Risau et al. 1988; Yamashita et al. 2000
Keratinozyten	Bagutti et al. 1996; Yamashita et al. 2000
Lymphoide Vorläufer	Potocnik et al. 1994
Mastzellen	Tsai et al. 2000
Neuronen	Bain et al. 1995; Strubing et al. 1995
Oligodendrozyten	Brustle et al. 1999; Liu et al. 2000
Osteoblasten	Buttery et al. 2001
Pankreas Insel Zellen	Lumelsky et al. 2001
Primitive hämatopoetische Zellen	Doetschman et al. 1985; Nakano et al. 1996
Glattmuskelnzellen	Yamashita et al. 2000
Quergestreifte Muskelzellen	Rohwedel et al. 1994
Dottersack Endoderm	Doetschman et al. 1985
Dottersack Mesoderm	Doetschman et al. 1985

Tabelle 1.1: Übersicht der publizierten Zelltypen die durch Differenzierung muriner ES-Zellen *in vitro* generiert werden konnten (nach NIH, Stem Cell Report, 2001).

Bei der Bildung von EBs im hängenden Tropfen wird das hohe Aggregationspotential der ES-Zellen genutzt. Dabei konzentriert die einwirkende Schwerkraft die ES-Zellen am tiefsten Punkt des Medium-Tropfens und erlaubt es ihnen, leichter und schneller zu aggregieren. Der Vorteil dieser Methode ist, dass extrem homogene EBs durch Verwendung einer definierten Aussaatdichte erzeugt werden können.

Die zu EBs aggregierten ES-Zellen bilden zunächst eine äussere Schicht aus endodermalen Zellen. Nach einigen Tagen der Entwicklung bildet sich ein ektodermaler Rand aus, gefolgt von einer mesodermalen Spezifikation. Dies entspricht der *in vivo* Situation im Embryo, ausgehend von der inneren Zellmasse (ICM) der Blastocyste, aus der die ES-Zellen abgeleitet, bzw. isoliert sind und ist somit eine Rekapitulation früher Entwicklungsprozesse (Doetschman et al. 1985).

Von den angewandten Differenzierungsverfahren, ist die komplexe dreidimensionale Struktur des EBs dem Embryo am ähnlichsten. Ein Nachteil der starken Zell-Zell-Interaktionen ist die erschwerte Zugänglichkeit von Faktoren die eine Differenzierung beeinflussen können. Im Vergleich des breiten Differenzierungspotentials von EBs, ist die Differenzierung auf stromalen Zellen (PA6, OP9) auf wenige Zelltypen begrenzt, die sich nur unzureichend von den stromalen Zellen trennen lassen. Verfahren, die eine Monolayerkultur nutzen, weisen einen verminderten differenzierungsinduzierenden Effekt durch fehlende Zell-Zell-Kontakte auf.

Die *in vitro* Differenzierung von ES-Zellen in EBs rekapituliert frühe Prozesse der Entwicklung *in vivo*, so wird beispielweise die hämatopoetische Entwicklung, wie sie während der Embryonalentwicklung im extraembryonalen Dottersack abläuft, imitiert (Doetschman et al. 1985).

Die Entstehung von Kavitäten ist ebenfalls eine Imitation früher Entwicklungsprozesse im sich entwickelnden EB, ähnlich der Bildung des Hohlzylinders aus der soliden ICM-Masse nach der Implantation des Embryos. Daran beteiligt sind apoptotische Prozesse, selektives Überleben, sowie der BMP- (*Bone Morphogenetic Protein*) Signalweg (Coucouvanis und Martin 1999).

Die Differenzierung von ES-Zellen *in vitro* zu gewünschten Zelltypen erfolgt zum einen durch Applikation geeigneter Differenzierungsfaktoren, zum anderen durch genetische Manipulationen von Schlüssel-Entwicklungsgenen. Im folgenden wird die neuronale Differenzierung, sowie die hämatopoetische Differenzierung näher beschrieben, die Bestandteil der Analysen in dieser Arbeit sind.

1.2 Hämatopoese *in vivo* und *in vitro*

1.2.1 Ursprung hämatopoetischer Stammzellen *in vivo*

Um *in vitro* gewebespezifische Zellen generieren zu können, sind Kenntnisse der Entwicklungsprozesse *in vivo* essentiell.

Eines der Ziele der regenerativen Stammzellbiologie ist das Nutzen von ES-Zellen als Quelle für das Generieren von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) mit Knochenmark-Repopulationspotential, als Alternative zur angewandten Knochenmarkstransplantation.

Im Gegensatz zu adulten HSCs können ES-Zellen unbegrenzt kultiviert und genetisch manipuliert werden. Eine Erzeugung von empfängerspezifischen ES-Zellen durch einen somatischen Zellkerntransfer (Wilmut et al. 1997) könnte die begrenzte Zahl an Knochenmarkspendern mit passenden HLA-Isotyp ersetzen, ist aber mit ethischen Bedenken verknüpft.

Die zu den adulten Stammzellen zählenden hämatopoetischen Stammzellen besitzen die Fähigkeit der Selbsterneuerung und des Generierens aller hämatopoetischen Blutzelllinien während eines großen Zeitraums, meist ein Leben lang.

Während der Embryonalentwicklung ist der Dottersack der erste Ort hämatopoetischer Prozesse. Er besteht am Beginn der Entwicklung aus zwei Zellschichten, dem äußeren visceralen Entoderm und dem darunter liegenden extraembryonalen Mesoderm.

Im Verlauf der weiteren Entwicklung entstehen zunächst aus dem extraembryonalen Mesoderm des Dottersacks Hämangioblasten. Sie sind die gemeinsamen Vorfahren erster hämatopoetischer und endothelialer Vorläuferzellen (Kennedy et al. 1997), die zwischen E7 und E8.25 sogenannte Blutinseln bilden, die aus endothelialen Cytoblasten und differenzierten primitiven Erythrocyten bestehen (Moore und Metcalf 1970).

Innerhalb des Embryos können von E10.5 erste hämatopoetische Zellen in der sogenannten Para-Aortic-Splanchnopleural- oder auch Aorta-Gonad-Mesonephros-Region (PAS/AGM) (Medvinsky und Dzierzak 1996) nachgewiesen werden.

Die Entstehung der beiden hämatopoetischen Kompartimente und ihr Potential definitive hämatopoetische Stammzellen (HSC) zu bilden, wurden kontrovers diskutiert. Im allgemeinen wird akzeptiert, dass die hämatopoetischen Vorläufer in der AGM-Region unabhängig von den Dottersackzellen gebildet werden (Kyba und Daley 2003).

Um den Ursprung definitiver HSCs nachzuweisen, wurde der Dottersack und das AGM von 10 Tage alten Embryonen abgetrennt und *in vitro* zur Induktion der definitiven hämatopoetischen Differenzierung mit stromalen Zellen der Linie S17 und Gabe von IL-7 kultiviert. Nach 10 bis 14 Tagen zeigten sowohl Zellen des Dottersacks, als auch AGM-Zellen unter *in vitro* Konditionen B-Lymphozyten Aktivität (Cumano et al. 1993).

Trotz der Fähigkeit von Dottersackzellen *in vitro* definitive hämatopoetische Zelllinien zu bilden, zeigen Transplantationsexperimente, dass ausschließlich Zellen von Tag 10 aus der AGM-Region das früheste Gewebe ist, das Knochenmarks-Einnistungs-Potenzial (nur 3 von 96 Mäusen) besitzt (Godin et al. 1993) und nur intraembryonale hämatopoetische Vorläufer eine sogenannte *long-term multilineage Reconstitution* (LTR), d.h. eine hämatopoetische Stammzellaktivität ermöglichen (Cumano et al. 2001). Dottersackzellen die direkt nach der Isolation transplantiert wurden, waren unfähig, das lymphoide Kompartiment wieder herzustellen (Godin et al. 1993).

Die weitere definitive Hämatopoese erfolgt von Tag 11 in der fötalen Leber (Johnson und Moore 1975), dort erwerben die hämatopoetischen Stammzellen die Fähigkeit sich einzunisten und Knochenmark zu bilden, sowie über die gesamte Lebensspanne die Hämatopoese aufrecht zu erhalten.

Obwohl keine adulten Knochenmark bildenden hämatopoetischen Stammzellen im Dottersack nachgewiesen wurden, können Dottersackzellen *eine multilineage* Langzeit-Hämatopoese in konditionierten neugeborenen Empfängern, nicht jedoch in adulten Mäusen ausbilden (Yoder und Hiatt 1997). Die lokale zelluläre Mikroumgebung scheint dabei eine bedeutende Rolle in der Regulation der Dottersack-HSC-Differenzierung zu spielen.

Dies führte zur Hypothese, dass Dottersackzellen unreif sind und einen zusätzlichen Reifungsschritt in der Leber benötigen, bevor sie sich ins Knochenmark einnisten und die Hämatopoese aufrechterhalten können. Kyba und Daley entwickelten eine Hypothese der dualen Verteilung von Zellen aus dem Dottersack und der AGM-Region, die zum definitiven HSC-Pool beitragen (Kyba und Daley 2003) (Abb. 1.2).

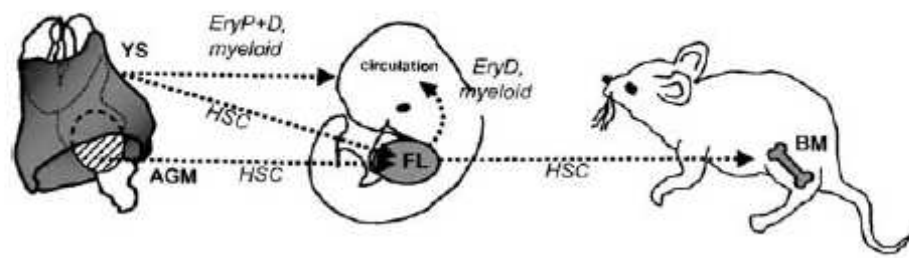


Abb.1.2. Model der dualen Verteilung von Zellen aus dem Dottersack und der AGM-Region zum definitiven HSC-Pool

Die HSCs des Dottersacks stellen alle hämatopoetischen Vorläufer für den frühen Embryo, wie primitive Erythrocyten (EryP), sowie frühe definitive und myeloide Vorläufer zur Verfügung. Während der Embryonalentwicklung wird die fötale Leber durch HSCs aus dem Dottersack, wie auch aus der AGM-Region kolonialisiert. Zusammen ist dieser Pool verantwortlich für die fötale Hämatopoese. Die HSCs, die das Knochenmark kolonialisieren, sind aus dieser heterogenen Population, teilweise vom Dottersack und teilweise vom AGM abgeleitet (Kyba und Daley 2003).

1.2.2 Hämatopoetische Differenzierung *in vitro*

In vitro werden Verfahren zur Differenzierung von ES-Zellen zu hämatopoetischen Linien genutzt, um hämatopoetische Zellen zu generieren und frühe hämatopoetische Entwicklungsprozesse zu analysieren.

Während der EB-Kultivierung können Strukturen beobachtet werden, die den Dottersack-Blutinseln entsprechen (Doetschman et al. 1985). Ähnlich dem ersten Schritt der hämatopoetischen Entwicklung im Mausembryo, ist dies eine Rekapitulation der primitiven Hämatopoese im Dottersack (Burkert et al. 1991).

Das Unvermögen von Dottersack-HSCs ohne zusätzliche Reifungsschritte definitive HSCs zu bilden, lässt Rückschlüsse auf von ES-Zellen abgeleitete HSCs zu, die ohne weiter etablierte Methoden für Transplantationen ungeeignet sind. Dies wurde experimentell bestätigt, da die meisten Versuche, von EBs abgeleitete Zellen zu transplantieren, misslungen sind (Kyba und Daley 2003).

Neben der EB-Kultur wird auch eine Co-Kultur auf stromalen Zellen angewandt. ES-Zellen die in Monolayerkultur in Zellkulturschalen differenziert werden, zeigen dagegen kein hämatopoetisches Differenzierungspotential (Dang et al. 2002). Eine Co-Kultur von ES-Zellen mit stromalen Zelllinien resultiert in einem verstärkten Makrophagenwachstum. Die Verwendung der stromalen Zell-Linie OP9, die aus dem Knochenmark M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*) defizienter Mäuse (op^{-}/op^{-}) isoliert wurde, unterstützt die

lymphoide und myeloide Differenzierung von ES-Zellen *in vitro* und unterbindet eine Macrophagenentwicklung (Nakano et al. 1994). ES-Zellen differenzieren auf OP9-Zellen zuerst zu mesodermalen Kolonien, die nach einer Trypsin-Behandlung und erneutem Ausplattieren auf frischen OP9-Zellen, zu Kolonien von semiadherenten hämatopoetischen Blasten differenzieren. Diese sekundären Kolonien beinhalten Vorläufer von lymphoiden oder myeloiden Linien, sowie in einigen Fällen Mischkolonien und implementieren damit die Präsenz von HSCs. Obwohl eindeutig lymphoide Populationen nachgewiesen werden können, sind sie nicht in der Lage, sich in konditionierten adulten Mäusen, ins Knochenmark einzufügen.

Da EBs *in vitro* frühe hämatopoetische Entwicklungsvorgänge im Embryo rekapitulieren, sind sie ein ideales Analyseobjekt früher hämatopoetischer Entwicklungsvorgänge. Mittels *Colony Forming Unit-Assay*, bei dem viskose Methylcellulose, die mit Cytokinen dotiert ist, verwendet wird, konnten Burkert et al. pluripotente ES-Zellen zu vielen Typen der hämatopoetischen Linien differenzieren (Burkert et al. 1991). Hämatopoetische CFCs (*Colony Forming Cells*) entwickeln sich innerhalb von 6 Tagen in der EB-Kultur und ermöglichen eine *in vitro* Analyse hämatopoetischer Entwicklungsprozesse zu verschiedenen Zeitpunkten, von der pluripotenten ES-Zelle über die hämatopoetische Stammzelle, bis zur myeloischen Zelllinie, die *in vivo* durch unzureichendes Probenmaterial und schwieriger Zeitpunktszuordnung erschwert ist.

Durch die hämatopoetische Differenzierung von ES-Zellen *in vitro* konnten Faktoren, die an Entwicklungsprozessen beteiligt sind, identifiziert werden.

Methylcellulose-Kulturen von Tag 3 EBs sind fähig, ähnlich wie Hämangioblasten, sogenannte Kolonien von Blasten (BI-CFC) unter Einwirkung des *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) zu bilden, und haben damit das Potential, Zellen der primitiven und definitiven Hämatopoese, sowie endotheliale Zellen zu entwickeln (Kennedy et al. 1997).

Mutationsanalysen ermöglichen die Untersuchung der Regulation früher hämatopoetischer Differenzierungsprozess. So wurde der *basic helix-loop-helix* (bHLH) Transkriptionsfaktor SCL/tal (Shivdasani et al. 1995) als essentiell für die Hämatopoese beschrieben. Flk1 (*Fetal Liver Kinase 1*), der Rezeptor des VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), wurde als Marker der endothelialen Entwicklung identifiziert, die bei Verlust von VEGF unterbunden ist. Die Mutagenese von Runx1, auch AML1 genannt, blockierte die definitive, aber nicht die primitive Hämatopoese (Abb. 1.3) (Mikkola et al. 2003).

Mikkola bestimmte CD41 als Marker der Initiation der frühen primitiven Hämatopoese (Mikkola et al. 2003) und verglich die Hämatopoese im Mausembryo mit dem EB-Modellsystem (Abb.1.3).

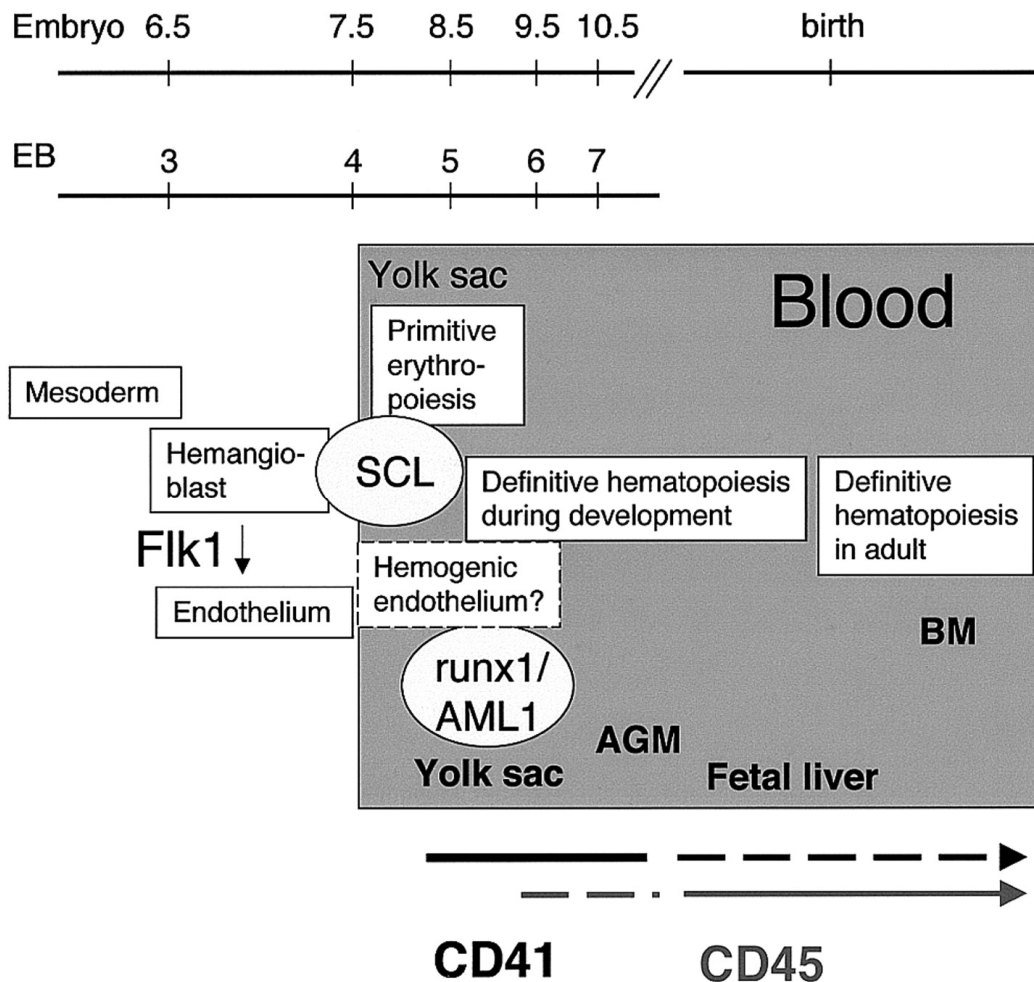


Abb. 1.3: Vergleich der frühen hämatopoetischen Entwicklungsprozesse im murinen Embryo und im Modellsystem EB

Die Hämatopoese geht vom mesodermalen Keimblatt aus, aus dem sich Hämangioblasten entwickeln, die gemeinsamen Vorläufer endothelialer und hämatopoetischer Zellen. Flk1 ist essentiell für die Entwicklung des Endotheliums. SCL ist ein potentieller Regulator von CD41, dass die Initiation der definitiven Hämatopoese während der EB Entwicklung *in vitro* und im Dottersack *in vivo* markiert. Runx1/AML1 ist essentiell für die definitive Hämatopoese, nicht aber für die primitive Hämatopoese, die im EB ähnlich wie im Dottersack abläuft. Das erste hämatopoetische Kompartiment mit Knochenmarks-Populationspotential ist die AGM-Region. Die eigentliche definitive Hämatopoese erfolgt im Embryo in der fötalen Leber (E11). Der panhämatopoetische Marker CD45 erscheint später in Subpopulationen der hämatopoetischen Vorläufer. Im fötalem Leberstadium ist CD41 herab reguliert, während CD45 in allen definitiven hämatopoetischen Vorläufern exprimiert ist (Mikkola et al. 2003).

Ebenfalls von hämatopoetischen Vorläufern stammen Mastzellen ab, sie sind an inflammatorischen Prozessen beteiligt und vermitteln plötzliche (*immediate*) allergische Reaktionen (Metcalf et al. 1997). Die Ligation des hochaffinen IgE Rezeptors (FcεRI) löst dabei die Freisetzung von vorgebildeten inflammatorischen Mediatoren, wie von Histaminen und die Synthese von proinflammatorischen Cytokinen aus.

1.2.3 Ansatzpunkte die eine adulte Repopulation des Knochenmarks ermöglichen

Von ES-Zellen abgeleitete hämatopoetische Zellen besitzen *in vitro* das Potential zu lymphoiden und myeloischen Zellen zu differenzieren. Es konnte jedoch, ähnlich wie vom Dottersack abgeleitete Zellen, nach einer Transplantation hämatopoetischer Vorläufer keine Einnistung über einen langen Zeitraum (*Long Term Reconstitution*, LTR) nachgewiesen werden.

Mögliche Gründe, warum genetisch unmanipulierte Blutvorläufer sich nicht in adultes Knochenmark (BM) einnisten können, sind zum einen ein ungeeignetes Differenzierungsstadium, zum anderen die Unfähigkeit des Überlebens in unpassender Mikroumgebung, der sogenannten Stammzellnische. Eine Möglichkeit ist die Förderung der Einnistung durch transformierende Faktoren, die eine Apoptose der HSCs blockieren, bzw. die Proliferation fördern und dabei die Fähigkeit der lymphoiden-myeloischen Differenzierung aufrechterhalten.

Einige Arbeiten zeigen, dass von EBs abgeleitete hämatopoetische Vorläufer das Potential besitzen, adultes Knochenmark wieder herzustellen, wie z.B. durch eine transiente Überexpression von HOXB4 (Kyba et al. 2002) oder des BCR/ABL-Onkogens (Perlingeiro et al. 2001).

Das Onkogen BCR/ABL ist verantwortlich für die Ausbildung einer chronisch-myeloischen Leukämie (CML) durch Förderung der Proliferation und Blockieren der Apoptose myeloischer Vorläufer (Bedi et al. 1994). Mit BCR/ABL transduzierte und auf stromalen OP9-Zellen differenzierte ES-Zellen entwickeln exponentiell wachsende Blastzell-Populationen in einem primitiven Blastenstadium, die *in vitro* primitive erythroide Zelltypen generieren. Wenn diese Zellen in bestrahlte adulte Mäuse transplantiert werden, differenzieren sie in multiple myeloide Zelltypen, aber auch in Zelltypen der T- und B-Lymphozyten. Während die injizierten Vorläufer positiv für embryonales beta-Globin (beta-H1) sind, exprimieren die von den Spendern abgeleiteten erythroiden Zellen adultes beta-

major Globin, welches ein Nachweis eines hämatopoetischen Reifungsschritts *in vivo* ist (Perlingeiro et al. 2001).

Im zweiten Ansatz der Förderung einer adulten Repopulation wird das Homeobox-Gen HoxB4 genutzt, das an der Selbsterneuerung von definitiven HSCs beteiligt ist. Die Expression von HoxB4 in primitiven Vorläufern, kombiniert mit der Kultur auf hämatopoetischen Stroma-Zellen, induziert ein Umschalten zum definitiven Phänotyp. Diese Zellen können Knochenmark mit sogenannter *multilineage* Langzeit-Hämatopese in primären und sekundären Empfängern ausbilden. Dies zeigt, dass sich primitive HSCs aus ES-Zelldifferenzierungen zu definitiven HSCs entwickeln können und damit ein hervorragendes Modell für Knochenmarksbildung durch Transplantation von ES-Zellen darstellen.

Eine Gefahr der genannten Methoden ist, dass durch die proliferationsfördernden Faktoren eine Ausbildung von hämatopoetischen Tumoren erhöht ist.

1.3. Neuronale Differenzierung embryonaler Stammzellen

Das Generieren von neuronalen Zellen ist ein weiteres Anwendungsgebiet der Regenerativmedizin, um spezifische Gewebedefizite zu behandeln.

Verfahren zur Differenzierung muriner ES-Zellen zu neuronalen Zellen wurden unabhängig von drei Gruppen (Bain et al. 1995; Fraichard et al. 1995; Strubing et al. 1995) publiziert. Die spontane Differenzierung von ES-Zellen zu neuronalen Zellen ohne Gabe zusätzlich fördernder Faktoren ist limitiert (Strubing et al. 1995). Strategien, die eine neuronale Differenzierung fördern, beinhalten die Applikation von Retinoinsäure (RA) (Bain et al. 1996), eine genetische Selektions-Strategie neuronaler Vorläufer (*Lineage Selection*) (Li et al. 1998), sowie der Einsatz von differenzierungsfördernden Aktivitäten der stromalen Zelllinie PA6 in Koinkubationsexperimenten (Kawasaki et al. 2000).

Eine effiziente neuronale Differenzierung durch Applikation hoher Retinoinsäure (RA)-Konzentrationen (siehe auch Abschn. 1.4) konnte durch Expression neurospezifischer Gene, Proteine, von Ionen-Kanälen und Rezeptoren, sowie von neuronalem Gewebe in einer entwicklungstypischen Art und Weise nachgewiesen werden (Fraichard et al. 1995).

Durch eine genetische Selektion neuronaler Vorläufer in Kombination mit einer RA-Behandlung können hochreine neuronale Zellen selektioniert werden (Li et al. 1998).

Der Nachteil der durch RA-Einwirkung erzeugten Neuronen ist eine beschränkte Überlebenskapazität und ein limitiertes Entwicklungsmuster (Plachta et al. 2004).

Desweiteren schließt die Teratocarcinogenität von RA therapeutische Applikationen aus (Rohwedel et al. 1999).

Unabhängig von einer RA-Induktion können Neuronen durch eine Co-Kultur von ES-Zellen mit PA6 stromalen Zellen in Serum-freien Medium (Kawasaki et al. 2000) generiert werden.

Alternativ zur RA- und stromalen Induktion wurden Differenzierungsprotokolle etabliert, die in multiplen Schritten durchgeführt werden. Zunächst wird nach der Bildung von EBs Serum entzogen, um eine mesodermale Differenzierung zu inhibieren. Die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen wird dann durch die Gabe von Wachstumsfaktoren, wie des *basic Fibroblast Growth Factors* (bFGF) und des *Epidermal Growth Factors* (EGF) induziert.

Nach der neuronalen Induktion konnte eine signifikante Verbesserung im Generieren und im *in vitro* Überleben von dopaminergen Neuronen, durch eine Behandlung mit neurotrophischen Faktoren in Kombination mit überlebensfördernden Faktoren, wie Interleukin-1 β und der von einer Glia-Zell-Linie abgeleiteten neurotrophischen Faktoren: Neurturin, *Transforming Growth Factor-beta* (3) und dibutyryl-cyclic AMP, erreicht werden. Dabei können die neuronalen Marker Nurr1 und Tyrosine Hydroxylase (TH), sowie parallel die Expression des anti-apoptotischen Gens bcl-2 verstärkt nachgewiesen werden (Rolletschek et al. 2001).

Mit weiteren neuronalen Differenzierungsprotokollen konnten neben dopaminergen Neuronen durch Analysen spezifischer Genexpression und elektrophysiologischen Studien an generierten neuronalen Zellen, alle drei Hauptzelltypen des Gehirns: Neuronen, die positiv für die Neurotransmitter: Dopamin, GABA, Serotonin, Glutamat und Cholin sind (Bain et al. 1995), sowie Astrocyten (Fraichard et al. 1995) und Oligodendrocyten (Angelov et al. 1998) erzeugt und nachgewiesen werden.

Das Vermögen der Eingliederung neuronaler Vorläufer in entsprechende Gewebsareale wurde in Transplantationsexperimenten bewiesen. Implantierte, von murinen ES-Zellen abgeleitete dopaminerge Neuronen konnten in einem Parkinson-Rattenmodell (Kim et al. 2002) Defizite ausgleichen, die durch einen Dopaminmangel verursacht wurden. In einer ähnlichen Herangehensweise wurden aus murinen ES-Zellen zuerst Vorläufer von Oligodendrozyten und Astrocyten hergestellt und dann in ein Ratten-Modell des humanen *dysmyelinating Pelizaeus-Merzbacher Disease* implantiert. Die resultierende Remyelinierung von Axonen führte zu einer Erholung des pathogenen Phänotypus in den behandelten Tieren (Brüstle et al. 1999).

Desweiteren wurden GABA-Neuronen in einem *Huntington Disease* Modell (Dinsmore et al. 1996) und Oligodendrocyten-Myelinierung von Empfängeraxonen nach Transplantation in Nagern mit Rückenmarksverletzung (McDonald und Howard 2002) nachgewiesen.

Diese Transplantations-Experimente zeigen, dass ES-Zellen eine wertvolle Quelle für Transplantationen spezifischer neuronaler und Gliazellen sind und eine klinische Anwendung in greifbare Nähe rückt.

Es muss jedoch noch gezeigt werden, dass die durch ES-Zell-Differenzierung generierten und transplantierten neuronalen Zellen im umgebenden Gewebe bestehen und ihre Funktion über eine längere Periode (mehrere Monate bis Jahre) aufrechterhalten können.

1.4 Einfluss von Retinoinsäure auf die ES-Zell Differenzierung

1.4.1 Entwicklungsbiologische Rolle von Retinoinsäure *in vivo*

Das Vitamin A Derivat Retinoinsäure (RA) spielt während der Embryogenese eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung der anterior-posterioren Körperachse. *In vitro* wird die morphogene Wirkung zur Induktion von Differenzierungsprozessen in embryonalen Stammzellen genutzt.

Eine physiologische Rolle von Vitamin A als Nahrungsmittelkomponente und eine Beteiligung am Sehzyklus (Rhodopsin) ist seit Anfang des letzten Jahrhunderts bekannt.

Mangel an Vitamin A während der Schwangerschaft oder der frühen postnatalen Phase resultiert in Fehlbildungen. Solche Mangelerscheinungen konnten durch Verabreichung von Retinoinsäure, der biologisch aktiven Form von Vitamin A verhindert werden.

Im Kontrast zur Vitamin-A-Unterversorgung besitzt RA bei der Embryonalentwicklung von Vertebraten eine zeit- und dosisabhängige teratogene Wirkung. Ein exzessiver Gebrauch von RA während der Schwangerschaft verursacht Fehlbildungen, vor allem von kraniofazialen Strukturen, inklusive des ZNS (Lammer et al. 1985), muriner Gliedmaßen (Kochar et al. 1973) und des humanen Axialskelettes (Sive et al. 1990).

Neben Faktoren der FGF- und Wnt-Familien (Pownall et al. 1996) ist RA an der Ausbildung der anterior-posterioren Körperachse beteiligt (Gruss und Kessel 1991; Kessel und Gruss 1991). Die Feststellung, dass RA zu einer verstärkten posterioren Entwicklung führt, basierte zunächst auf Studien exogener RA-Behandlungen von Vertebratenembryonen. Bei

Zebrafischen verursacht eine RA-Applikation während der Embryogenese eine Verkürzung des Kopfes, sowie den Verlust von Augen und Hirnstrukturen (Durston et al. 1998).

Dafür verantwortlich sind Hox-Gen kodierende Transkriptionsfaktoren, die ihre Funktion über konservierte Homeodomänen ausüben. Im Genom sind die Hox-Gene in Clustern arrangiert und ihr Expressionsmuster ist entlang der dorsalen Achse kodiert, so dass die 3'-lokalisierten Gene früher in der anterioren Region exprimiert und die 5'-lokalisierten Gene später in der posterioren Region exprimiert werden (Boncinelli et al. 1993).

Hoxa-1, Hoxb-1, Hoxc-1 und Hoxd-1 besitzen RA-Response-Elemente (RARE) in ihren regulatorischen Promotor-Bereichen, die von nukleären RA-Rezeptoren (RARs und RXRs) (siehe auch Abschn.1.4.2) gebunden werden, die die Transkription der RA-sensitiven Hox-Gene regulieren (Marshall et al. 1994; Dupe et al. 1997; Gould et al. 1998).

Behandlungen von Mäuseembryonen mit exogenem RA im Uterus verursachen eine Verschiebung des Hox-Genaktivitäts-Musters. So wird Hoxb-1 (normalerweise exprimiert im Rhombomer 4, R4), in anteriorer Richtung verschoben und in R1-3 exprimiert und verursacht dadurch eine homeotische Transformation im Hinterhirn (Metencephalon), sowie eine Posteriorisierung des kraniofazialen Skelettes, abhängig von der Konzentration und des Embryonalstadiums zum Zeitpunkt der RA-Applikation (Abb.1.4).

Diese Studien führten zur Annahme, dass ein RA-Gradient entlang der Körperachse zu einem Posteriorisierungssignal mit einem breiten Effekt auf die Hox-Gen-Expression und das Zellschicksal im ZNS führt (Maden 1999).

Um den Effekt von RA-Mangel zu untersuchen, wurden Mutationsanalysen von Enzymen durchgeführt, die an der RA-Synthese beteiligt sind, z.B. die Retinaldehydedehydrogenasen (RALDHs). RALDH2 wird posterior in frühen Vertebratenembryonen (z.B. im Huhn) exprimiert (Swindell et al. 1999). *Loss of Function* Mutationen zerstören die Hinterhirn-Segmentation, beeinflussen aber nicht die Vorderhirn- (Telencephalon) und Mittelhirn- (Mesencephalon) Entwicklung (Neiderreither, 2000). In RALDH2-Mutanten kommt es im Hinterhirn zu einer posterioren Hoxb-1 Expression, die eine Expansion des Rhombomers 4 außerhalb der normalen Domäne R4 induziert (Abb. 1.4). Diese Ergebnisse zeigen, dass bei der Abwesenheit von RALDH2 die posteriore Hinterhirnregion eine Charakteristik von R4 annimmt. Dies bedeutet, dass die Posteriorisierung von Retinoiden auf das Hinterhaupt begrenzt ist und keinen Einfluss auf die ZNS-Entwicklung zu haben scheint, wie es durch die klassischen Studien mit RA-Behandlung nahegelegt wurde (Schilling und Knight 2001). Diese Annahme wird von einer früheren Studie bestätigt, die zeigt, dass RA keine posterioren Hox-Gene *in vitro* induziert (Simeone et al. 1991).

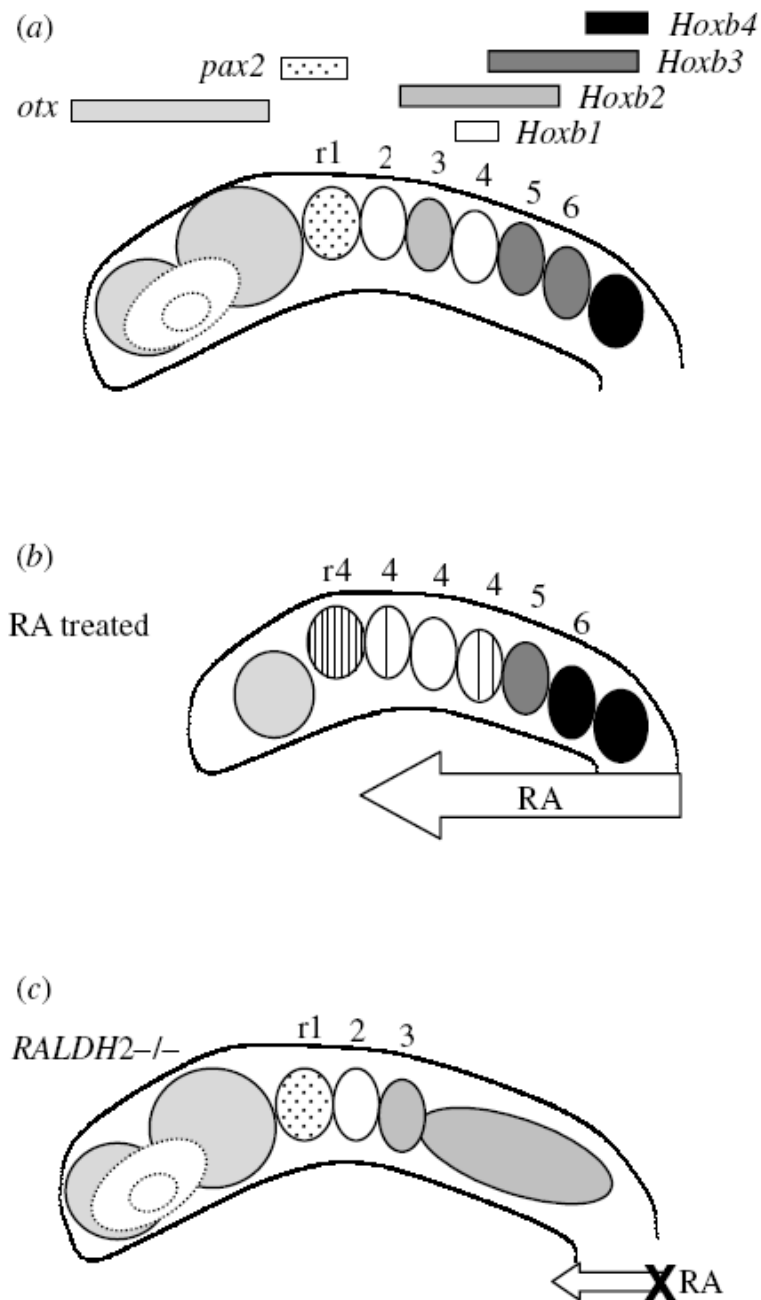


Abb.1.4: Rolle von RA im anterior-posterior Muster im Vertebratenmodell Zebrafisch

Die Abbildung zeigt den Kopf eines Zebrafischembryonen, links anterior, rechts posterior

a) die Haupthirnregionen, inklusive Vorderhirn, Mittelhirn und die Rhombomere r1-7 des Hinterhirns,

b) die anteriore Verschiebung des Hox-Genaktivitätsmusters nach Behandlung mit 10^{-7} M RA und

c) der Phänotyp der Expansion von r4 von Zebrafisch- und Maus-Mutanten der Retinaldehydrogenase 2 (*RALDH2*, *Neckless* im Zebrafisch) in der die RA-Synthese unterbunden ist (Schilling und Knight 2001).

1.4.2 Signalweg der Retinoinsäure

Der molekulare Mechanismus der RA-induzierten Signalkaskade ist weitestgehend aufgeklärt. Er wurde von Chambon zusammengefasst (Chambon 1996) und ist in Abbildung 1.5 dargestellt. RA übt seine hormonelle Wirkung durch Aktivierung zellulärer RA-Binde-Proteine (*Cellular Retinoic Acid Binding Proteins*, CRABPs) aus, dabei weisen die beiden Isotypen CRABPI und CRABPII keine funktionellen Unterschiede auf und sind funktionell gegeneinander austauschbar, also redundant (Gorry et al. 1994). Nach der RA-induzierten Aktivierung interagiert CRABP mit nukleären RA-Rezeptoren verschiedener Isotypen (*Retinoic Acid Receptor*, RAR α , β , γ und RXR α , β , γ). Die Bindung von CRABP an die nukleären Rezeptoren ist dabei abhängig von der RA-Isoform, all-trans-RA bindet an RARs und die 9-cis Form an RXRs. Die nukleären Rezeptoren RXRs bilden Homodimere, bzw. RAR/RXR-Heterodimere, die an spezifische DNA-Binde-Domänen binden, den RA-*Response-Elementen*, die aus Wiederholungen (direkten *Repeats*) der Sequenzen PuG[G/T]TCA bestehen und durch 1, 2 oder 5 Basenpaare separiert und *upstream* der Targetgene lokalisiert sind.

Zwischen den einzelnen Komponenten ergeben sich vielfältige Möglichkeiten der Kombination, wie durch die verschiedenen RA-Rezeptor-Isotypen und –Isoformen, durch verschiedene RA-Isoformen (ATRA, 9-cis), sowie durch Interaktion von aktiven RXR-Homodimeren, bzw. von RXR/RAR- Heterodimeren mit anderen nukleären Rezeptoren, die die Genexpression regulieren. Dabei ist die Expression verschiedener RAR-Isotypen während der Differenzierung gewebespezifisch.

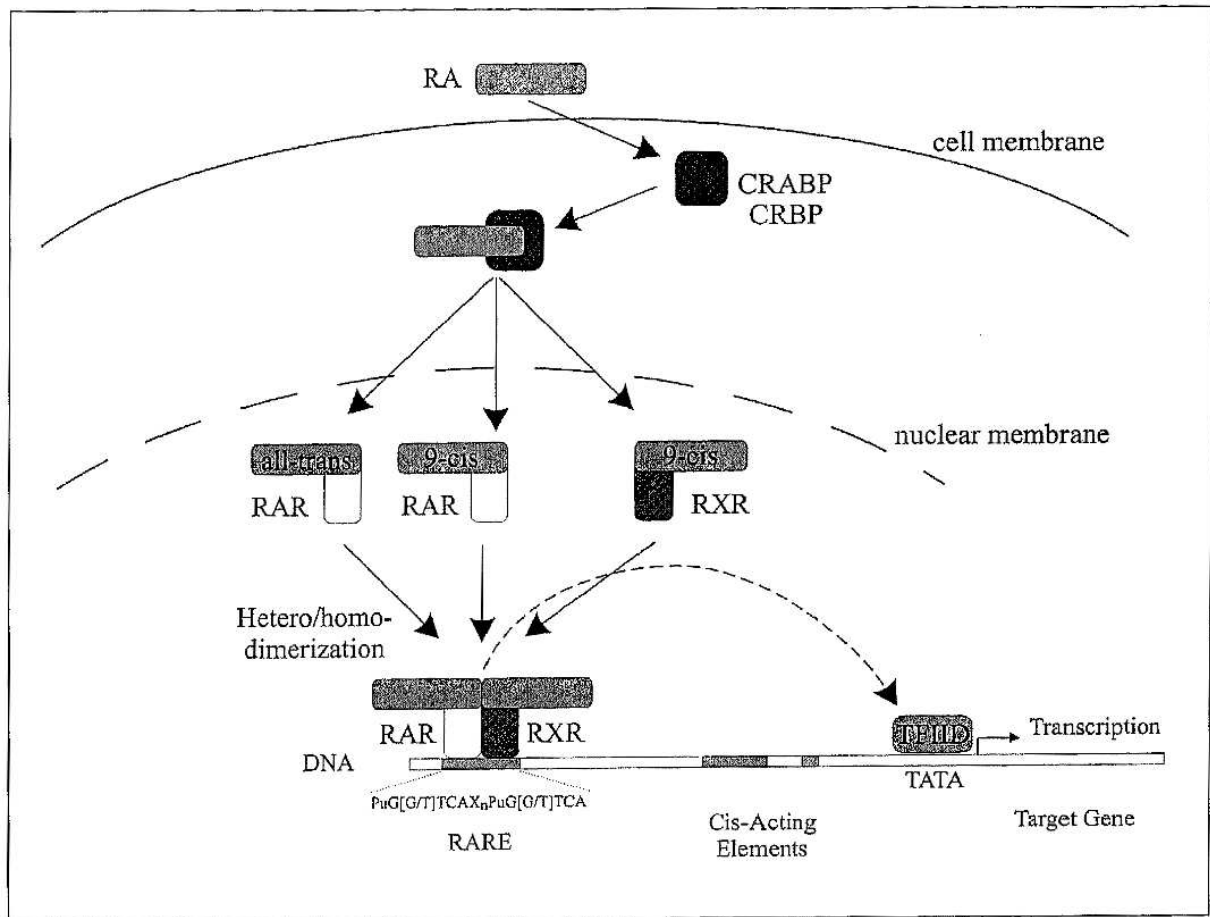


Abb.1.5: Die RA-Signal-Kaskade

Nach Bindung von all-trans RA wird CRABP zum nukleären Rezeptor RAR und 9-cis RA zum RXR transferiert. RAR/RXR-Heterodimere (oder RXR/RXR Homodimere) binden via DNA-Binde-Domäne an RA-Response Elemente (RARE) in der Promotoregion von Zielgenen (nach Chambon 1996, aus Rohwedel et al. 1999).

1.4.3 RA-induzierte Differenzierung *in vitro*

RA übt *in vitro* einen konzentrations- und zeitabhängigen Effekt auf die Differenzierung von ES-Zellen aus (Wobus et al. 1997). Konzentration von 10^{-7} bis 10^{-8} M RA fördern die neuronale Differenzierung von ES-Zellen, wenn diese während der ersten 2 Tage der EB-Entwicklung appliziert werden. Eine Entwicklung von Cardiomyozyten wird dabei inhibiert (Strubing et al. 1995).

Der Mechanismus der neuronalen Induktion durch eine RA-Behandlung ist nicht vollständig aufgeklärt. *In vivo* Studien zeigen, dass die neuronale Induktion und Posteriorisierung unabhängige Ereignisse sind (Kolm und Sive 1997). Eine neuronale Induktion könnte durch Faktoren, wie Noggin, Chordin oder Follistatin gefördert werden, indem sie BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) inaktivieren (Piccolo et al. 1996; Kolm und Sive 1997). Die

Abwesenheit von BMPs könnte ausreichen, eine neuronale Differenzierung zu induzieren (Hemmati-Brivanlou und Melton 1997).

Entsprechend der Inhibierung der cardialen Differenzierung, resultiert die Posteriorisierung durch RA möglicherweise aus Mangel an mesodermalen Vorläufern, aus denen sich Cardiomyocyten entwickeln.

Eine spätere Behandlung von EBs mit 10^{-8} M RA von Tag 2 bis 5 führt wiederum zu Neurogenese und Inhibition der Cardiogenese, aber zusätzlich werden Skelettmuskeln (Wobus et al. 1997) und Adipozyten (Dani et al. 1997) induziert. Skelettmuskeln und Adipozyten stammen vom dorsalen somatischen Mesoderm ab und haben möglicherweise den gleichen mesodermalen Vorläufer (Taylor und Jones 1979), wobei Cardiomyocyten von lateralem Mesoderm abstammen. Die Inhibierung von Cardiomyocyten durch eine RA-Behandlung zwischen Tag 0 bis 2 und 2 bis 5 fällt mit den Expressionsmaxima der mesodermalen Marker Brachyury und BMP-4 zusammen (Rohwedel et al. 1998). Nach 5 Tagen wird die myogene und adipogene Differenzierung durch eine RA-Behandlung inhibiert, die Differenzierung zu cardialen (Wobus et al. 1997) und vaskulären Glattmuskelzellen aber induziert (Drab et al. 1997). Dabei ist die Induktion von Cardiomyocyten durch eine geringere Dosis (10^{-9} M RA) effektiver. Die Applikation nach 5 Tagen bewirkt also den entgegengesetzten Effekt auf die ES-Zelldifferenzierung, im Vergleich zu einer RA-Behandlung am Tag 2.

Auch in *in vivo*-Experimenten konnte ein zeitabhängiger Effekt beobachtet werden, so führt eine Behandlung von Mausembryonen am Tag 8.5 zu einer Anteriorisierung der Körperachse, während eine Vergleichsbehandlung am Tag 7.5 eine Posteriorisierung induziert (Krumlauf 1994).

1.5 Herausforderungen und Probleme der Differenzierung embryonaler Stammzellen

Für eine erfolgreiche gewebespezifische Integration und Funktion von differenzierten Vorläuferzellen muss eine höchstmögliche Reinheit einer spezifischen Zellpopulation gewährleistet sein. Zum einen müssen undifferenzierte ES-Zellen auf Grund ihrer Tumorigenität (Thomson et al. 1998) eliminiert, zum anderen die gewünschten Zelltypen selektioniert werden (*Lineage Selection*).

Eine Möglichkeit der Selektion von spezifischen Zelltypen ist die Einführung eines Resistenzgens unter der Kontrolle eines *lineage*-spezifischen Promotors, der durch entsprechende Differenzierung aktiviert wird. Mit dieser Strategie konnten Li et al., die eine Neomycin-Resistenzkassette im neurospezifischen SOX2-Zielgen in murinen ES-Zellen einfügten, hochreine neuronale Vorläufer selektionieren (Li et al. 1998). Ein weiteres Verfahren ist die Selektion mittels Durchflusszytometrie, z.B. mittels EGFP-Aktivität unter der Kontrolle des cardialen α -Aktin-Promotors, oder mit fluoreszierenden Antikörpern, die spezifische Oberflächenantigene binden, wie sie hämatopoetische Linien exprimieren (Hole et al. 1996). Eine Kombination der genannten einzelnen Methoden ermöglicht höchstreine Populationen, die für Transplantationen genutzt werden können.

Voraussetzungen für das Nutzen von ES Zellen zur Geweberegeneration

Ein weiteres Problem, das es zu lösen gilt, ist die Abstossungsreaktion transplantierten Organe oder Gewebe, wie sie bei allen transplantierten Geweben zu beobachten ist, wenn Spender und Empfänger nicht zu 100% immunologisch kompatibel sind. Mögliche Ansätze, die dieses Problem lösen könnten, sind die Behandlung mit Immunsuppressiva, die Eliminierung immunogener Faktoren z.B. der MHC-I Expression, sowie das Generieren von autologen Spender-Zellen mittels „therapeutischer cloning Strategie“ (Lanza et al. 1999), wie sie beim „Kreieren“ des Schafes „Dolly“ (Wilmut et al. 1997) angewandt wurde.

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Anwendung und Entwicklung neuer Verfahren zur Analyse und Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen.

Es sollten die Einsatzmöglichkeiten des *drop arrays* (W. Kammer, Patent), eines System zur Aggregation von Stammzellen, für Anwendungen der Stammzellbiologie dargestellt werden.

Darunter Verfahren, die durch den Einsatz von *drop arrays* ermöglicht werden, wie:

1. die visuelle Dokumentation der EB-Entwicklung
2. die automatisierte Aufnahme und Messung erzeugter EBs
3. die Entwicklung spezifischer Differenzierungsprotokolle
4. die präparative Isolation von Zellkernen
5. die proteomische Detektion von nukleären Proteinen, die bei der durch Retinoinsäure induzierten Differenzierung spezifisch reguliert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

µg	Mikrogramm
2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATRA	All-trans Retinoinsäure
B27	Mediumsupplement für eine serumfreie Kultur von Neuronen
BFC-E	<i>Blast Forming Colony-Erythrocyte</i>
BIS	Methylenbisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CRABP	<i>Cellular RA Binding Protein</i>
C-terminal	carboxy-terminal
DA	drop array
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EB	<i>embryoid body</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Medium	Medium für die Kultur embryonaler Stammzellen
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
FBS	fötales Rinderserum, <i>fetal bovine serum</i>
FGF-4	Fibroblastenwachstumsfaktor 4
Fik1	<i>Fetal Liver Kinase 1</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Gata 4	<i>Transcription factor GATA 4</i>
Gata1	<i>Transcription factor GATA 1</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
h	Stunde/n hour/s
H&E	Hämalaun und Eosin
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HSP	<i>Heatshock Protein</i>
ICM	innere Zellmasse
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IL	Interleukin

IPG	Immobiline Dry-Strip
ITSFn	Insulin-Transferin-Selenium Fibronectin
k.o.	<i>knock-out</i>
kDa	Kilodalton
LIF	<i>leukaemia inhibitory factor</i>
LIF-R	LIF-Rezeptor
MC-CPA	Mastzell-Carboxypeptidase-A
MCP	<i>Mast Cell Protease</i>
MEF	embryonale Fibroblasten der Maus
MEM	<i>Modifid Eagle Medium</i>
MilliQ	Wasser aus Reinstwasseranlage von Millipore
min	minute/s
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
No, Nr	Nummer
NP40	nonidet P40
NPM	Nucleophosmin
N-terminal	amino-terminal
Oct-4	<i>Octamer Binding Protein 4</i>
OD	optische Dichte
P	Passage
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pax 6	<i>Paired box protein Pax-6</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
pI	Isoelektrischer Punkt
PMMA	Polymethylmethacrylat
RA	Retinoinsäure
RARE	<i>RA Response Element</i>
rh	<i>rekombinant human</i>
rmSCF	<i>rekombinant murine Stem Cell Factor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute, rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
s	Sekunde/n, second/s
SCL	<i>stem cell leukemia protein</i> , auch Tal
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>Sodium Dodecyl sulfat</i>
β-H1	Embryonales β-Globin
STAT3	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> , Trichloressigsäure
TEMED	N,N, N',N'- Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

U	<i>Unit</i>
ü.N.	über Nacht
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
wt	wildtyp

2.2 Chemikalien- und Verbrauchsmaterialienverzeichnis

2.2.1 Chemikalien

(Tri)-Natriumzitat x 2 H ₂ O	VWR
2-Butanol	Roth
4% Paraformaldehyde	Roth
Aceton	Merck
Acetonitril (ACN)	VWR
Acrylamid	Amersham
Agarose	Invitrogen
Ameisensäure	VWR
Ammoniumpersulfat (APS)	VWR
Amoniumhydrogencarbonat	VWR
APS	VWR
N'N-Methylenbisacrylamid	VWR
Bradfordreagenz (Rothiquant)	Roth
Bromphenolblau	VWR
BSA	Applichem
Citronensäure	VWR
Coomassie G-250	VWR
DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure)	VWR
Di-Natriumhydrogenphosphat	VWR
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	VWR
EDTA	Merck
Eosin-Lösung	Roth
Essigsäure (Eisessig)	VWR
Ethanol 99,9%, vergällt	Chemikalienlager Tübingen
Formaldehyd p.a. 37% mit 10% Methanol	VWR
Glycerin, wasserfrei	Roth
Glycin	VWR
Hämalaun-Lösung	Roth
Harnstoff	VWR
HCl	VWR
Iodacetamid	VWR

Ionomycin	VWR
MilliQ Wasser	Millopore
Na-Carbonat	VWR
NaCl	Merck
Na-thiosulfat	VWR
Natriumacetat-trihydrat	VWR
Natriumhydroxid	VWR
Natriumthiosulfat	VWR
NP-40	VWR
Ondina G 17 (medizinisches Weißöl)	Shell
Paraformaldehyd 4%	Roth
Pharmalyte	Amersham
Saccharose	Roth
Schwefelsäure	VWR
SDS-Pellets	Serva
Silbernitrat	Schreiber
β-Mercaptoethanol	Sigma
TCA	VWR
TEMED	VWR
TFA	VWR
Tris-Base	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Triton X-100	Roth
Tween20	Roth
Zitronensäure	VWR

2.2.2 Geräte und Werkzeuge

Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	BioRad
Cryostat Leica CM 3000	Leica
Dumont-Pinzetten	F-S-T Fine Science Tools
quadropole TOF Massenspektrometer: Qstar Pulsar I	Applied Biosystems
EXQuest Spot Cutter	BioRad
MALDI: Reflex III MALDI-TOF	Bruker Daltonic
Mini Trans-Blot	BioRad
MiniProtean	BioRad
Multiphor II	Amersham Pharmacia
PROTEAN Plus Dodeca Cell	BioRad
Sicherheitswerkbank	Heareus
Zellinkubatoren	Heareus

2.2.3 Kits, Standards und Enzyme

1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen (10787-026)
Alkaline Phosphatase Detection Kit	Chemicon (SCR004)
DNAse: Benzonase (100.000U)	Merck (101695)
ECL Plus	Amersham (RPN2132)
Hoch- und Niedermolekularstandart	Amersham (17-0446-01, 17-0615-01)
JumpStart REDTaq ReadyMix	Sigma (D6442)
Methocult	StemCell Technologie (GF M3434)
Vectashield Mounting Medium mit und ohne DAPI	VectorLabs (H-1000, H-1200)
O.C.T. Einbettungskomponente	Tissue Tek
Omniscrypt	Qiagen (205111)
Pharmalyte pH 3-10	Amersham (17-0456-01)
Prestained Protein Ladder: Page Ruler	Fermentas (SM0671)
ProteoGel IPG Strips pH 4-7, linear	Sigma (I4156)
Retinoinsäure	Sigma (R2625)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (74104)
Trypsin (sequenzing Grade)	Promega (V5111)

2.3 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Hersteller
Primäre AK		
Nucleolin	Rabbit polyklonal	Sigma, N 2662
Nucleophosmin/ NPM B23	Mouse monoklonal	Sigma, B 0556
Glial Fibrillary Acidic Protein	Rabbit polyklonal	Chemicon, AB 5804
Anti- β -Tubulin Isotype III	Mouse monoklonal	Sigma, T 8660
RC2	Mouse polyklonal	DSHB
Sekundäre AK		
Goat Anti-Mouse	Alexa Fluor 488	Molecular Probes
Goat Anti-Rabbit	Alexa Fluor 555	Molecular Probes
Goat Anti-Mouse IgG	Peroxidase Conjugate	Sigma, A4416
Mouse Anti-Rabbit Clone RG-96	Peroxidase Conjugate	Sigma, A 1949

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten primären und sekundären Antikörper

2.4 Oligonukleotide für die RT-PCR

Name		Sequenz (5'--3')	Produktlänge (bp)	Tm (C°)
Pax-6	fw:	AGACTTTAACCAAGGGCGGT	588	59
	bw:	TAGCCAGGTTGCGAAGAACT		
NESTIN	fw:	GGACAGGACCAAGAGGAACA	599	58
	bw:	TCCCACCTCTGTTGACTTCC		
OCT-4	fw:	GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC	293	58
	bw:	CTCGAACCACATCCTTCTCT		
GATA-4	fw:	CTCCTACTCCAGCCCCTACC	591	58
	bw:	GTGGCATTGCTGGAGTTACC		
GAPDH	fw:	ACCTCAACTACATGGTCTAC	801	54
	bw:	TTGTCATTGAGAGCAATGCC		
β-TUBULIN III	fw:	TAGTGGAGAACACAGACGAGA	442	58
	bw:	CTGCTGTTCTTACTCTGGATG		
Brachyury	fw:	GAGAGAGAGCGAGCCTCCAAAC	230	56
	bw:	GCTGTGACTGCCTACCAGAATG		
mMCP-1	fw:	CCAGGTCTGTGTGGGAAGTT	233	62
	bw:	GCTCTGGCTTGGAGAATCTG		
mMCP-2	fw:	ATCAAGCCTGGGAAGATG TG	353	55
	bw:	CTGACTCAGGCTGGTTAGGC		
mMCP-4	fw:	TGCCTCGTCCCTTCTGACTTT	278	59
	bw:	CATCTCCGCGTCCATAAGAT		
mMCP-5	fw:	AGCTTGAGGTGGAAAAGCAA	368	58
	bw:	CTATCCCAGCACACAGCAGA		
mMCP-6	fw:	ACTGGATCCACCGCTATGTC	235	60
	bw:	AGAAGAGAGGGAGCCACACA		
mMCP-8	fw:	GTGGGAAATCCCAGTGAGAA	240	59
	bw:	GACAACCATACCCAGGATG		
mMCP-9	fw:	TGATGCCCTCACACTGGTTA	296	59
	bw:	CCATGATGAGGTGGTACTG		
mMCM-CPA	fw:	GGCATCAAACACACATTTGC	320	55
	bw:	TTTTAAAGTGGGGCTGTTG		
Gata-1	fw:	GAT GGA ATC CAG ACG AGG AA	469	64
	bw:	CAGCAGAGGTCCAGGTCCAGGAAAAG		
Flk-1	fw:	TTCTCGTACGGACCGTTAAGC	530	60
	bw:	TTTCAGATCCACGGAGAGCTC		
CD41	fw:	TCAAGACTCCCTGAATCCAACAC	359	61
	bw:	GGGCTCCTCCAGTCTCTTCT		
SCL	fw:	ATTGCACACACGGGATTCTG 58.9	321	50
	bw:	GAATTCAGGGTCTTCCTTAG		
β-H1	fw:	AGTCCCCATGGAGTCAAAGA	265	58
	bw:	CTCAAGGAGACCTTTGCTCA		

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

2.5 Zelllinie

Maus ES-Zelllinie 3a, einer von E14-1 abstammenden Linie mit loxP-Site umgebenden Srf-Allel und einer Neomycin-Resistenzkassette (Srf flex 1 neo/ flex 1 neo) (Wiebel, Rennekampf, Kammer, unveröffentlicht).

Die Zelllinie wurde generiert, weil eine konstitutive, homozygote Deletion des murinen srf-Gens zu einer embryonalen Letalität im Zeitraum des Stadiums E6.5 führt. Um konditionelle k.o.-Mäuse herzustellen wurde das Exon 1 des srf-Gens gentechnisch so modifiziert, dass dieses Exon durch die Cre-Rekombinase entfernt werden kann. Dazu wurde im 5' und 3'-Bereich des Exon 1 sog. loxP-sites eingeführt (Abb. 2.1) (Wiebel et al. 2002). Durch gewebespezifische oder zeitversetzte Deletion des Srf-Allels mit dem Cre/loxP-System können *in vivo* auch SRF-defiziente Embryonen eines späteren Stadiums, sowie adulte Mäuse untersucht werden.

Die genetische Manipulation der ES-Zellen hatte für die durchgeführten Differenzierungsexperimente keine Relevanz, sie verhielten sich wie wildtypische Zellen.

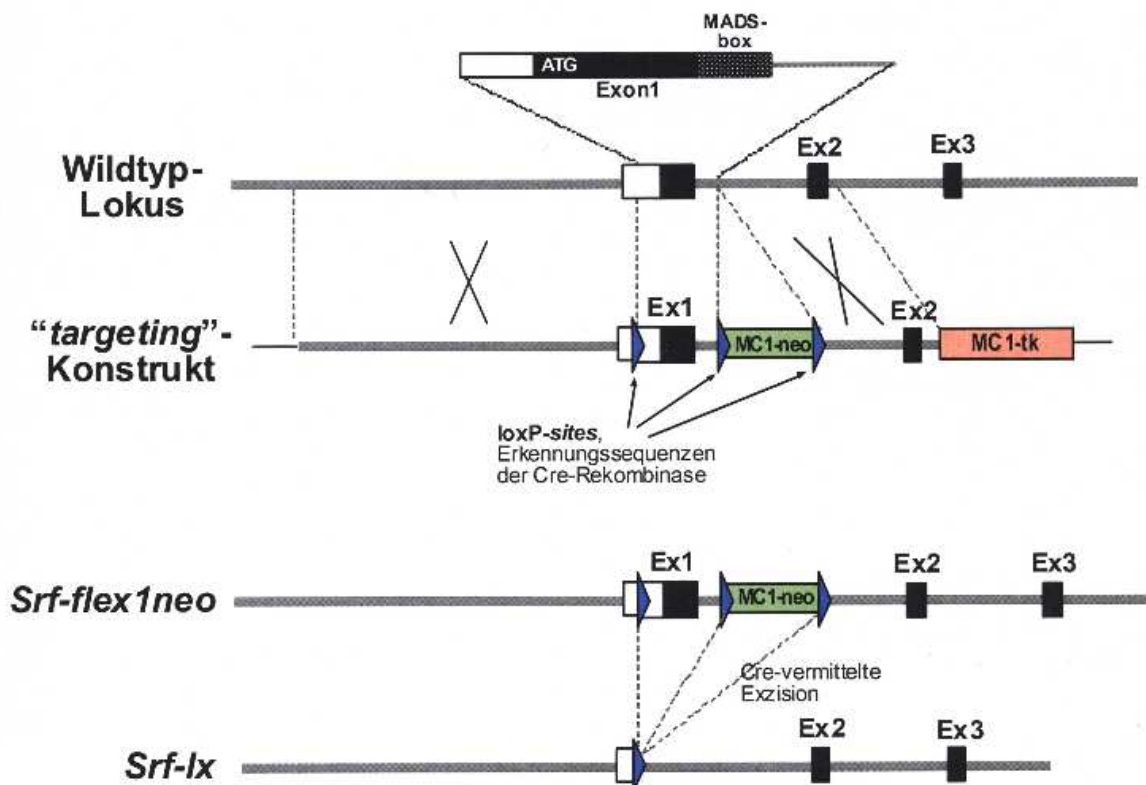


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der "gene targeting" Strategie zur Herstellung von Srf flex1neo ES Zellen (Wiebel et al. 2002)

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Zellkultur-Medien

2.6.1.1 ES-Zellmedium und Differenzierungsmedien

ES-Medium

DMEM ohne Natriumpyruvat, mit 4,5 g/l Glucose, pH 6,8-7,5 (PAA, E15-810)
 1x nichtessentielle Aminosäuren in MEM
 15% (v/v) FBS
 100 mmol/l Pyruvat
 2 mmol/l L-Glutamin
 100 µmol/l β-Mercaptoethanol
 100 U/ml Penicillin
 100 U/ml Streptomycin
 1000 U/ml LIF

Medium-Komponenten:

Natriumpyruvat: (PAA, S11-003)
 100 mM

L-Glutamin mit Penicillin/Streptomycin (PAA, P11-013)
 200 mM L-Glutamine
 10000 U/ml Penicillin G Natriumsalz
 10000 µg/ml Streptomycin-Sulfat
 in 0,85% Saline

nichtessentielle Aminosäuren: 100x (PAA, M11-003)
 90 g/l L-Alanin
 1320 g/l L-Asparagin
 1330 g/l L-Asparaginsäure
 1470 g/l L-Glutaminsäure
 750 g/l Glycin
 1150 g/l L-Prolin
 1050 g/l L-Serin

FBS: Foetal Bovine Serum, Fötales Rinderserum
 Mycoplasmen-, Virus- und Endotoxin-getestet (Lot No: A01121-377)

β-Mercaptoethanol (Sigma, M-7522)

LIF (*Leukemia inhibitory factor*) (Chemicon, ESG1107)
 10⁷ U/ml, Endkonzentration 1000 U/ml

Medium-Komponenten	Menge in ml
DMEM high glucose ohne Na-Pyruvat	506
FBS, sofort aliquotiert eingefroren, 15% (vor dem Inaktivieren 3-4d bei 4°C aufgetaut)	94
Na-Pyruvat (100mM)	6,25
L-Glutamin (kein Glutamax)	6,25
Nichtessentielle Aminosäuren	6,25
Pen/Strep	6,25
β-Mercaptoethanol (1:1,000)	0,625
Lif (1:10.000), Endkonz: 1.000 U/ml (ESGROW)	0,0625

Tabelle 2.3: Pipettierschema des verwendeten ES-Zellmediums

LIF wurde dem ES-Medium direkt bei der ES-Zellerhaltung (Abschn. 2.6.2) appliziert.

ES-Medium für Live-EB-Imaging

Bei Verwendung des Live-EB-Imaging-Systems (Absch. 3.2.1) wurde DMEM ohne Phenolrotzusatz (GIBCO, 21063-029) verwendet.

Lösungen für die ES- und EB-Kultur

PBS (PAA, H15-002)

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na₂HPO₄
1,4 mM KH₂PO₄
pH 7,4

Gelatine (Sigma, G1890)

Typ A aus Schweinehaut
0,2 % in PBS

Trypsin/EDTA (PAA, L11-004)

0,5 g/l Trypsin
0,2 g/l EDTA
in gepufferter Saline

Einfriermedium

20% (v/v) Dimethylsulfoxid
80% (v/v) FBS

Saline

äquiosmolar zum ES-Medium, mit einem Partikelzähler auf 7,05 Partikel eingestellt

Neuronales Differenzierungsmedium

Im Unterschied zum ES-Medium beträgt die FBS-Konzentration 10%

Komponenten	Menge in ml
DMEM high glucose ohne Na-Pyruvat	506,0
FBS, sofort aliquotiert eingefroren, 10% (vor dem Inaktivieren 3-4d bei 4°C aufgetaut)	58
Na-Pyruvat (100mM)	5,5
L-Glutamin (kein Glutamax)	5,5
Nichtessentielle Aminosäuren	5,5
Pen/Strep	5,5
β-Mercaptoethanol (1:1,000)	0,58

Tab.2.4: Zusammensetzung des neuronalen Differenzierungsmediums

ITSFn Medium

DMEM/F12 (1:1), (Invitrogen, 11320-074)
 Insulin-Transferin-Selenium-A (100x),(GIBCO, 51300)
 2 mM L-Glutamin
 Fibronectin (Sigma, F1141) 1mg/ml

N2 Medium

DMEM/ F12 (1:1), (Invitrogen, 11320-074)
 N2 Supplement (GIBCO,17502-048)
 2 mM L-Glutamin

B27 Medium

Neurobasal Medium (GIBCO, 21103)
 B27 Supplement (50x),(GIBCO, 17504)
 2 mM L-Glutamin

2.6.1.2 Lösungen für die ES-Zelldifferenzierung**Neuronale Differenzierung**

Laminin 1 µg/ml (Life Technologies)

Trypsin 0.05% (w/v) in 0.05% (w/v) EDTA/PBS (Sigma)

50 mg Trypsin in 100 ml PBS mit 50 mg EDTA lösen, aliquotieren bei -20°C lagern

Poly-DL-Ornithine hydromromide (Sigma, P-8638)

Stocklösung: 0,5 mg/ ml in Borat-Puffer (150 mM, pH 8,3 mit NaOH)

2.6.2 Zellkultur muriner ES Zellen

Reagenzien:

ES-Medium
0,2% Gelatine in PBS
LIF (ESGROW)

ES-Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit auf mit Gelatine beschichteten Kulturschalen in ES-Medium mit LIF (1.000 U/ ml) gehalten. Zum Gelatinisieren wurden die Kulturschalen für mindestens 30 min mit 0,2% Gelatine in PBS behandelt und anschliessend getrocknet. Die gelatinisierten Platten wurden bis zur Verwendung und Kultivierung der ES-Zellen bei 4°C gelagert.

2.6.3 Passagieren muriner ES-Zellen

Reagenzien:

ES-Medium
Trypsin/EDTA
LIF (ESGROW)

Alle 48h wurden die ES-Zellen passagiert, dafür wurde das ES-Medium abgesaugt und die Kulturschale einmal mit PBS (ca.10ml) gewaschen. Anschliessend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro 10 cm-Kulturschale von der Oberfläche abgelöst. Nach ca. 3 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von frischem ES-Medium beendet. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren ab gespült und vereinzelt, mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt (siehe Lindl, 2000) und auf neuen Kulturschalen ausgesät (2×10^5 Zellen in 10 ml ES-Medium pro 10 cm-Kulturschale). Das ES-Medium wurde 1: 10.000 mit LIF (1000 U/ml) versetzt.

2.6.4 Einfrieren von murinen ES-Zellen

Reagenzien

ES-Medium
Einfriermedium

Die Zellen wurden wie oben beschrieben (Abschn. 2.6.3) trypsiniert und für 5 min bei RT und 200 x g (1000 U/min, Heraeus Megafuge 2.0 R) abzentrifugiert. Die Zellen wurden

anschliessend in einem angemessenen Volumen ES-Medium resuspendiert, 1:1 mit kaltem Einfriermedium gemischt, in Einfrierröhrchen überführt und mit Hilfe eines mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälters (Nalgene) bei -80°C eingefroren. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Einfrierröhrchen nach 1-2 Tagen in eine -150°C Tiefkühltruhe überführt.

2.6.5 Auftauen von murinen ES-Zellen

Reagenzien:

- ES-Medium
- LIF (ESGROW)

Röhrchen mit eingefrorenen Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde mit 50 ml 37°C warmem ES-Medium verdünnt und für 5 min bei 200 x g (1000 U/min, Heraeus Megafuge 2.0 R) abzentrifugiert, um Schädigungen der Zelle durch das im Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (Differenzierungsinduktor) zu vermeiden. Danach wurden die Zellen in 10 ml ES-Medium aufgenommen und in eine 10 cm-Kulturschale ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium erneuert, um Zelltrümmer und tote Zellen zu entfernen. Sobald die Zellen eine geeignete Dichte erreicht hatten, wurden sie wie in Abs. 2.7.3 beschrieben passagiert.

2.6.6 Alkalischer Phosphatase Nachweis

Alkaline Phosphatase Detection Kit (Chemicon, SCR004)

Kit Komponenten:

1. Fast RED Violet Solution (0,8g/l Stock)
2. Naphthol AS-BI Phosphate Solution (4mg/ml) in AMPD Puffer (2mol/l), pH 9,5

benötigtes Material:

1. Fixierung: 4% Paraformaldehyd
2. 1x Rinse-(Spül) Puffer: TBST (20mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 NaCl, 0,05% Tween-20)

Präparation der Reagenzien:

Naphthol/Fast Red Violet Solution: Mixen von Fast RED Violet Solution mit Naphthol AS-BI Phosphate Solution und Wasser im Verhältnis 2:1:1 (FRV: Naphthol: Wasser) 1ml: 500 μl :250 μl :250 μl

Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase- (AP) Aktivität erfolgte unter Verwendung des AP-Detektions-Kits nach Herstellerangaben (Chemicon). Dafür wurden ES-Zellen genutzt, die 5 Tage nach dem Auftauen in Kultur gehalten und alle 48h passagiert wurden. Am Tag 5 wurde das Medium abgesaugt und die ES-Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 1-2 Minuten fixiert. Anschließend wurde das Paraformaldehyd abgesaugt und mit 1x Waschpuffer gewaschen. Dann wurde die Färbelösung 15 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Absaugen der Färbelösung und dem Waschen mit Waschpuffer wurden die Zellen mit PBS überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Die AP-Aktivität wurde durch Bestimmung des Anteils an AP-positiven Kolonien (rote Stammzellkolonien) gegenüber den Gesamtzellen ermittelt. Stammzellen waren für Differenzierungsexperimente geeignet, wenn mehr als 90% ($p \geq 0,05$) AP-positive Kolonien bestimmt werden konnten.

2.6.7 drop array

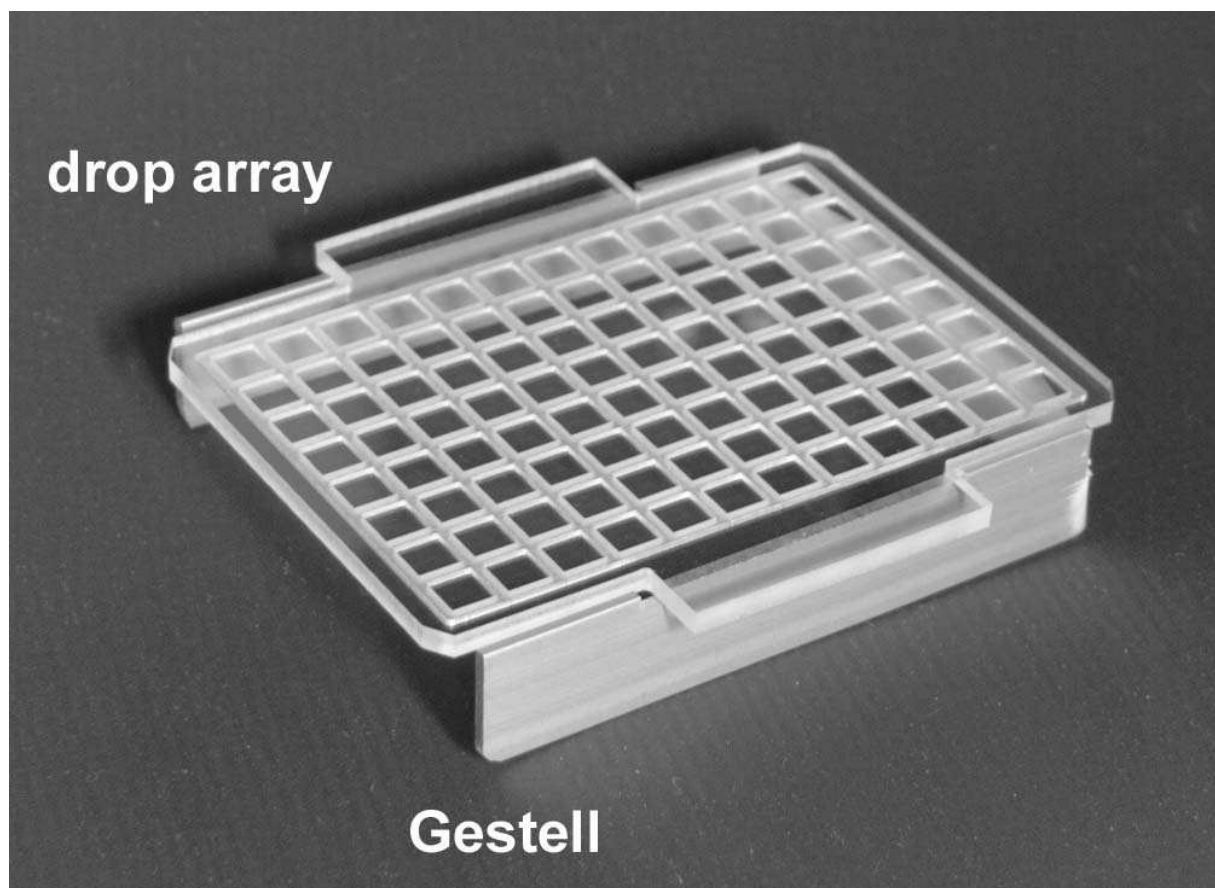


Abb. 2.2: Die Abbildung zeigt ein drop array mit 96 Feldern aus PMMA. Das Array liegt auf einem Metallgestell auf. Seitlich sind am *drop array* Haltegriffe zur Ablage und zur Handhabung des *drop arrays* angebracht.

2.6.8 Ansatz von *embryoid bodies*

Materialien:

drop array

drop array-Gestell

Petri Schale 150x25 mm (BD Falcon, 351013)

Reagenzien:

ES-Medium (ohne LIF)

Saline (7,05 Partikel)

48 h nach dem Passagieren der ES-Zellen wurde das ES-Medium abgesaugt und einmal mit ca. 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro 10 cm-Kulturschale von der Oberfläche abgelöst. Nach ca. 3 min wurde die Reaktion durch die Zugabe frischen ES-Mediums beendet. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren abgespült und sorgfältig vereinzelt und mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt (siehe Lindl, 2000).

Die ES-Zellen wurden in einer Konzentration von $1,5 \times 10^4$ Zellen/ ml ES-Medium eingesetzt. Vor Verwendung wurden die *drop array*-Platten (Abb. 2.2) für 30 min mit UV-Licht auf einer Sicherheitswerkbank sterilisiert. Die *drop array*-Gestelle wurden bei 180°C gebacken und entkeimt. Die Beladung der *drop arrays* erfolgte mit einer Mehrkanalpipette (Eppendorf), dabei wurden auf ein Feld jeweils 46 µl der Zellsuspension im sogenannten Top-Loading-Verfahren aufgetragen. Anschließend wurden die *drop arrays* invertiert, so dass die bisher sitzenden Tropfen nun unten am Array hingen (Abb. 2.3).

Um Verdunstungseffekte zu reduzieren, wurde der Boden einer Kulturschale mit dem ES-Zell-Medium äquiosmolarer Saline befüllt und mit einem *drop array*-Gestell bestückt. Auf ein solches Gestell konnte nun das *drop array* mit den hängenden Tropfen abgesetzt werden. Die Petrischale wurde mit ihrem Deckel geschlossen und anschließend bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

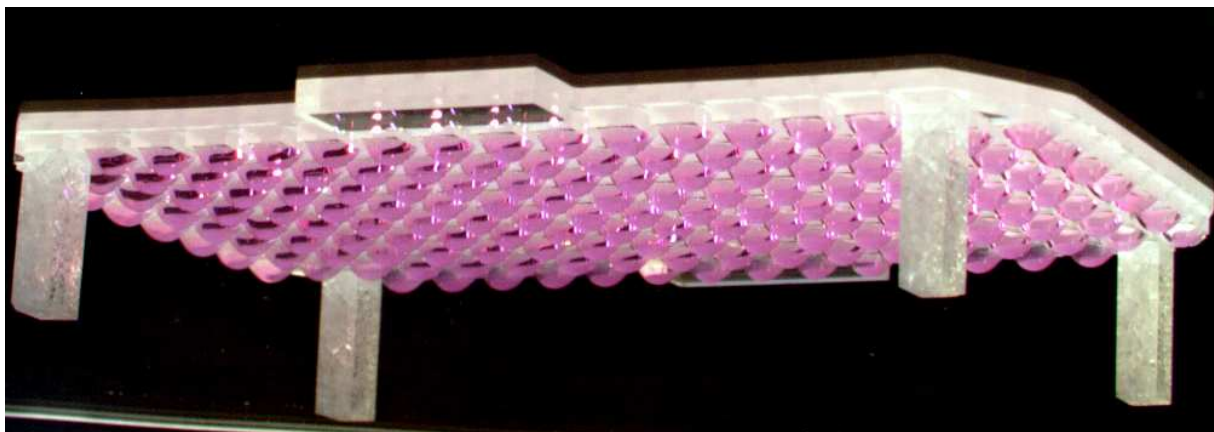


Abb 2.3: Mit hängenden Tropfen beladenes *drop array* mit angeklebten Standfüßen

2.6.9 Ernten von *embryoid bodies*

Nach der gewählten Inkubationszeit erfolgte das Abnehmen der EBs von den *drop arrays*. Mittels einer von Spacern flankierten Glasplatte wurden die EBs in ihrem Mediumtropfen bei Kontakt mit dieser vom *drop array* abgezogen. Auf der schiefstehenden Glasplatte liefen sie nun unterstützt durch Saline-Spülung nach unten in ein Auffanggefäß (Abb. 2.4).

Die EBs wurden in ein geeignetes Sammelgefäß überführt und sanken ohne Zentrifugation nach unten ab. Dadurch wird der Waschprozess mit Saline vereinfacht.

Um aus den EBs Einzelzellen zu gewinnen wurden sie mit einem geeigneten Volumen an Trypsin/EDTA-Lösung unter leichtem Schwenken verdaut. Die Trypsinbehandlung löst die Einzelzellen aus dem Gewebeverband, diese Reaktion wurde mit FBS-haltigem Medium gestoppt, das ein erneutes Waschen erforderlich machte.

Nach dreimaligem Saline-Waschen der Einzelzellen wurde der Salineüberstand vollständig abgenommen und die Zellen konnten für weiterführende Experimente verwendet werden. Sie wurden entweder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren oder direkt mit Lysepuffer lysiert und weiter bearbeitet.

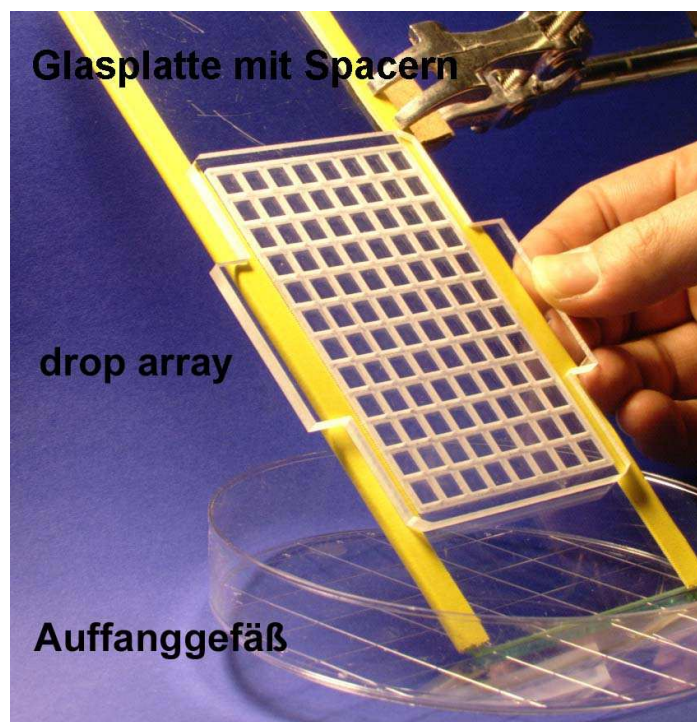


Abb. 2.4: Glasplatte für die Hochdurchsatz-Ernte von EBs

Durch Auflegen des *drop arrays* auf eine Glasplatte bleiben die Mediumtropfen mit den in ihnen enthaltenen EBs haften und lassen sich so vom *drop array* abziehen. Die Spacer (gelb) sichern einen ausreichenden Abstand des *drop arrays* zur Glasplatte, so dass die EBs nicht gequetscht werden.

2.7 EB-Analyse-Verfahren

2.7.1 EB-Dokumentation-System

Für Aufnahmen von EBs mit dem EB-Dokumentations-System (Abb. 3.2) wurden mit EBs beladene *drop arrays*, nach der gewünschten Inkubationszeit entnommen und auf einen Träger, der auf dem motorbetriebenen Aufnahmetisch fixiert war, überführt. Anschliessend wurde über einen Joystick der Aufnahmetisch so ausgerichtet, dass ein äusseres Eckfeld des *drop array* (z.B. oben links) erreicht wurde. Mit der AxioVision Software (Zeiss) konnte die Lage des EBs über einen PC-Monitor kontrolliert werden. Durch Start des in AxioVision integrierten Softwaremoduls „3D-Aufnahme“ wurden vollautomatisch von jedem der 96 Felder Aufnahmen (Auflösung 432x342 Pixel, Vergrösserung 32x) gemacht. Um Störungen durch die Bewegungen des Tropfens zu vermeiden, wurde nach dem Vorschub zur nächsten Position, eine Sekunde gewartet. Die Aufnahmen wurden als Bilddateien gespeichert, die dann ebenfalls mit der AxioVision Software automatisiert ausgewertet werden konnten.

2.7.2 Live-EB-Imaging

Reagenzien:

ES-Medium ohne Phenolrotzusatz

Für Aufnahmen der EB-Entwicklung wurde ein mit einer Digitalkamera bestücktes Binokularmikroskop SV11 (Zeiss), das vor Feuchtigkeit geschützt war, mit einem externen PC über ein Datenkabel vernetzt und in einen Zellinkubator (36,6°C, 5% CO₂, gesättigte Luftfeuchtigkeit) eingestellt. Die Steuerung der Beleuchtung über einen Kaltlichtleiter (Schwanenhals) erfolgte über eine Funkuhr gesteuerten Zeitschalteneinheit, die alle 15 min für 8s eingeschaltet wurde.

Die Aufnahme der Zeitreihe wurde über die AxioVision Software (Zeiss) gesteuert. Die Zeiteinstellung des PCs wurde ebenfalls per Funkuhr abgeglichen.

Der Ansatz von EBs erfolgte wie unter 2.6.8 mit dem Unterschied, dass das ES-Medium keinen Phenolrotzusatz enthielt, um Rotfärbungen am EB dokumentieren zu können.

2.7.3 Anfertigung von Cryogewebeschnitten

Reagenzien:

O.C.T.-Einbettungsmedium (Tissue Tek)
Aceton

Für die Anfertigung von Cryogewebeschnitten wurden 7 Tage und 9 Tage alte EBs verwendet, die einmal mit Saline gewaschen wurden. Die geernteten EBs wurden am Boden von kleinen Alu-Wännchen gruppiert, mit O.C.T.-Einbettungsmedium (Tissue Tek) blasenfrei überschichtet und sofort für einige Sekunden bis zur Weißfärbung in flüssigem Stickstoff schockgefroren, dann auf Trockeneis überführt und bei -80°C gelagert.

Zur Befestigung der in O.C.T. eingebetteten Proben wurde ein Objektträger (Cryostat-Halter) mit O.C.T. benetzt und in der Cryostat-Kammer bei -20°C über 5min angefroren (equilibriert). Es wurden Schnitte von 6-8 μm Dicke angefertigt und auf Polylysin-beschichtete Objektträger überführt. Anschliessend erfolgte das Trocknen der Schnitte bei RT für mindestens 30 min. Die trockenen Schnitte konnten mehrere Tage bei 4°C oder länger bei -80°C gelagert werden. Danach wurden die Schnitte für 1-2 Minuten in einem mit Aceton gefüllten Gefäss bei RT fixiert und luftgetrocknet.

2.7.4 Hämalaun- und Eosin-Färbung

Reagenzien:

Hämalaunlösung (Roth)
Eosinlösung (Roth)
Ethanol 100% (Chemikalienlager, Tü)

Um ein morphologisches Bild der EBs und Gewebe zu erhalten, wurde eine Hämalaun-Eosin (HE) Färbung durchgeführt. Dafür wurden fixierte Cryogewebeschnitte in einer Hämalaunlösung nach Mayer (Roth) 5 min inkubiert und anschliessend unter fließendem, warmem Wasser 10 min gespült, danach wurde mit destilliertem Wasser gespült. Darauf erfolgte eine Eosin-Färbung für 5 min in Eosin-Lösung (Roth), anschliessend wurden die Objektträger 1 min mit VE-Wasser gewaschen, dann mit 100% Ethanol dehydriert und luftgetrocknet.

2.8 Differenzierung embryonaler Stammzellen

2.8.1 RA-induzierte neuronale Differenzierung

Lösungen:

Neuronales Differenzierungsmedium (10% FBS, ohne LIF)
ITSFn-Medium
N2-Medium
B27-Medium
10 mM Retinoidsäure (Sigma,R2625) gelöst in DMSO
0,05% Trypsin-Lösung in EDTA/PBS

Zur neuronalen Differenzierung wurden ES-Zellen in Differenzierungs-Medium (ES-Medium ohne LIF und mit 10 % FBS) mit $1\mu\text{M}$ Retinoidsäure für 4 Tage auf *drop arrays* inkubiert. Nach der Ernte wurden die EBs in einer 0,05% Trypsin Lösung in 0,04% EDTA/PBS (Aliquote von frisch präpariertem Trypsin-Pulver, TPCK-behandelt, Sigma) durch 3 min Inkubation in einen Wasserbad bei 37°C dissoziiert. Die Trypsin-Reaktion wurde mit Differenzierungsmedium gestoppt, die vereinzelt Zellen abzentrifugiert und auf Polyornithin/Laminin beschichteten Deckgläsern (Abschn. 2.8.1.1) in serumfreien ITSFn-Medium mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 (3×10^5 Zellen/ 24-Well) ausplattiert. Das ITSFn-Medium wurde nach 2h und 24h durch neues ausgetauscht. Nach weiteren 2 Tagen wurde es durch N2-Medium ersetzt. Differenzierte Neuronen wurden über mehrere Tage in B27-Medium gehalten.

Immunocytochemische Nachweise erfolgten nach 18h gegen RC2, nach 3 Tagen gegen β -Tubulin III, sowie nach 10 Tagen gegen GFAP und β -Tubulin III.

2.8.1.1 Beschichten von Deckgläsern

Reagenzien:

Poly-DL-ornithine (Sigma, P3655)
1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Laminin (Life Technologies)

Runde Deckgläser (12mm, Roth) wurden in 100% Ethanol gewaschen, in eine Kavität einer 24-Loch-Platte überführt und unter einer Laminar-Flow-Sterilbank getrocknet. Dann wurden die Deckgläser mit 0,5 ml einer 0,1 mg/ml Poly-DL-Ornithin-Lösung (in 150 mM Borat-Puffer pH 8,3 mit NaOH) bedeckt und bei 37°C üN im Inkubator gelagert. Anschliessend wurden sie 3x mit sterilem MilliQ-Wasser gewaschen und mit Laminin ($1\mu\text{g}/\text{ml}$), dass direkt

mit PBS verdünnt wurde, für mindestens 2h bedeckt und bei 37°C gelagert. Kurz vor Verwendung wurde die Laminin-Lösung gründlich abgesaugt und die beschichteten Deckgläser direkt ohne Waschen genutzt.

2.8.1.2 Immuncytochemie

Reagenzien:

4% Paraformaldehyd

PBS

0,3% Triton X-100

3% BSA

Einbettungsmedium: Vectashield mit oder ohne DAPI

Zum immunologischen Nachweis neuronaler Marker wurde von ES-Zellen, die auf beschichteten Deckgläsern kultiviert wurden, nach der gewünschten Inkubationszeit zunächst das Medium abgesaugt und einmal mit PBS gewaschen.

Zum Fixieren der Zellen auf den Deckgläsern, wurde sie mit 4%igem Paraformaldehyd für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde 2x mit PBS gewaschen. Zum Permeabilisieren wurde 5 min in PBS mit 0,3 % Triton X-100 inkubiert und anschliessend für mindestens 30 min in 3% BSA geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Eine Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in 3% BSA für mindestens 1h. Anschliessend wurde 3x mit PBS gewaschen und mit fluoreszierenden sekundärem Antikörper (Alexa Fluor) für 1h im Dunklen bei RT inkubiert. Nach erneutem 3-maligem waschen, erfolgte eine Übertragung der mit Zellen bewachsenen Deckgläser auf einen Objektträger, der mit einem Tropfen Einbettungslösung (Vectashield) benetzt war.

2.8.2 Hämatopoetische Differenzierung von embryonalen Stammzellen

Für eine hämatopoetische Differenzierung wurden EBs für 7 Tage in ES-Medium an *drop arrays* inkubiert. Anschliessend erfolgte die präparative Isolierung von hämatopoetischen Zellen und eine weitere Differenzierung in Methylzellulose, die mit Cytokinen (Methocult) versetzt war.

2.8.2.1 Isolierung von hämatopoetischen Zellen

Reagenzien:

Saline (0,9% NaCl)

7 Tage alte EBs wurden geerntet und mit Saline gewaschen. Unter einem Stereomikroskop (Zeiss) wurden einzelne EBs mit einer feinen Pinzette fixiert, mit einer zweiten leicht perforiert und ausgedrückt (Abb. 3.7). Die Überführung in ein Eppendorfgefäß erfolgte durch Unterdruck mit einer feinen Glaspipette (Biochemical Instruments) über einen Schlauch mit Sterilfilter.

2.8.2.2 Colony Forming Unit-Assay

Reagenzien:

Methocult, 100ml (StemCell Technologies, M3434)

Methylcellulose 1%

FBS 15%

BSA 1%

Insulin 10 µg/mL

Transferrin 200 µg/mL

Cytokine:

50 ng/mL rm SCF

10 ng/mL rm IL-3

10 ng/mL rh IL-6

3 U/mL rh EPO

nach Verdünnung (1:10): 10^{-4} M 2-Mercaptoethanol und 2 mM L-glutamin.

3 ml Aliquote von Methylcellulose mit Cytokinen (Methocult), die bei -20°C in 14ml Polypropylenröhrchen gelagert wurden, wurden bei 4°C aufgetaut.

$1,2 \times 10^5$ präparierte Zellen (Abschn. 2.8.2.1) in 0,3 ml Saline wurden mit der aufgetauten Methyzellulose durch gründliches vortexen gemischt. Durch 3 min Stehen lassen konnten enthaltene Luftblasen aufsteigen. Je 1,1ml der Suspension wurden pro Kavität einer 6-Loch-Platte (6-Well, 35 mm) ausplattiert. Um Eintrocknungen zu verhindern, wurden die freien Kavitäten mit 2 ml PBS befüllt. Eine Inkubation erfolgte bei 37°C , 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchte. Hämatopoetischen Kolonien wurden am Tag 7 morphologisch bestimmt und gezählt. Zellen mit Mastzellmorphologie konnten von Tag 10 analysiert werden.

2.8.2.3 Degranulierung von Mastzellen

Reagenzien:

Ionomycin (Sigma, I3909)

Um Mastzellen zu degranulieren wurde das Ionophor Ionomycin (Sigma, I3909) (1 mM) (~0,75 mg/ml), das die intra- und extrazellulären Kalzium-Mengen equilibriert, als gebrauchsfertige Lösung in DMSO verwendet. Für eine Kavität einer 6-Loch-Platte wurden die Zellen mit 800µl Ionomycin bedeckt und bei RT für 10 min inkubiert.

2.9 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Standard-Methoden, die hier nicht aufgeführt sind, wurden nach Sambrook, J. et al 1989 durchgeführt.

2.9.1 Isolierung von RNA

Für die RT-PCR wurde die Gesamt-RNA aus differenzierten Zellen unter Verwendung des RNeasy-Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert.

2.9.2 Reverse Transkription

1µg der isolierten Gesamt-RNA differenzierter Zellen wurde mit Omniscript-Kit (Qiagen) und oligo(dT) als Primer revers transkribiert. Zunächst wurde ein Master Mix (Tab.2.5) angesetzt, mit Template-RNA auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl aufgefüllt und für 60 min bei 37°C inkubiert.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Master Mix 10x Buffer RT	2 µl	1x
dNTP Mix (5 mM pro dNTP)	2 µl	0,5 mM pro dNTP
Oligo-dT Primer (10 µM)	2 µl	1 µM
Omniscript Reverse Transcriptase	1 µl	4 Units (pro 20 µl Reaktion)
RNase-freies Wasser	Variabel	
Template RNA	Variabel	1 µg pro Reaktion
Total Volumen	20µl	

Tab. 2.5: Ansatz für eine reverse Transkription isolierter Gesamt-RNA

Für die anschließende spezifische PCR wurden 10 ng cDNA für eine Reaktion gemäß Pipetierschema (Tab. 2.6) verwendet. Der JumpStart REDTaq ReadyMix (Sigma) enthielt: RedTaq Polymerase, je 0,4 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100 mM MgCl₂, 4 mM KCl und JumpStart Taq Antikörper.

5' Oligonukleotidprimer [10 pmol/μl]	0,5 μl
3' Oligonukleotidprimer [10 pmol/μl]	0,5 μl
10 ng Template (cDNA)	2μl
H ₂ O	7μl
JumpStartREDTaq ReadyMix	10μl

Tab. 2.6: Reaktionsansatz einer konventionellen PCR

Die konventionelle PCR wurde wie in Tab. 2.7 in einem Thermocycler durchgeführt.

Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
28-30 Zyklen		
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	50-60 °C	30 s
Elongation	72 °C	30 s
Finale Elongation	72 °C	5 min
Stopp der PCR	4 °C	bis zur Probenentnahme

Tab. 2.7: PCR-Programm für eine konventionelle PCR

DNA-Electrophorese

1l 50x TAE

- 242g Tris-Base
- 57,1 ml Essigsäure (Eisessig)
- 100 ml 0,5M EDTA pH 8,0

Die amplifizierte DNA wurde elektrophoretisch in 3% Agarose-Gelen mit 1μl Ethidiumbromid (0,5 μg/ ml) in TAE-Puffer für 20 min bei konst. 70 mA aufgetrennt und mit einem Dokumentationssystem unter UV-Licht aufgenommen.

2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Urea-Puffer

9M Harnstoff
4% Chaps
1% DTT

Proteinprobenpuffer

62,5mM Tris/HCl pH6,8
2% SDS
20% Glycerin (87%)
1‰ Bromphenolblau
1% DTT

Die SDS-PAGE wurde in einer MiniProtean II (Biorad) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden Gele von 1 mm Dicke nach dem Pipettierschema, das in Tab.2.8 aufgeführt ist, hergestellt. Nach dem Giessen des Trenngels wurde dieses mit Butanol überschichtet.

	10 ml Sammelgel	20 ml Trenngel		
		15 %	10 %	7,5 %
AA/BAA (40%)	0,83 ml	7,5 ml	5 ml	3,75 ml
1 M Tris pH 8.8	-	8 ml	8 ml	8 ml
1 M Tris pH 6.7	1,3 ml	-		
H2O	7,8 ml	4,5 ml	7 ml	8,25 ml
APS	24 µl	28 µl	28 µl	28 µl
TEMED	24 µl	28 µl	28 µl	28 µl

Tab. 2.8 Pipetierschema für Proteingele von 1mm Dicke

2.9.4 Westernblot

Transfer-Puffer:

Transferpuffer 1l 10x: 144g Glycin, 30,3g Tris (Base)
1fach: 20% Ethanol, Rest H₂O

Waschpuffer:

Waschpuffer 10x (1l): 12,1g Tris, 88g NaCl, 4g Tween 20 (0,5%) à 250ml : 1,25g Tween 20

Blockpuffer:

Waschpuffer mit 3% BSA

Der Westernblot wurde mit einer Mini Trans-Blot (Biorad) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Blotvorbereitung wurde zunächst eine PVDF-Membran mit Ethanol (100%) benetzt, sowie die benötigten Blot-Schwämme und Whatman-Papier in einer Schale mit Transfer-Puffer equilibriert.

Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran erfolgte bei 130 V für 90 min, mit Kühlung eines Eisblockes.

Die PVDF-Membran wurde mindestens 30 min in Block-Puffer geblockt. Anschliessend wurde die Membran mindestens 1 h oder ü.N. mit dem Erstantikörper bei RT geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen (3x 5 min) schloss sich eine 1 h Inkubation mit Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper an.

Über Chemilumineszenz konnte der gebundene Zweitantikörper wie folgt detektiert werden: Die dreimal gewaschene Membran wurde für 2-4 min in der ECL-Plus-Lösung (Amersham) inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit von der Membran abgetupft. Die Membran wurde in Folie eingeschlagen und auf Röntgenfilmen (Amersham) 1 s bis 30 min exponiert.

Ablösen der Detektionsantikörper von PVDF-Membranen

Zum Entfernen von Antikörpern wurden PVDF-Membranen 30 min bei 50°C unter gelegentlichen Schwenken in Stripping-Puffer (Tab. 2.9) inkubiert. Anschließend erfolgte über 20 min ein gründliches Waschen mit Waschpuffer, um das SDS möglichst vollständig auszuwaschen.

Zusammensetzung des Stripping-Puffers	Benötigte Mengen für 50ml
100 mM 2-Mercaptoethanol	390 µl
2% SDS	5 ml [20%]
62,5 mM Tris-HCl pH 6.7	3,125 ml

Tab.2.9: Stripping Puffer

2.10 Proteomische Analyseverfahren

2.10.1 Lösungen für die Proteomanalytik

Lysepuffer für IPG pH 4-7 und 3-10

CHAPS [w/v] 4%
 Harnstoff 9 M
 Pharmalyte 1%
 DTT 1%
 Bromphenolblau 10 μ g/ml

Herstellung einer 10 M Harnstofflösung

20 mol Harnstoff wurden ü.N. verdunstungssicher in 1,1 l MilliQ-Wasser gelöst, anschließend wurde der gelöste Harnstoff mit einem Ionentauscher deionisiert. Das Ionentauscherharz wurde mit einem Falten-Filter nach etwa 10 min abfiltriert. Aliquote wurden bei -80 °C eingefroren.

SDS-Laufpuffer 10x

26 mM Tris
 2 M Glycin
 0,1 % SDS

Equilibrierpuffer für 10 IPGs von 18 cm Länge

Endkonzentration	benötigte Menge
6M Harnstoff	120 ml 10 M Harnstoff
1% SDS	40 ml 20% SDS
50 mM Tris-HCl pH 8,8	10 ml 1M Tris-HCl pH 8,8
Wasser	Ad 200 ml

Tabelle 2.10 Pipettierschema des Equilibrierpuffers

Die 200 ml Equilibrierpuffer wurden in zweimal 100 ml geteilt. Die eine Hälfte wurde kurz vor Gebrauch mit 1g DTT, die andere Hälfte mit 4,8g Iodacetamid supplementiert.

Polyacrylamidgele 15%

15% Acrylamid /BIS (39:1)
 0,375 M Tris pH 8,8
 5% Glycerin
 0,1% APS
 MilliQ-Wasser
 0,5% TEMED

Colloidales CoomassieAnsatz für 1l Coomassie:

1. 2g Coomassie G-250 in 1l Millipore lösen
2. 55 ml konz. Schwefelsäure zusetzen und ü.N. rühren
3. durch einen Faltenfilter (S&S 520, A1/2, 240 mm) filtrieren
4. 220 ml 10M NaOH unter Kühlung einrühren
5. 310 ml 100% ige TCA unter Kühlung einrühren

100 % ige TCA ansetzen:

Man nehme eine Flasche mit 1kg TCA und gebe 420 ml Wasser in die Originalflasche. Die TCA löst sich gut, wenn man sie leicht anwärmt (Wasserbad auf 30 °C).

0,6% Agarose

0,6% -ige Agarose wurde in 1x SDS-Laufpuffer angesetzt und mit einer sichtbaren Menge an Bromphenolblau supplementiert.

Glycerin-Mix

50% Glycerin, 0,0001% Bromphenolblau

Tris-HCl-Puffer (1M, pH 8,8)**Acrylamid/BIS-Stammlösung (T 40%, C 2,5%)****Molekulargewichtsstandard (Amersham)**

	Protein	Molekulargewicht [kDa]
Hochmolekulargewichtsstandard	Myosin	212
	α 2-Makroglobulin	170
	β -Galaktosidase	117
	Transferrin	76
	Glutamin-dehydrogenase	53
Niedermolekulargewichtsstandard	Phosphorylase B	97
	Albumin	67
	Ovalbumin	43
	Carboanhydrase	30
	Trypsin-Inhibitor	20
	α -Lactalbumin	14,4

Tab. 2.11: Molekulargewichtsstandard

Der hier verwendete Molekulargewichtsstandard war ein 1:1-Gemisch aus einem Hochmolekulargewichtsstandard und einem Niedermolekulargewichtsstandard

2.10.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Reagenzien

Bradford Reagenz (Bio-Rad Protein Assay)
0,1 M HCl
BSA 100 mg/ ml Stammlösung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinextrakten wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) durchgeführt. Dafür wurde das Bradford-Reagenz (Biorad) 1:5 mit Wasser verdünnt und anschließend filtriert. 3 µl des Eichstandards, bzw. der Proben wurden 1:1 mit 0,1 M HCl gemischt und mit 240 µl Wasser verdünnt. 30 µl dieser Mischung wurden mit 870 µl Bradford-Reagenz versetzt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde im Photometer bei 595 nm gemessen. Für die Referenzmessung wurde der verwendete Lysepuffer benutzt. Zur Ermittlung absoluter Proteinkonzentrationen wurde eine Eichkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen erstellt.

2.10.3 Probenaufbereitung und Rehydratisierung

Reagenzien

Lysepuffer

Für Gesamtzellanalysen wurden mit Saline gewaschene Einzelzellen (Abschn. 2.6.9) in 350-600µl Lysepuffer lysiert und unlösliche Bestandteile bei 16.000 x g (13.000 rpm) für 20 Sekunden abzentrifugiert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde nach Bradford (Abschn. 2.10.2) bestimmt und auf die gewünschte Konzentration (pro Gel 0,7 mg bis 1,4 mg Protein bei Gelen, die mit kolloidalem Coomassie gefärbt werden sollen, bzw. 50-300 µg für Gele, die mit einer Silberfärbung gefärbt werden sollen) eingestellt. Die In-Gel-Rehydratisierung der IPG-Streifen erfolgte mit jeweils 350 µl Probe über Nacht. Dabei wurden die IPGs mit der Gelseite nach unten liegend mit der Probe unterschichtet und zum Verdunstungsschutz in beidseitig verschlossenen Einmalpipetten inkubiert.

2.10.4 Isoelektrische Fokussierung–die erste Dimension der 2D-Gel-Elektrophorese

Bei der zweidimensionalen (2D-)Gelelektrophorese wurden Proteine in der ersten Dimension gemäß ihrem isoelektrischen Punkt (pI) wie folgt aufgetrennt:

Die in Abschnitt 2.10.3 beschriebenen IPGs, die über Nacht mit der Probe beladen worden sind, wurden zunächst unter fließendem MilliQ-Wasser abgespült, um Harnstoffkristalle und überschüssige Probenflüssigkeit zu entfernen. Am IPG haftende Wassertropfen werden mit einem feuchten Whatmanpapier abgezogen. Anschließend wurden die IPGs in eine Multiphor-II-Kammer (mit aufgesetztem Drystrip-Kit) nach Herstellerangaben fokussiert. Sie wurden dabei mit der sauren Seite (pH 4) zur Anode und der neutralen Seite (pH 7) zur Kathode aufgelegt. Der Kontakt der IPG-Streifen zu den Elektroden wurde über feuchte Elektrodenstreifen, sie dienten u.a. als Ionenenauffangreservoir, vermittelt. Eine Öl-Überschichtung (Odina G17) verhinderte das Diffundieren von CO₂ aus der Atmosphäre in das Gel des IPG-Streifens und die Verdunstung von Probenflüssigkeit aus den IPGs. CO₂ wirkt bei der IEF wie eine Wasserpumpe und beeinträchtigt die Qualität der IEF erheblich.

Die angelegten Spannungen bei der IEF sind in Tabelle 2.12 zusammengestellt, wobei insgesamt 77,85 kWh erreicht wurden.

Nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung konnten die IPG-Streifen bei -80°C eingefroren oder gleich weiterbearbeitet werden.

V	mA	W	h
150	2	3	1
300	2	3	2
600	2	3	1
1500	2	3	1
3500	3	4	18
6000	3	6	2

Tab.2.12: Fokussierungsbedingungen bei der Isoelektrischen Fokussierung.

Die angegebenen Stromstärken und Leistungswerte stellen Maxima dar, die im optimalen Falle nicht erreicht werden.

2.10.5 Equilibrierung von IPGs

Zur Vorbereitung auf die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, die sog. zweite Dimension) wurden die IPGs für jeweils 15 min in SDS-haltigem Equilibrierungspuffer equilibriert. Dabei kommen zwei verschiedene Puffertypen zum Einsatz (Abschn. 2.10.1):

Puffer 1 mit DTT reduziert inter- und intramolekulare Disulfidbrücken der Proteine und

Puffer 2 mit Iodacetamid carbamidomethyliert (Alkylierung) freie Sulfhydrylgruppen und inaktiviert überschüssiges DTT.

Der pH-Gradient, der sich bei der IEF eingestellt hat, wurde durch die Tris-Pufferung im Equilibrierungspuffer überpuffert, damit der pH-Gradient auf die SDS-PAGE keinen störenden Einfluss ausüben konnte.

2.10.6 SDS-PAGE–die zweite Dimension der 2D-Gelelektrophorese

In der zweiten Dimension erfolgt die Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichts. Die Durchführung erfolgte in der Protean Plus Cell nach Herstellerangaben (Biorad).

Jeweils zwölf 15%ige SDS-PAGE-Gele wurden im IsoDalt-Elektrophoresis System Gel Caster hergestellt. Die eingesetzte Acrylamidlösung ist in Tab. 2.13 detailliert dargestellt.

Endkonzentration	eingesetzte Menge
15 % Acrylamid /BIS (39:1)	375 ml
0,375 M Tris pH 8,8	375 ml
5% Glycerol	50 g
0,1% APS	1 g
MilliQ-Wasser	auf 1000 ml auffüllen
0,5% TEMED	500 µl

Tab.2.13: Acrylamidlösung für die Herstellung von SDS-Gelen.

Die Gele wurden wie folgt beladen:

In vertikaler Position wurde jeweils ein SDS-Polyacrylamid-Gel mit heißer 0,6%iger Agarose überschichtet, was das leichte Einführen eines gemäß Abschnitt 2.10.5 equilibrierten IPGs erlaubt.

Durch das Erkalten der Agarose wurde der IPG auf dem SDS-PAGE-Gel fixiert. Zum Auftragen eines Molekulargewichtsstandards wurde dieser zunächst auf ein ca. 3 x 3 mm großes Stück Filterpapier aufgetragen. Je nach Geltyp (analytisch oder präparativ) wurden 4 oder 8µl der Molekulargewichtsstandardlösung aufgetragen.

Die Filterpapiere wurden spacer-nah auf SDS-PAGE-Gele aufgebracht, bevor diese mit Agarose überschichtet wurden.

Nach Erkalten der Agaroselösung (unterstützt durch 15 min bei 4°C) wurde der Gellauf wie folgt gestartet:

Die Protean-Plus-Cell-Elektrophorese-Kammer wurde mit ca. 22,5 l SDS-Laufpuffer beschickt und jeweils bis zu 12 Gele nach Herstellerangaben eingestellt. Bei konstant 20°C wird ein elektrisches Feld für ca. 14h angelegt. Dabei wird die Stromstärke auf 300 mA limitiert.

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurden die Gele aus der Dodeca-Kammer entnommen.

Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine in den Gelen wurden die Gele aus den Gelkassetten entnommen und mit den entsprechenden Färbelösungen inkubiert (siehe Abschnitt 2.11.7 und 2.11.8).

2.10.7 Färbung von analytischen 2D-Gelen: Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde nach dem in Tab. 2.14 dargestellten Protokoll durchgeführt.

Die Färbung wurde von Dr. Lam Vuong etabliert und ist in dieser Form bisher nicht veröffentlicht.

Alle Färbungen wurden auf Vertikalschüttlern (LaboShake von Gerhardt) bei RT durchgeführt.

Schritt	Lösung	Volumen	Zeit
Fixierung	40% Ethanol 10% Essigsäure	500 ml	15 min
Fixierung	40% Ethanol 10% Essigsäure	500 ml	15 min
Sensitivierung	150 ml Ethanol (30%) 1 g Na-thiosulfat 34 g Na-Acetat	500 ml	30 min
Waschschritt	MilliQ-Wasser	500 ml	5 min
Waschschritt	MilliQ-Wasser	500 ml	5 min
Waschschritt	MilliQ-Wasser	500 ml	5 min
Silberschritt	0,5 % Silbernitratlösung	500 ml	30 min
Waschschritt	MilliQ-Wasser	500 ml	5 min
Entwickler	12,5 g Na-Carbonat 250 µl 37% Formaldehyd	500 ml	3-10 min
Stopp	15 g EDTA/l	500 ml	

Tab.2.14: Inkubationsschritte bei der Silberfärbung eines 2D-Geles

2.10.8 Färbung von präparativen 2D-Gelen: Färbung mit kolloidalem Coomassie

Kolloidales Coomassie

Kolloidales Coomassie wurde nach Literaturangaben hergestellt (Abschn. 2.10.1), (Westermeier, 1997; Diezel, 1977; (Blakesley und Boezi 1977). Dabei wurden die Gele für 24-48 h in kolloidalem Coomassie geschwenkt und anschliessend mit MilliQ-Wasser entfärbt.

2.10.9 Digitalisieren und Dokumentation von 2D-Gelen

Die gefärbten 2D-Gele wurden mit einem Durchlichtscanner bei 300 dpi eingelesen und anschließend in Klarsichtfolie eingeschweißt.

2.10.10 Computergestützte Auswertung von 2D-Gelen mit der Software PDQuest

Die computergestützte Auswertung von 2D-Gelen mit der Software PDQuest 7.2 erfolgte nach Herstellerangaben. Das Programm wurde mit Gelbildern im TIF-Format gespeist. Die Gelbilder wurden mithilfe des Programmes auf relevante Bereiche reduziert (Entfernen von Randbereichen), ausgerichtet und anschließend analysiert.

2.10.11 Präparation von Zellkernen aus vereinzelt EB-Zellen (Kernpräparation)

Homogenisationspuffer

300 mM Saccharose
900 μ M EDTA
10 mM Citrat-Puffer pH 5,5
1 mM DTT
0,5% NP 40

Saccharose-Kissen

0,9M Saccharose
1 mM Mg^{2+}
2 mM Ca^{2+}
10 mM Citrat-Puffer pH 5,5
0,5% NP 40

Zitratpuffer

Zitronensäure x 1 H_2O
Tri-Natriumzitrat x 2 H_2O

2,7 g Zitronensäure und 11,0 g Tri-Natriumzitrat wurden mit MilliQ-Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Der Puffer ist 0,1 M hinsichtlich des Zitrat-Iones und 0,22 M hinsichtlich Na^+

Benzonase (250U/ μ l, Merck, Darmstadt)

Alle Präparationsschritte erfolgten auf Eis oder bei 4 °C. Zunächst wurden die Zellen aus dem EB-Gewebeverband mit Trypsin vereinzelt (2.6.9), die Zellzahl bestimmt und zweimal mit Saline gewaschen.

Für die Präparation wurden die Zellen in Homogenisationspuffer resuspendiert und dabei eine Konzentration von $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Mittels Dounce-Homogenisator wurden jeweils 8 ml der Zellsuspension in 4 Hüben homogenisiert. Mit 16 ml an Homogenisat wurde ein 40 ml Saccharose-Kissen in einem 50 ml-Röhrchen vorsichtig überschichtet. Die Kerne wurden durch das Saccharosekissen zentrifugiert (15 min bei 500 x g). Der Überstand wurde

entfernt und das entstandene Pellet aus Zellkernen resuspendiert und anschließend in Saline gewaschen und sofort bei -20°C gelagert.

2.10.12 Proteomische Probenvorbereitung von Zellkernen

Die bei -20°C gelagerten Zellkern-Pellets wurden auf Eis aufgetaut und in einem adäquaten Volumen (Kerne aus 10^8 Zellen in 5 ml) in 9 M Harnstoff gelöst. Der Lösung wurden je 2 μl Benzonase (Merck) zugegeben und sofort gemischt. Anschliessend wurden die gelösten Proteine mit einer Aceton/Methanol-Präzipitation gefällt. Dafür wurden 5 ml Probe mit 45 ml eines Aceton- (40ml) Methanol- (5ml) Gemisches versetzt und 10 min in einer Megafuge (Heraeus) bei 4000 rpm (2879 rcf) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das verbliebene Pellet mit 80% Aceton gewaschen. Nach dem Verdunsten des Rest-Acetons konnten die Kernpellets in Probenpuffer aufgenommen, die Proteinkonzentration bestimmt und weiter proteomisch behandelt werden.

2.11 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen

2.11.1 MALDI

Die Identifikationen erfolgten mit einem Reflex III MALDI-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonic) für Peptide Mass Fingerprinting nach Herstellerangaben mit einer DHB-Matrix.

2.11.2 LC-MS/MS

Protein-Spots wurden mit dem EXQuest Spot Cutter (Bio-Rad) in einer Grösse von 1mm^2 ausgeschnitten und wie in Tab. 2.15 mit Trypsin verdaut (sequenzing Grade, Promega). Die verdauten Peptide wurden mit einem Dionex LC-Packing HPLC-System (Idstein, Germany), mit den Komponenten FAMOS (Autosampler), Switchos (Loading Pump and UV Detektor) aufgetrennt. Die ESI-MS/MS-Spektren wurden mit dem *high-performance quadrupole* TOF (QqTOF) Massen-Spektrometer (Qstar Pulsar I, Applied Biosystems, Applera, Darmstadt, Germany), ausgerüstet mit einer nano-ESI Quelle (Column Adapter, ADPC-PRO; und distalen beschichteten Silica Nadeln, FS360-20-10-D-20; beide von New Objektive, Woburn, MA, USA) aufgenommen. Die mobilen Phasen waren: A: 0,1% Ameisensäure, und B: 0,1%

Ameisensäure in 84% ACN. Die Peptide wurden für die nano-HPLC vorkonzentriert um Memory Effekte zu vermeiden.

Für die Identifikation wurde folgende Datenbank und Software benutzt:

NCBIInr, non-redundant protein database

MASCOT Software von Matrix Science (Perkins et al., 1999)

2.11.3 Tryptischer In-Gel-Verdau von Proteinspots

Die in den Polyacrylamidgelen enthaltenen Proteine wurden mit einem In-Gel-Verfahren nach Colligan 1995, Lindahl 2001 tryptisch verdaut.

Reagenzien:

Trypsin Stock-Lösung: 20 µg in 20 µl 1 mM HCl (10 mM HCl für eine Lagerung von Aliquots bei -20°C)

Endkonzentration: 12 ng/ µl

Verdünnung: 1:80 in 10 mM NH₄HCO₃-Puffer

Die isolierten Peptide wurden in einer Speedvac bei 50°C zur Trockene eingengt.

Schritt	Vol/µl	Puffer	Zeit [min]	Temp. [C°]	1000 rpm Zentri- -fug. [min]	Lös- ung be- halten
1. Entfärben	100	50% 10mM NH ₄ HCO ₃ / 50% ACN	120	55	1	Nein
2. Entfärben	100	50% 10mM NH ₄ HCO ₃ / 50% ACN	60	55	1	Nein
3. Dehydrieren	100	100% ACN	10	RT	1	Nein
4. Waschen	100	10mM NH ₄ HCO ₃	20	RT	1	Nein
5. Dehydrieren	100	100% ACN	10	RT	1	Nein
6. Dehydrieren	100	100% ACN	10	RT	1	Nein
7. Trypsin auf Eis	20	12,5 ng/µl Trypsin in 10mM NH ₄ HCO ₃	15	4	Nein	Nein
8. Trypsin entfernen		Überschüssiges Trypsin abzentrifugieren			1	Nein
9. neue „Costar“- Platte (R2)/ Verdaupuffer hinzufügen	20	10mM NH ₄ HCO ₃				
10. Mit Parafilm abdecken/ Inkubation				37	Nein	Ja
11. Ansäuerung	10	5% TFA	4h/ ÜN	RT	1-2	Ja
12. Extraktion 1	20	1% TFA zentrif. in R2	0	RT	1-2	Ja
13. Extraktion 2	20	1% TFA zentrif. in R2	30	RT	1-2	Ja
14. Extraktion 3	20	60% ACN/ 40% H ₂ O/ 0,1% TFA zentrif. in R2	30	RT	Nein	Ja
15. Extraktion 4/1	30	100% ACN	15	RT	1-2	Ja
16. Extraktion 4/2	30	100% ACN zentrif. in R2	15	RT	1-2	Ja

Tab. 2.15: Proteinverdau-Protokoll für LC-MS/MS aus Coomassie gefärbten Gelen

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit werden Differenzierungsprozesse von embryonalen Stammzellen der Maus mit neuartigen Verfahren eingeleitet und analysiert. Zunächst werden die Ergebnisse der biochemisch-histologischen, molekularbiologischen und mikroskopischen Analytik vorgestellt, die sich auf einzelne Zellen, bzw. spezifische Zelltypen konzentrieren, gefolgt von proteomischen Resultaten, in deren Fokus Subproteome von Gesamtzell-Ansätzen dargestellt werden.

Beide Herangehensweisen liefern dabei völlig neue Einblicke in Differenzierungsprozesse embryonaler Stammzellen, die in zellulären Aggregaten, sogenannten embryoiden Körperchen („embryoid bodies“= EB) im hängenden Tropfen-System ablaufen und dabei die natürlichen Differenzierungsprozesse in der Embryonalentwicklung modellhaft imitieren (Doetschman et al. 1985).

Basis für die Herstellung einer Vielzahl homogener und reproduzierbarer EBs ist das „drop array“-System (W. Kammer, Patent), dessen Einsatzmöglichkeiten im Rahmen dieser Arbeit erweitert wurden und neue wissenschaftliche Beobachtungen und Erkenntnisse ermöglichten.

3.1 Experimentelle Grundlagen

Zum besseren Verständnis werden zunächst die grundlegenden Verfahren im Zusammenhang mit dem zellulären Untersuchungssystem dargestellt. Dies beinhaltet das Kultivierungs- und Analysemodul *drop array*, das EB-Dokumentationssystem, sowie eine Beschreibung des im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eingesetzten Live-EB-Imaging-Systems.

3.1.1 Kultur von undifferenzierten embryonalen Stammzellen

Als Grundlage der Differenzierungsanalytik dienen undifferenzierte ES-Zellen der Maus, und zwar der von E14-1 abstammenden modifizierten ES-Zelllinie ES 3a $\text{srf}^{\text{flex1neo}/\text{flex1neo}}$, deren Srf-Exon1 von zwei *loxP*-Sequenzen umgeben ist, gefolgt von einer artifiziellen Neomycin-Resistenzkassette und einer dritten *loxP*-Sequenz. Die genetische Modifikation dieser Zelllinie, die sich wie eine wildtypische ES-Zelllinie verhält, wurde von Wiebel et. al. (Wiebel et al. 2002) durchgeführt, und ist detailliert unter 2.5 beschrieben.

Für Differenzierungsanalysen verwendete ES-Zellen wurden nach dem Auftauen (Abschn. 2.6.5) direkt auf gelatinisierten Zellkulturschalen in ES-Medium mit LIF (1000 U/ml) kultiviert. Auf eine Co-Kultur mit embryonalen Fibroblasten der Maus (MEFs) wurde verzichtet, um für Differenzierungsexperimente eine reine ES-Zelllinie nutzen zu können.

Zur Inhibierung der ES-Zell-Differenzierung waren neben der Gabe von mLIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) zur Unterbindung der Differenzierung (Smith et al. 1988; Williams et al. 1988), sowohl das regelmäßige Umsetzen der Zellen alle 48h, als auch die Aussaatdichte essentiell. Die ermittelte optimale Aussaatdichte betrug 2×10^5 ES-Zellen pro 10 cm Zellkulturschale, dabei konnte in 24h eine durchschnittliche Proliferationsrate 1,25 Zellteilungen ($1,125 \times 10^6$ Zellen nach 48h Kultur) beobachtet werden.

Grundvoraussetzung für die durchgeführten Differenzierungsexperimente war ein möglichst grosser Anteil an undifferenzierten ES-Zellen. Der Differenzierungs-Status undifferenzierter ES-Zellen wurde durch eine hohe Alkalische Phosphatase (AP) Aktivität charakterisiert (Pease et al. 1990). Ein spezifischer Nachweis war mit einem AP-Aktivitäts-Kit (Chemicon) nach 5 Tagen in Kultur phänotypisch möglich. Dabei setzt die alkalische Phosphatase undifferenzierter ES-Zellen ein phosphathaltiges Substrat zu einem roten Produkt um (Abb. 3.1). Die analysierten Stammzell-Kolonien zeigten abhängig von ihrem Phänotyp unterschiedlich intensive Färbungen und somit verschiedene AP-Aktivitäten. So zeigten z.B. kompakte Kolonien eine grössere AP-Aktivität. Die verwendeten ES-Zellen früher Passagen, nach ihrer Isolation aus dem Embryo (P10 und P14), zeigten eine AP-Aktivität von über 90% und konnten für Differenzierungsexperimente verwendet werden. Die ES-Zellen ließen sich über 4 Wochen ohne signifikante Abnahme des Differenzierungspotentials für Experimente verwenden.

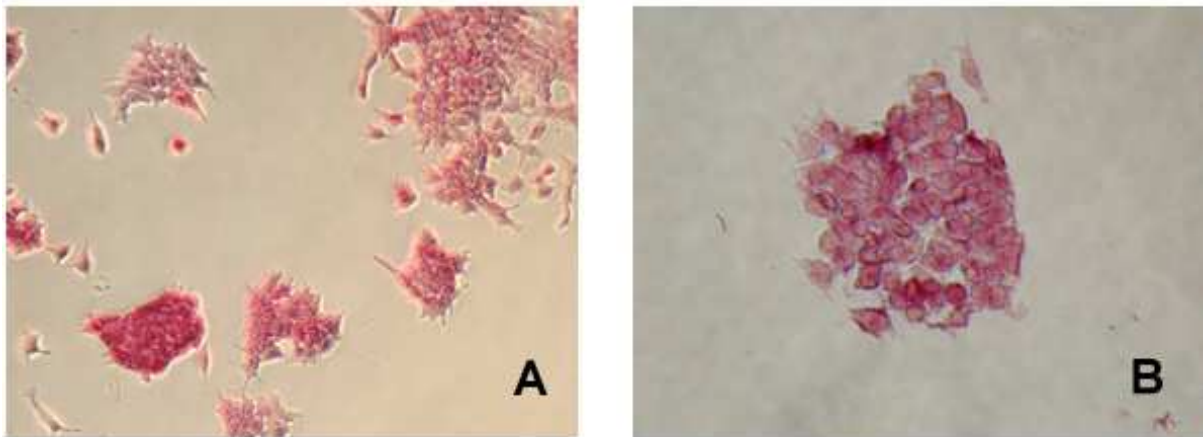


Abb. 3.1: Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität

Mikroskopische Aufnahmen undifferenzierter ES-Zellen der Linie 3a (A) die für 5 Tage nach dem Auftauen in ES-Zell Medium mit LIF kultiviert wurden. Eine Passage erfolgte alle 48h. Zur Bestimmung des Differenzierungsstatus wurden die Zellen fixiert und mit einem Substrat inkubiert, das die Alkalische Phosphatase zu einem roten Produkt umsetzt. Dabei weisen kompakte ES-Zellkolonien (B) eine höhere Alkalische Phosphatase Aktivität auf. (Vergrößerung: A:120x, B: 240x)

3.1.2 Differenzierung von ES-Zellen in *embryoid bodies* unter Verwendung von *drop arrays*

Als *in vitro* Differenzierungsmodell muriner ES-Zellen wurden *embryoid bodies* verwendet. In diesen dreidimensionalen Zell-Aggregaten wird die Differenzierung bei gleichzeitigem Entzug von mLIF induziert (Doetschman et al. 1985). Zur Erzeugung von *embryoid bodies* wurden *drop arrays* (Abb. 2.2) verwendet, die auf der *hanging drop* Methode (Doetschman et al. 1985) basieren. Im Gegensatz zur häufig angewandten Suspensionskultivierung, konnten damit homogene *embryoid bodies* ohne Adhäsion zu Kulturgefäßen erzeugt werden.

Der *drop array* ist eine PMMA-Platte mit definierten Feldern (49 mm²) im standardisierten 96-Well-Format. Die scharfkantigen Begrenzungen der hydrophoben Felder des *drop arrays* bilden eine physikalische Barriere für hydrophile Flüssigkeiten, wodurch ein Herabfallen oder Zerfließen von Medientropfen unterbunden wird. Die dadurch erreichbare Grösse hängender Tropfen beträgt mehr als 50µl Medium und ermöglicht eine deutlich längere Kultivierungsdauer von embryonalen Stammzellen in *embryoid bodies*, im Vergleich zu bisherigen Protokollen.

Eine konstante Tropfengröße über die gesamte Kultivierungszeit konnte durch Aufrechterhalten eines Mikroklimas in der Zellkulturschale, in dem sich der *drop array* befindet, erzielt werden. Dies wurde durch eine gesättigte Luftfeuchte im Inkubator und durch Gabe

von osmolar optimierter Saline (Abschn. 2.6.1.1) in den Zellkulturschalenboden als Reservoir erreicht. Dadurch wurde das Herabfallen von zu voluminösen Tropfen durch Flüssigkeitsaufnahme bei zu geringer Osmolarität in der Reservoirflüssigkeit, oder das Schrumpfen von Tropfen bei zu hoher Osmolarität oder zu geringer Luftfeuchtigkeit, vermieden.

Die Verwendung des *drop array* Systems ermöglichte die Erzeugung von *embryoid bodies* im Hochdurchsatzverfahren. So wurden z.B. für eine Zellkernanalyse (Abschn. 3.4.1) 100 *drop arrays* und damit annähernd 10.000 EBs erzeugt. Mit einer 12-Kanalpipette konnten 50 *drop arrays* innerhalb einer Stunde angesetzt werden.

In den folgenden vorgestellten Experimenten enthielt das Differenzierungsmedium bereits beim Ansetzen der *embryoid bodies* spezifische Differenzierungsfaktoren wie z.B. Retinoinsäure. Differenzierungsinduzierende Faktoren konnten aber auch zu einem späteren Zeitpunkt hinzugefügt werden („Reloading“).

Die Transparenz der *drop arrays* (PMMA) bietet den Vorteil, dass sie die optische Analytik erleichtert, was letztendlich im EB-Dokumentations-System genutzt wird.

3.1.3 Verwendung des EB-Dokumentations-Systems

Für eine automatisierte Analyse des EB-Wachstumverhaltens und zur Messung des Einflusses von cytotoxischen Chemikalien, wurde ein EB-Dokumentations-System verwendet, das im Rahmen eines Embryotoxizitäts-Projektes, als Alternative zu Tierversuchen, in der Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Fa. Zeiss, entwickelt wurde (W. Kammer, unveröffentlicht).

Die Aufnahmeeinheit dieses Systems ist in Abbildung 3.2 dargestellt, bestehend aus einem mit einer Digitalkamera bestückten Binokularmikroskop SV11 mit einem 2-dimensional beweglichen, von einem Motor betriebenen Aufnahmetisch, der über eine Steuereinheit vom PC mit der AxioVision-Software (Zeiss) gesteuert wird.

Die Verwendung des EB-Dokumentations-Systems ermöglichte das automatisierte Ansteuern aller 96-Felder des *drop array* und das Aufnehmen digitaler Abbildungen von einzelnen *embryoid bodies* im hängenden Tropfen. Die erhaltenen Aufnahmen konnten durch zusätzliche Mess- und Auswerte-Module der AxioVision-Software analysiert und ausgewertet werden.

Damit ist es z.B. möglich die Cytotoxizität verschiedener Chemikalien im Hochdurchsatzverfahren zu testen.

Das EB-Dokumentationssystem wurde in dieser Arbeit für die Analyse des Einflusses von Retinoinsäure auf das EB-Wachstumsverhalten und zum Testen der Cytotoxizität von Lösungsmitteln verwendet (Abschn. 3.3.1).

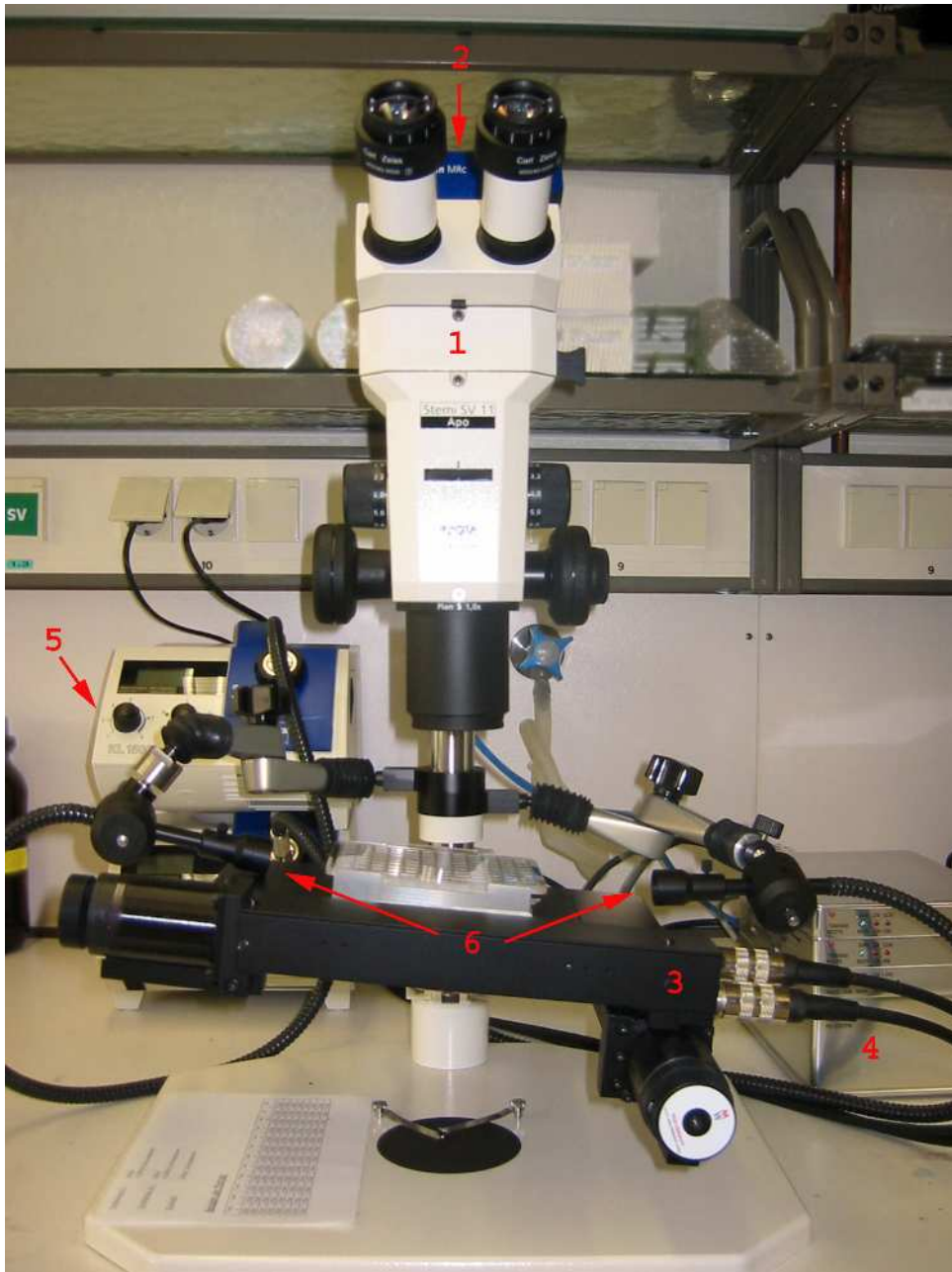


Abb. 3.2: Aufnahmeeinheit des EB-Dokumentations-Systems

Die Aufnahmeeinheit besteht aus einem Binokularmikroskop SV11 (1) mit Digitalkamera AxioCam MRc (2), die durch einen PC gesteuert wird. Der *drop array* ist auf einem motorischen Aufnahmetisch (3) fixiert, der mit der Tischsteuerung (4) verbunden ist und entweder manuell mit einem Joystick, oder über die AxioVision Software gesteuert wird. Die Objektausleuchtung erfolgt über Kaltlichtleiter mit Fokussieraufsätzen (6) die von zwei Kaltlichtquellen (5) gespeist werden.

3.1.4 EB-Entwicklungs-Analyse mit dem Live-Imaging-System

Einer der Vorzüge des *drop array*-Systems ist die Möglichkeit der berührungsfreien Kultivierung von *embryoid bodies* gegenüber Kulturgefäßen über mehrere Wochen.

Diese Eigenschaft ermöglicht die Verwendung des *drop array* Systems für mikroskopische Analysen der EB-Entwicklung, ausgehend von der Aggregatbildung der im hängenden Tropfen befindlichen ES-Zellen über das Wachstum des gebildeten EBs bis zur Visualisierung von Differenzierungsprozessen.

Für eine Dokumentation von Differenzierungsprozessen in sich entwickelnden *embryoid bodies* wurde die Aufnahmeeinheit des EB-Dokumentations-Systems so umgestaltet, dass Aufnahmen während der Kultivierung von EBs möglich waren.

Dafür wurde das mit einer Digitalkamera versehene Binokular gegen das Eindringen von Feuchtigkeit geschützt und in einen Zellkulturinkubator eingestellt. Die Kamera wurde über ein Datenkabel mit einem externen PC-System vernetzt. Über die Software AxioVision (Zeiss) konnte die Kamera gesteuert werden.

Die auf *drop arrays* inkubierten ES-Zellen erwiesen sich als sensitiv gegenüber Lichtenergie. Eine konstante Beleuchtung von EBs verursachte eine Inhibierung der Proliferation und schließlich das Absterben von ES-Zellen. Eine Intervall-Beleuchtung im Abstand von 15 min, für eine Dauer von ca. 8s, ermöglichte Aufnahmen von mindestens 2 Wochen, ohne Beeinträchtigung der Vitalität der Zellen. Farbgetreue Abbildungen wurden durch eine Verwendung von Differenzierungsmedium ohne Phenolrotzusatz erzielt. Die Entwicklung von *embryoid bodies* (Abb. 3.4), konnte so durch eine Zeitrafferaufnahme erstmalig als Film beobachtet und dokumentiert werden.

3.2. Analyse der frühen hämatopoetischen Differenzierung muriner ES-Zellen *in vitro*

Frühe hämatopoetische Prozesse in von ES-Zellen abgeleiteten *embryoid bodies* wurden von Doetschman (Doetschman et al. 1985) erstmalig beschrieben. Während der Differenzierung embryonaler Stammzellen in *embryoid bodies* werden Differenzierungsprozesse der frühen primitiven Erythropoese imitiert, die vergleichbar mit der Bildung von Blutinseln im extraembryonalen Dottersack sind. Ausgehend von gemeinsamen mesodermalen Vorläuferzellen, den Hämangioblasten (Kennedy, 1997), bilden sich hämatopoetische primitive Erythrocyten, begleitet von der Entstehung von Blutgefäßen, die von Endothelzellen umgeben sind.

In diesem Abschnitt wird die Entstehung von hämatopoetischen Geweben während der EB-Entwicklung durch neue visuelle Analysemethoden erstmalig dokumentiert. Nach einer molekularen Analyse, werden die gewonnenen Kenntnisse dann für eine präparative Isolierung von hämatopoetischen Zellen verwendet, die zu hämatopoetischen Zellen der myeloischen Linie weiter differenziert werden konnten.

3.2.1 Visuelle Analyse der EB-Entwicklung und früher hämatopoetischer Differenzierungsprozesse (*Live- EB-Imaging*)

Für eine visuelle Analyse der EB-Entwicklung wurden ES-Zellen auf *drop arrays* unter Verwendung von ES-Medium ohne Phenolrotzusatz (Abschn. 2.6.1.1) angesetzt. Das in einer Kulturschale enthaltene *drop array* wurde auf dem Objektisch des Live-EB-Imaging-Systems in einem Zellinkubator eingestellt. Die Aufnahmen der EB-Entwicklung in einem einzelnen hängenden Tropfen erfolgten über 9 bis 14 Tage in Intervallen von 15 min.

Durch Aneinanderreihung der Einzelbild-Aufnahmen wurde ein Film erzeugt, der erstmalig die Aggregatbildung von ES-Zellen im *hanging drop*, sowie das Wachstumsverhalten und die Entwicklungsprozesse des formierten *embryoid bodies*, als auch erste hämatopoetische Differenzierungsprozesse dokumentiert (Abb. 3.4).

Die Auswertung der Aufnahmen zeigte eine vollständige Aggregation der ausgesäten ES-Zellen (750 Zellen pro Tropfen) bereits nach 24h. In der anschließenden Wachstumsphase, durch Proliferation der differenzierungsinduzierten ES-Zellen, waren die EBs bis zum Tag 3

zunächst kompakt. Ab Tag 4 (d4) konnten dann unterschiedlich dichte Bereiche beobachtet werden, der erste Hinweis für die Entstehung von Kavitäten (Abb. 3.4). Von Tag 5 war im Inneren des *embryoid bodies* ein sich durch rötliche Färbung und höherer Dichte abgrenzendes, meist hufeisenförmiges Kompartiment, zu beobachten. Die rötliche Färbung wurde durch embryonales Hämoglobin primitiver erythroider Zellen (Kennedy et al. 1997) hervorgerufen. Diese visuelle Beobachtung dokumentierte den Beginn der frühen hämatopoetischen Differenzierung, entsprechend der *in vivo* Situation im extraembryonalen Dottersack, ausgehend von Hämangioblasten (Kennedy et al. 1997). In den folgenden Tagen löste sich diese Struktur auf, die im Gewebeverband befindlichen hämatopoetischen Zellen verließen als Suspensionszellen den EB über seine Oberfläche.

Wie zu erwarten war, können diese abgegebenen Zellen sehr leicht detektiert werden. So konnte O. Drews im Rahmen einer Diplomarbeit abgegebene Zellen im Mediumüberstand nachweisen (Drews 2006).

Der Prozess des Verlustes der Adhärenz ausgebildeter primitiver Erythrocyten ist *in situ* notwendig, damit lose primitive Erythrocyten aus dem extraembryonalen Dottersack, nach der Ausbildung eines Gefäßsystems, im Embryo zirkulieren können.

Gleichzeitig zum Verlust der nichtadhärenten Zellen konnte eine Ausdehnung der Kavitäten beobachtet werden, dabei werden auch hier *in vivo* Prozessen imitiert, die analog zur Bildung der amniotischen Höhle im Embryo sind (Coucouvanis und Martin 1999).

Der ersten hämatopoetischen Welle folgte eine weitere Welle, in der primitive Erythrocyten gebildet wurden. Die Abgabe dieser Zellen, deren Anteil bis zu 20% des EB-Volumens betrug, bewirkte ein Schrumpfen des EBs durch den Verlust der hämatopoetischen Zellen.

**Abb. 3.4: EB Wachstum und hämatopoetische Entwicklung**

Aufnahmen der EB-Entwicklung mit dem Live-EB-Imaging-System über 9 Tage (d1-d9). Nach Aggregation (d1) und Wachstum sind erste Kavitäten (Pfeil) (d4) zu beobachten. Von Tag 5 (d5) sind erythroide Strukturen zu sehen (rotgefärbte Strukturen), die ihre Adhärenz zueinander verlieren (d6) und über die EB-Oberfläche abgegeben werden.

3.2.2 Lokalisation des hämatopoetischen Gewebes und Beobachtung endothelumgebener Kavitäten

Die mit dem Live-EB-Imaging-System beobachteten Strukturen, wie die entstehenden Kavitäten, sowie das hämatopoetische Gewebe, wurden zur weiteren Lokalisation durch Anfertigung von Cryogewebeschnitten (Abschn. 2.7.3) und anschließender Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) morphologisch analysiert.

Das Einbetten von geernteten EBs in Gewebeeinfriermedium (O.C.T., Tissue Tek), verbunden mit dem Gefrieren in flüssigem Stickstoff und einer nachfolgenden Lagerung bei -80°C , ermöglichte eine Anfertigung von EB-Gewebeschnitten mit einem Mikrotom in einem Kryostaten (Leica CM 3000). Nach einem Fixierungsschritt erfolgte eine Anfärbung der EB-Schnitte, dabei wurde das Cytoplasma von differenzierten ES-Zellen eines EBs durch Eosin und die Nuklei mit Hämalaun angefärbt.

Ein Vergleich von Cryoschnitten von sieben Tage alten *embryoid bodies* mit neun Tage alten *embryoid bodies*, zeigt die verschiedenen Stadien der Differenzierung von ES-Zellen während der EB-Entwicklung (Abb. 3.5).

Nach 7 Tagen ist der *embryoid body* von einer dichten äusseren Zellschicht umgeben, die an der Ausbildung einer extrazellulären Matrix beteiligt ist.

Das beobachtete hufeisenförmige kompakte Gewebe in 7 Tage alten *embryoid bodies* ist dem rötlichen (verursacht durch embryonales Hämoglobin ($\beta\text{-H1}$) primitiver Erythrocyten) hämatopoetischen Gewebe zuzuordnen, wie sie in (Abb. 3.4 und Abb. 3.7) zu sehen sind.

Die restlichen Zellen des EBs bilden einen Verband mit zahlreichen Kavitäten, die durch lokale apoptotische Prozesse, Zellmigration und Flüssigkeitstransport entstehen. Auch hier werden *in vivo* Prozesse imitiert, die mit der Transformation der soliden inneren Zellmasse der späten Blastozyste in die hohle Struktur des Eizylinders, vergleichbar sind (Cocouvanis und Martin 1999).

Nach 9 Tagen sind deutlich abgegrenzte Kavitäten, die von endothelartigen Zellen umgeben werden, zu beobachten. Dies ist ein Hinweis auf beginnende Ausbildung von vaskulären Strukturen, die die Hämatopoese begleitet. Abstammend vom gemeinsamen Vorläufer, dem Hämangioblasten (Choi et al. 1998).

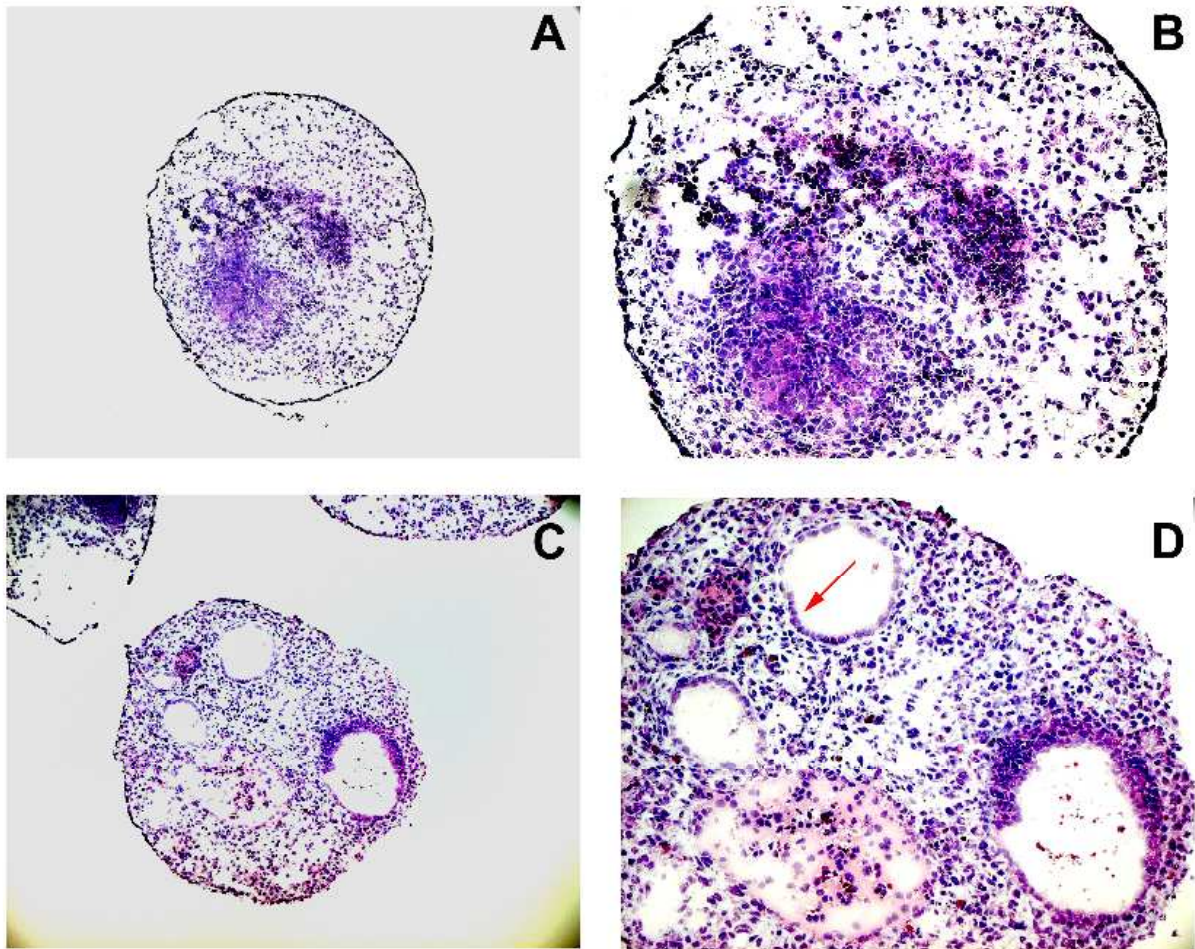


Abb.3.5: HE-Färbung von Cryo-Gewebeschnitten von 7 und 9 Tage alten EBs

EBs nach 7 Tagen Entwicklung weisen innenliegende hufeisenförmige hämatopoetische Strukturen, sowie unbegrenzte Kavitäten auf (A und B). Nach 9 Tagen können in den EBs Kavitäten die von endothelartigen Zellen umgeben sind (Pfeil), wie sie in Blutgefäßen zu finden sind, beobachtet werden (C und D).

3.2.3 Molekularer Nachweis hämatopoetischer Marker

Die vorangegangenen Analysen haben bestätigt, dass *embryoid bodies* ein interessantes *in vitro* Modell der frühen hämatopoetischen Differenzierung sind (Wiles und Keller 1991; Keller et al. 1993).

Die Verwendung von *drop arrays* zum Erzeugen von *embryoid bodies* in Verbindung mit der Entwicklung des Live-EB-Imaging-Systems ermöglichte erstmalig die optische Dokumentation der Bildung und des Wachstums von *embryoid bodies*, sowie die Beobachtung der Entstehung von hämatopoetischen Strukturen. Diese visuelle Beobachtung wurde auf molekularer Ebene weiter analysiert. Zur Analyse des zeitlichen Verlaufs der frühen Hämatopoese wurden Marker der mesodermalen und hämatopoetischen Differenzierung mittels RT-PCR nachgewiesen.

Für die Analyse des Expressionsmusters hämatopoetischer Marker, wurden EBs in ES-Zellmedium (Abschn. 2.6.1.1) über einen Zeitraum von 8 Tagen kultiviert und mit einer nachfolgenden RT-PCR die *messenger* RNA spezifischer Marker detektiert. Dafür wurde die Gesamt-RNA der geernteten EBs isoliert, anschließend revers transkribiert und eine konventionelle PCR der zu analysierenden Marker, mit spezifischen Primern durchgeführt (Abschn. 2.4).

Die Abbildung 3.6 zeigt die spezifischen PCR-Produkte der Analyse hämatopoetischer Marker. Für die Entstehung des hämatopoetischen Systems ist ausschließlich das mesodermale Keimblatt verantwortlich. Ein früher mesodermale Marker ist *Brachyury* (Herrmann, 1990), er ist von Tag 2 an detektierbar, erreicht am Tag 3 das Maximum und klingt nach Tag 4 ab.

Der Transkriptionsfaktor Gata1, essentiell für die hämatopoetische Differenzierung (Simon et al. 1992), ist verstärkt ab Tag 4 detektierbar. Marker des Hämangioblastenstadiums mit der Fähigkeit zur Differenzierung sowohl zu Endothelzellen als auch zu hämatopoetischen Zellen (Kennedy et al. 1997), sind ab Tag 3 detektierbar. Der Marker Flk-1/ VEGFR2 (Millauer et al. 1993), essentiell für die Endothelzellentwicklung, ist parallel zu SCL/Tal1, gewebespezifisch für erythroide und myeloide Zellen, detektierbar. Ein sehr früher Marker der initialen definitiven Hämatopoese ist CD41 (Mikkola, Blood, 2003), er wird wie embryonales Hämoglobin β -H1 (Wiles und Keller 1991), ein Marker der primitiven Erythropoese, ab Tag 4 exprimiert und ist ein Nachweis sowohl der primitiven als auch der definitiven Hämatopoese, die über den Tag 8 hinaus andauert.

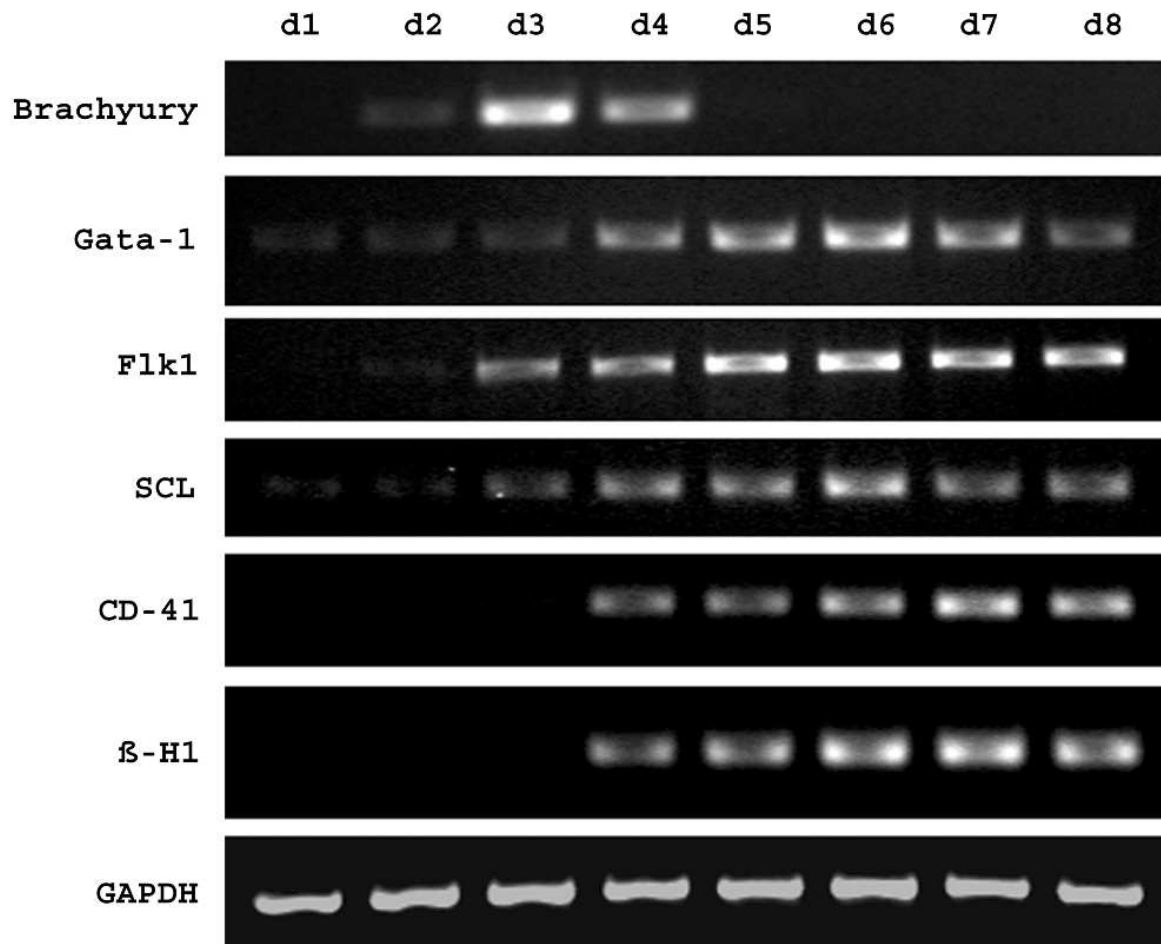


Abb. 3.6 RT-PCR früher hämatopoetische Marker

Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Expression hämatopoetischer Marker in differenzierenden EBs von 24h (d1) bis 8Tage (d8) nach Aussaat.

Das Mesoderm ist das Keimblatt aller hämatopoetischen Zellen, der mesodermale Marker Brachyury ist am Tag 3 am stärksten ausgeprägt. Die Expression des Transkriptionsfaktors Gata1, essentiell für die hämatopoetische Differenzierung, ist verstärkt ab Tag 4 sichtbar. Endothelzellen und hämatopoetische Zellen haben einen gemeinsamen Vorläufer, den Hämangioblasten. Die Expression von Flk1, einem Marker der endothelialen Entwicklung ist parallel zur Expression von SCL, der gewebetypisch für erythroide und myeloide Zellen ist, reguliert. Ein potentieller SCL abhängiger Kandidat ist CD-41, ein initialer Marker der definitiven Hämatopoese. Er wird wie embryonales Globin (β -H1), Marker der primitiven Erythropoese, ab Tag 4 exprimiert. Das GAPDH-Signal dient als Ladekontrolle.

3.2.4 Isolierung des hämatopoetischen Kompartimentes

In bisherigen Studien wurde das hämatopoetische Potential von ES-Zellen durch tryptische Vereinzelung von Gesamt-*embryoid bodies* untersucht. Die Kenntnisse aus der visuellen Beobachtung, der Analyse von Cryogewebeschnitten, sowie der Nachweis auf molekularer Ebene, führten zur Entwicklung einer Präparationsmethode, bei der hämatopoetische Zellen aus dem hämatopoetischen Gewebeverband isoliert werden (Abb.3.7). Die Isolation von hämatopoetischen Zellen war am Tag 7 des EBs optimal. Zu diesem Zeitpunkt bestand das hämatopoetische Kompartiment aus einem losen Verband von wenig-, bzw. nichtadhärenten zum Teil rötlich gefärbten Zellen. Diese konnten durch leichtes Perforieren der EB-Oberfläche und durch Ausübung von Druck auf die äussere EB-Hülle, aus dem EB-Inneren isoliert werden. Die Anzahl der isolierten hämatopoetischen Zellen eines *drop array* (96 *embryoid bodies*) betrug durchschnittlich 5×10^5 Zellen, dies entspricht einem prozentualen Anteil von 16,6% bei durchschnittlich 3×10^4 Zellen pro EB. Da noch ein erheblicher Teil an rotgefärbten Zellen im Rest-EB verbleibt, sowie eine Vielzahl an Zellen vom EB abgeschieden worden ist, ist offensichtlich, dass die hämatopoetischen Prozesse in qualitativ hochwertigen EBs einen dominanten Effekt darstellen.

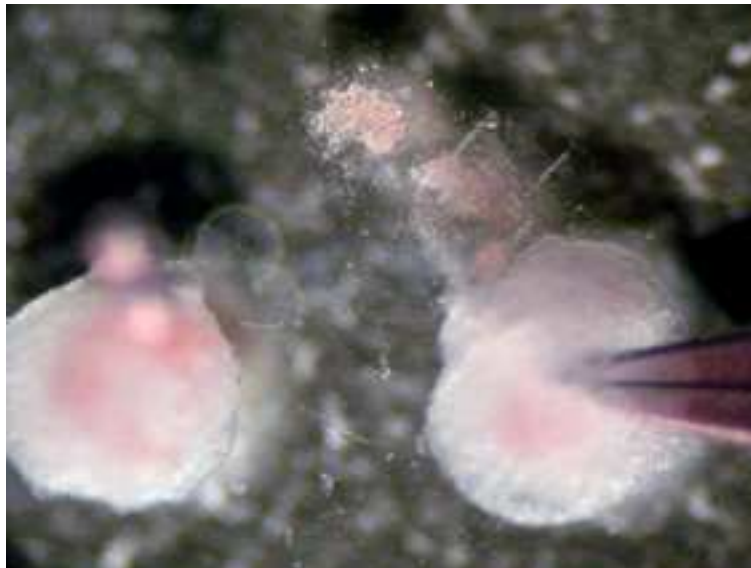


Abb.: 3.7 Präparative Isolation des hämatopoetischen Gewebes

Die Abbildung zeigt hämatopoetische Zellen im intakten EB (links) und durch eine Präparation isolierte Zellen (mitte, oben), sowie den ausgequetschten EB (EB mit Pinzettenspitze).

3.2.5 Erzeugung hämatopoetischer Kolonien (*Colony-Forming Unit-Assay*)

Sowohl hämatopoetische Zellen aus dem extraembryonalen Dottersack, als auch von ES-Zellen abgeleitete hämatopoetische Zellen, besitzen die Fähigkeit hämatopoetische Kolonien, sogenannte BI-CFC (*Blast Colony Forming Cells*, BI-CFC) zu bilden (Kennedy et al. 1997).

Die Initiierung der bisherig untersuchten hämatopoetischen Differenzierung erfolgt spontan, durch die stattfindende mesodermale Differenzierung innerhalb des *embryoid bodies*, ohne Gabe von zusätzlichen differenzierungsfördernden Faktoren.

Um eine fortschreitende Differenzierung früher hämatopoetischer Stadien zu definitiven hämatopoetischen Zelllinien zu gewährleisten, werden verschiedene Methoden angewandt, die eine Kultur auf stromalen Zellen (Nakano et al. 1994), sowie im chemisch definierten Suspensionsmedium mit hämatopoetischen Induktoren und im auf Methylzellulose basierenden, viskosen Medium mit Cytokinen beinhalten.

Die weitere Analyse des hämatopoetischen Potentials erfolgte durch Kultivierung der isolierten hämatopoetischen Zellen in auf Methylzellulose basierendem viskosen Medium mit den Cytokinen: rekombinantes murines SCF (*stem cell factor*), den Interleukinen IL-3 und IL-6, sowie rekombinantes humanes Erythropoietin.

Dafür wurden jeweils 1×10^4 isolierte Zellen mit 1ml Methylzellulose, das die Cytokine bereits enthielt (Methocult), für eine Woche in einer Kavität einer 6-Loch-Platte inkubiert (Abschn. 2.8.2.2).

Nach 7 Tagen konnten hämatopoetische Kolonien morphologisch bestimmt und quantifiziert werden, darunter ein großer Teil (77,6%) an Erythrocyten, die sogenannte BFC-E (*Burst Forming Colonies*) Kolonien bildeten, sowie gemischte Kolonien, die Granulozyten, Monocyten und Makrophagen in sogenannten CFU-GMM (*Colony Forming Unit*) enthielten.

Damit ist bewiesen, dass die isolierten Zellen ein sogenanntes „*multilineage Potential*“ besitzen. Die hämatopoetische Differenzierung ist dabei aber auf definitive, hämatopoetische Zelllinien der myeloische Linien beschränkt. Eine ergänzende Inkubation der isolierten hämatopoetischen Zellen mit Methylzellulose, die mit dem Interleukin IL-7 dotiert war, zur Förderung der Differenzierung in Richtung B-Zellen, wie es bei vom Knochenmark abgeleiteten Zellen angewandt wird, wies keine positive B-Zell-Kolonien auf (Daten nicht gezeigt). Die Isolierung der hämatopoetischen Vorläufer ist ein Selektionsverfahren, das durch den Ausschluß anderer Vorläuferzellen eine grössere Ausbeute hämatopoetischer Kolonien ermöglichte.

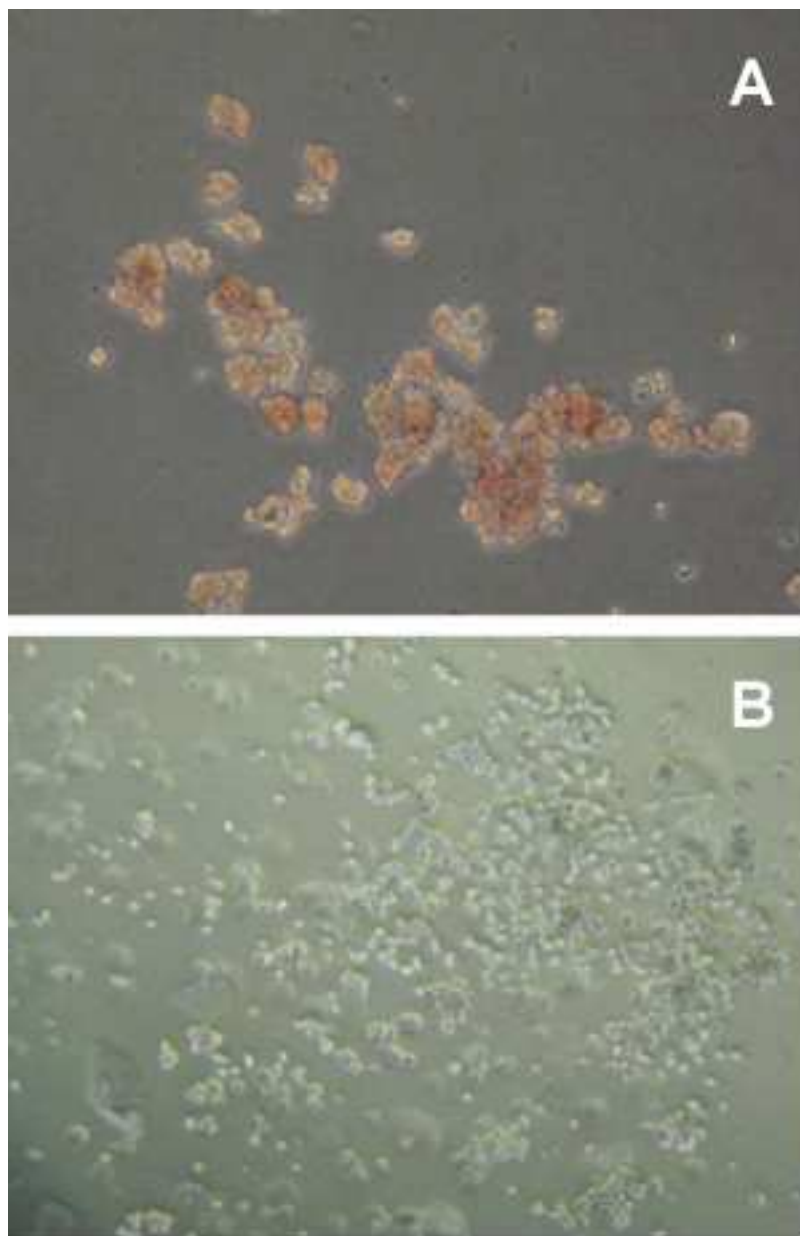


Abb. 3.8: Aufnahmen von BFU-E und CFU-GMM Kolonien

Die Abbildung zeigt hämatopoetische Kolonien von BFU-E (A) und CFU-GMM (B) nach einer Inkubation hämatopoetischer Zellen, die aus EBs isoliert wurden, in mit Cytokinen versetzter Methylzellulose. Eine morphologische Bestimmung der gebildeten Kolonien erfolgte nach einer Inkubation von 7 Tagen.

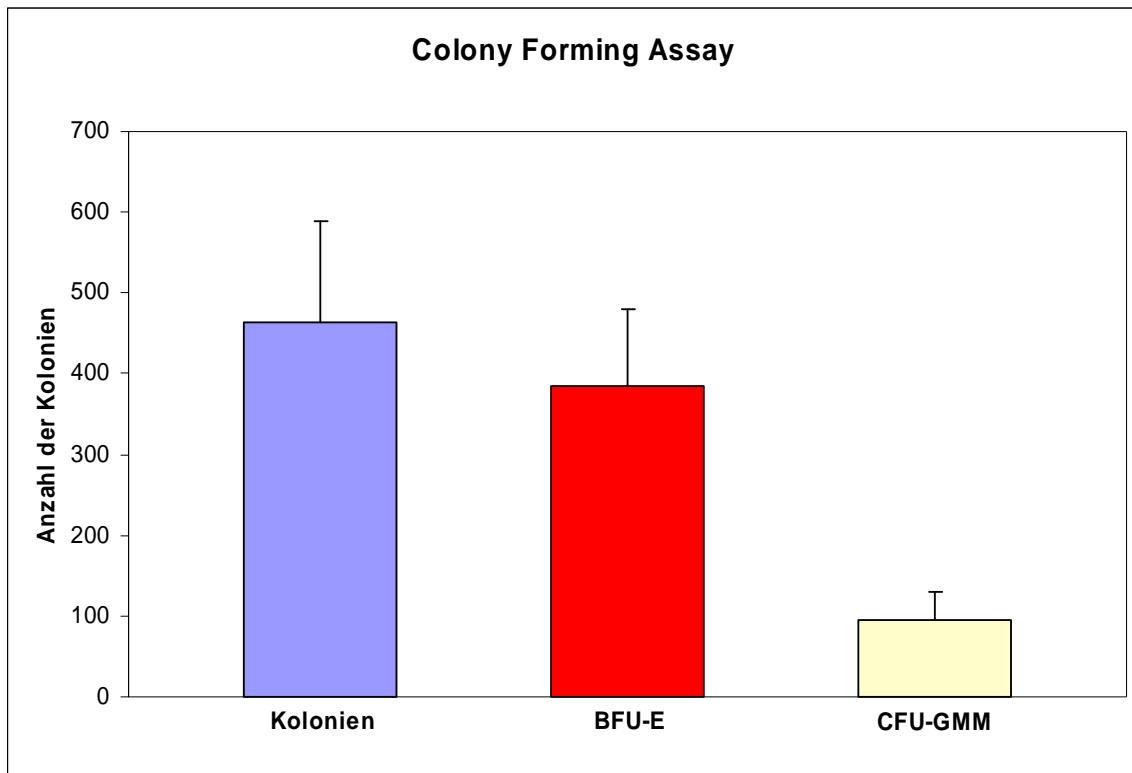


Abb. 3.8: Quantitative Bestimmung hämatopoetischer Kolonien (*Colony Forming Unit-Assay*)

Die Grafik zeigt die Zahl hämatopoetischer Kolonien und die Verteilung der Kolonien von BFU-E zu CFU-GMM (siehe Text) pro ml Methylzellulose nach einer Inkubation von 7 Tagen, ausgehend von 10^4 isolierten Zellen.

3.2.6 Detektion von Mastzellen

Neben den in der viskosen Methylzellulose-Suspension nichtadhärenten erythroiden und Misch-Kolonien aus Granulocyten, Monocyten und Macrophagen, waren mit zunehmender Kulturdauer Cluster von adhärenenten, relativ großen und granulären Zellen zu beobachten. Als mögliche Zelltypen wurden sowohl adhärenente Makrophagen, als auch Mastzellen diskutiert. Zur Bestimmung dieser Zellen, wurden zunächst die nichtadhärenenten Zellen in der Suspension, durch Verdünnung der Methylzellulose mit kaltem Medium, vollständig abgetrennt.

Eine anschließende HE-Färbung (Abschn. 2.7.4.) hob die granulären Strukturen im Cytoplasma der Zellen hervor, die ungefärbt blieben (Abb. 3.9). Diese granulären Strukturen konnten durch Verwendung des Ionophors Ionomycin degranuliert werden. Dabei equilibriert das Ionophor die intra- und extrazellulären Calcium-Mengen und verursacht dadurch die Degranulierung von Vesikeln. Dafür wurden die Zellen mit einer 1mM Ionomycin-Lösung bedeckt und für ca. 10 min bei RT inkubiert (Abschn. 2.8.2.3). Zu Beginn der Reaktion

konnte zunächst ein Verschmelzen von Vesikeln beobachtet werden, die schließlich zur scheinbaren Zerstörung der Zytoplasmamembran führten.

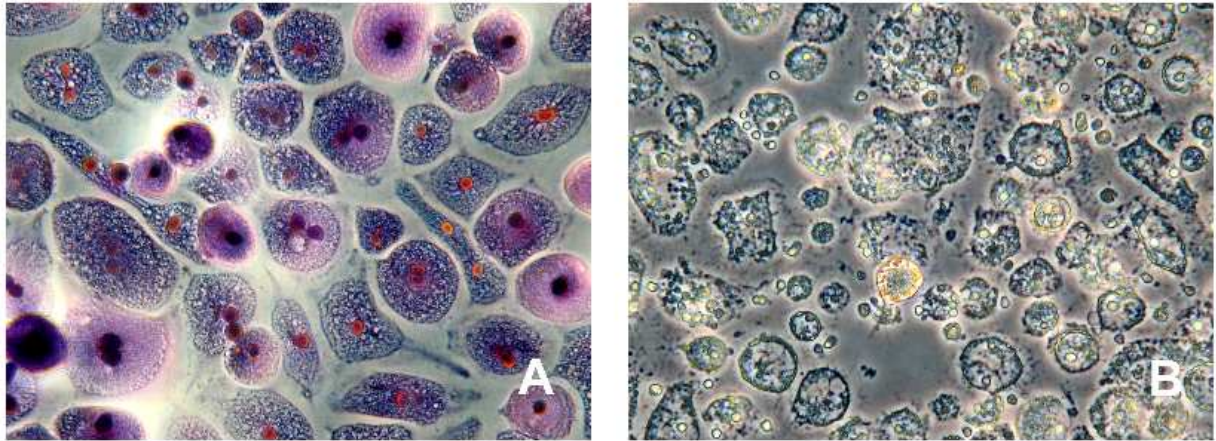


Abb. 3.9 HE-Färbung und Degranulierung

Abbildung A zeigt Cluster von adhärennten Zellen nach einer HE-Färbung.

Abbildung B zeigt degranulierte Zellen dieses Zelltypes nach Verwendung eines Ionophors (1mM) (Ionomycin, Sigma, I3909) nach einer Inkubation von 10min (Vergrößerung, 240x).

Zur Bestimmung des spezifischen Zelltypes wurden diese Zellen auf mastzelltypische Proteasen (MCPs) der sekretorischen Granulä (Yamada et al. 2003) untersucht, die eine Zuordnung der verschiedenen Mastzell-Subtypen ermöglichen, dabei erfolgt die Einteilung der Typen entsprechend des Gewebes in Mastzellen des Bindegewebes oder in mucosale Mastzellen (Schleimhaut) (Stevens und Austen 1989).

Die spezifischen Mastzellproteasen wurden mit einer RT-PCR nachgewiesen, dabei konnten 6 der 8 analysierten Mastzellproteasen spezifisch detektiert werden (Abb.3.10). Dafür wurden die aufgereinigten Zellen lysiert und die Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und eine PCR mit spezifischen Primern (Tab. 2.4) durchgeführt.

Mastzellen sind von hämatopoetischen Stammzellen abgeleitet, sie haben also einen gemeinsamen Vorläufer mit den detektierten hämatopoetischen Zellen. Die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen in Richtung Mastzellen wird durch das Interleukin IL-3 und SCF (*stem cell factor*) gefördert. Von ES-Zellen abgeleitete Mastzellen weisen Eigenschaften des Bindegewebetyps auf (Tsai et al. 1991).

Durch das Abtrennen der Suspensionszellen konnten nahezu reine Mastzell-Population erzielt werden, die in ES-Zell-Medium zunächst weiter kultiviert werden konnten. Eine Kultivierung dieser Mastzellen in speziellen Mastzell-Medien könnte ein vielversprechende Modell für die Mastzellentwicklung und die Analyse von inflammatorischen Prozessen *in vitro* darstellen.

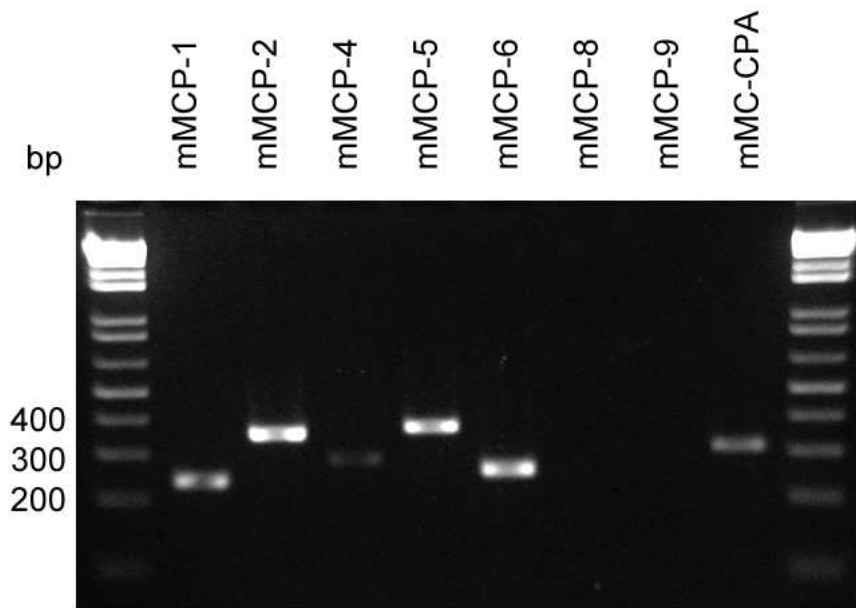


Abb. 3.10: Nachweis mastzellspezifischer Proteasen

RT-PCR zum Nachweis mastzellspezifischer Proteasen aus einer homogenen konfluenten Zellpopulation nach einer Differenzierung in Methylcellulose für 14 Tage.

3.2.7 Zusammenfassung der EB-Analyse-Verfahren früher Differenzierungsprozesse

Die Verwendung von *drop arrays* zur Einleitung der Differenzierung von ES-Zellen im Modellsystem *embryoid body*, ermöglichte die erweiterte Anwendung verschiedener Analyseverfahren, wie die visuelle Dokumentation der Aggregation von ES-Zellen zu einem EB und der darin ablaufenden Differenzierungsprozesse, inklusive der Entstehung von Kavitäten, die entwicklungsabhängig von endothelartigen Zellen begrenzt wurden, sowie die Bildung hämatopoetischer Gewebe. In diesem Modellsystem konnten während der Entwicklung auftretende hämatopoetische Marker nachgewiesen werden. Die präparative Isolation von hämatopoetischen Vorläufern ermöglichte eine definitive hämatopoetische Differenzierung zu myeloischen Linien, sowie von Mastzellen, die als homogene Population abgetrennt werden konnten.

3.3 Retinoinsäure induzierte ES-Zell-Differenzierung in *embryoid bodies* unter Verwendung von *drop arrays*

Die Induktion der im vorangegangenen Abschnitt (Abschn. 3.2) untersuchten hämatopoetischen Differenzierung erfolgte ohne zusätzliche differenzierungsfördernde Faktoren während der mesodermalen Differenzierung im EB. Im weiteren Verlauf wurde die Wirkung des Morphogens all-trans Retinoinsäure (RA) auf die *in vitro* Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen untersucht.

Als eines der am häufigsten verwendeten Morphogene beeinflusst Retinoinsäure die Differenzierung von Zellen und Geweben. *In vivo* ist RA an der Ausbildung der anterior-posterioren Körperachse beteiligt (Kessel und Gruss 1991), *in vitro* übt RA einen konzentrations- und zeitabhängigen Effekt auf die ES-Zelldifferenzierung aus (Wobus et al. 1997). Eine Applikation von RA während der Differenzierung beeinflusst die Proliferation differenzierender Zellen, und wird sogar von proapoptischen Prozessen begleitet (Okazawa et al. 1996). Die funktionelle Wirkung erfolgt direkt durch Aktivierung RA-induzierter Gene, die ein RA-*Response*-Element im Promotor besitzen, oder indirekt durch Einfluss von RA-aktivierten Produkten.

Die im folgenden vorgestellten Experimente bestätigen erneut das Differenzierungspotential der verwendeten Zelllinie, wie auch die Effizienz der hier entwickelten spezifischen Differenzierungsmethodik, die durch Verwendung des *drop array*-Systems ermöglicht wird.

3.3.1 Der Einfluss von RA auf das EB-Wachstumsverhalten und Analyse der Cytotoxizität von Lösungsmitteln

Um den Einfluss von Retinoinsäure auf die Differenzierung von ES-Zellen im Modellsystem *embryoid body* analysieren zu können, wurde zunächst der konzentrationsabhängige Effekt von RA auf das EB-Wachstumsverhalten und die Cytotoxizität des benötigten Lösungsmittels untersucht.

Für Sicherheitsanalysen sind Tests vorgeschrieben, die Toxizitäten von Medikamenten und Kosmetika überprüfen. Dabei kann die Sensitivität von ES-Zellen gegenüber Chemikalien für die Entwicklung alternativer Methoden genutzt werden, um die Anzahl notwendiger Tierexperimente reduzieren zu können. Geeignete *in vitro Screening*-Verfahren, die eine Darstellung des Einflusses von Chemikalien auf Differenzierungsprozesse im Modellsystem

embryoid body ermöglichen, sind somit ein ideales Versuchsobjekt für Embryotoxizitätsanalysen (Bremer und Hartung 2004; Rolletschek et al. 2004).

Mit dem EB-Dokumentations-System (Abschn. 3.1.3) kann die Entwicklung von *embryoid bodies*, insbesondere ihr Wachstumsverhalten, gemessen werden. Damit können Veränderungen, hervorgerufen durch Einfluß von Chemikalien, analysiert werden.

RA gehört aufgrund seiner Struktur zu den fettlöslichen Antioxidanzien, so dass die Verwendung eines Lösungsmittels (Solvent) für eine Applikation von RA notwendig war.

Eine vergleichende Analyse der Lösungsmittel Ethanol und DMSO sollte ihr cytotoxisches Potential auf ES-Zellen in *embryoid bodies* erfassen. Dies wurde mit einer Analyse des Einflusses verschiedener RA-Konzentrationen auf die EB-Entwicklung kombiniert.

Zunächst wurden 50mg Retinoinsäure (Sigma) in je 1ml DMSO, bzw. in 1ml Ethanol (170mM) gelöst und daraus eine 1mM Stammlösung (1:170 Verdünnung) hergestellt. Diese diente zum Erstellen einer log₁₀ Verdünnungsreihe (von 1mM bis 1µM) in einer ES-Zell-Suspension (1,5x10⁴ Zellen/ ml) mit einer Lösungsmittel-Endkonzentration von 0,01% (1:10.000), die 7 Tage auf *drop arrays* inkubiert wurden (Abschn. 2.6.8). Dabei wurde für jede Verdünnungsstufe und Lösungsmittelart ein *drop array*, d.h. 96 EBs verwendet, die dann mit dem EB-Dokumentationssystem erfasst und ausgewertet werden konnten. Aus dem gemessenen Flächeninhalt, der zweidimensionalen EB-Aufnahmen, wurde ein Diagramm (Abb. 3.11) erstellt, das die Größenveränderung von EBs sichtbar macht.

Damit konnte eine Abhängigkeit des EB-Wachstumverhaltens, sowohl von der RA-Konzentration, als auch von der Art des Lösungsmittels, erfasst werden.

Die aus der gemessenen Fläche resultierende EB-Größe nimmt mit zunehmender RA-Konzentration ab. Nach 7 Tagen beträgt die durchschnittliche Fläche eines unbehandelten *embryoid bodies* rund 2,7 mm². Gegenüber der unbehandelten Kontrolle ist die Fläche von *embryoid bodies*, die mit 1nM RA behandelt wurden, bereits reduziert. Diese Reduktion ist mit zunehmender RA-Konzentration stärker ausgeprägt, so ist die Fläche bei 100 nM RA etwa halbiert und beträgt bei hohen Konzentrationen (1-2µM RA) nur noch ein Drittel. Der Konzentrationsschritt von 1µM zu 2 µM RA weist nur eine geringfügige Abnahme der Fläche auf. Diese Ergebnisse bestätigen einen negativen Einfluß von RA auf die Proliferation von Zellen, wie es bereits bei einigen humanen Tumor-Zelllinien beschrieben wurde (Frey et al. 1991) und konnte hier konzentrationsabhängig, bei der ES-Zell-Differenzierung in EBs mit einem Hochdurchsatzverfahren dokumentiert werden.

Zugleich konnte der Effekt der beiden verwendeten Lösungsmittel, Ethanol und DMSO, dargestellt werden. Die Lösungsmittel, in denen die Retinoinsäure gelöst war, wurden mit

einer Endkonzentration von 0,01% eingesetzt. Dabei zeigte Ethanol einen größeren inhibitorischen, bzw. cytotoxischen Effekt auf das EB-Wachstum als DMSO (Abb. 3.11). Aufgrund der nachgewiesenen geringeren Toxizität von DMSO, wurde es für die folgenden Versuche als Lösungsmittel verwendet, obwohl ein Effekt von DMSO auf die Differenzierung von ES-Zellen bekannt ist. Adler (Adler et al. 2006) hat die kritische Konzentration von 0.125 % für DMSO auf die ES-Zell Differenzierung bestimmt, das entspricht einer Verdünnung von 1:1250. In den nachfolgenden RA-abhängigen Differenzierungsanalysen wurde ein Verdünnungsfaktor von 1:10.000 (0,01%) verwendet und dadurch ein Einfluss von DMSO auf die ES-Zell-Differenzierung ausgeschlossen.

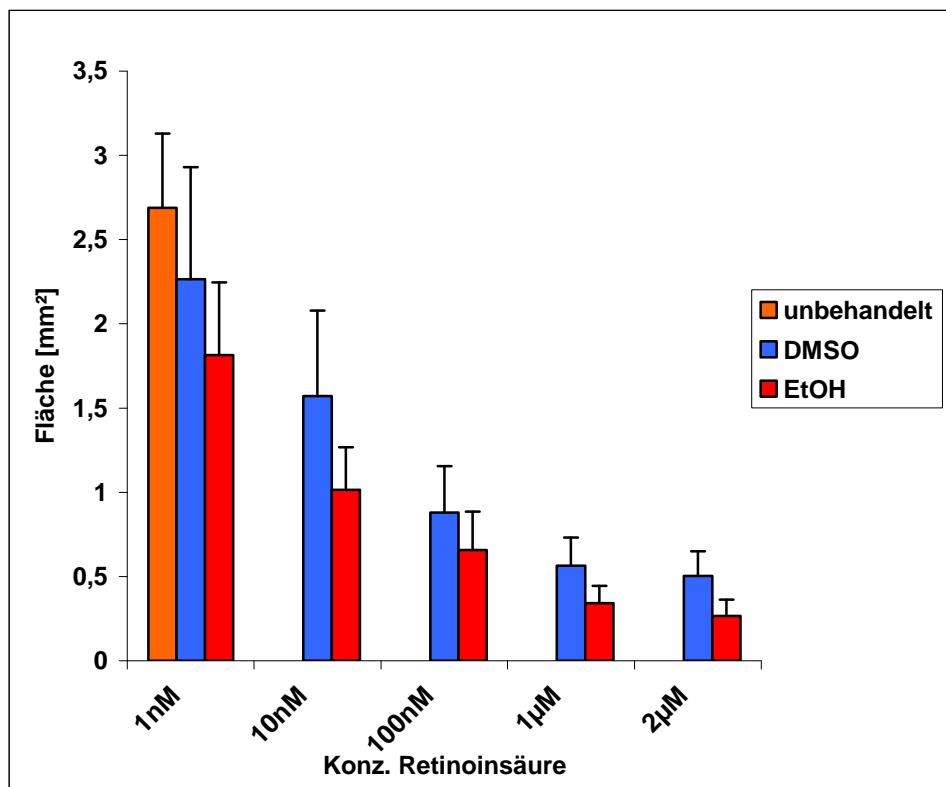


Abb. 3.11: Abhängigkeit der EB-Entwicklung von der RA Konzentration und den verwendeten Lösungsmitteln DMSO und Ethanol (n=96)

Die Grafik zeigt die mit dem EB-Dokumentationssystem gemessene Fläche von EBs nach 7 Tagen auf *drop arrays*, die mit einer log₁₀ RA-Konzentrationsreihe inkubiert wurden. Dafür wurde RA in DMSO, bzw. Ethanol gelöst und in einer Lösungsmittel-Konzentration von 0,01% eingesetzt.

3.3.2 Einfluss von RA auf die pluripotente ES-Zell-Differenzierung

Nachdem ein konzentrationsabhängiger Einfluss von RA auf das Wachstumsverhalten von *embryoid bodies* gezeigt werden konnte, wurde die Abhängigkeit verschiedener RA-Konzentrationen und der Differenzierungszeit auf die pluripotente Differenzierung analysiert. Ein konzentrations- und zeitabhängiger Einfluss von RA auf die pluripotente ES-Zelldifferenzierung wurde bereits von Wobus beschrieben, insbesondere der Effekt auf die neuronale Differenzierung und auf die Bildung von Cardiomyocyten (Wobus et al. 1997).

Das *drop array* System ermöglicht eine Kultivierung von *embryoid bodies* im hängenden Tropfen über 7 Tage. Mit diesem System konnte der konzentrations- und zeitabhängige Einfluss von RA auf das *in vitro* Differenzierungsmodell EB über 7 Tage analysiert werden. Dafür wurden ES-Zellen mit einer RA Konzentrationsreihe (1nM–2µM) versetzt und für die Erzeugung von *embryoid bodies* auf *drop arrays* inkubiert.

Der Nachweis des Einflusses von RA auf die pluripotente Differenzierung erfolgte durch eine Detektion früher Keimblatt- und Differenzierungsmarker, nach einer EB-Kultivierung von 4 und 7 Tagen, mittels RT-PCR. Um die Differenzierung in einem Kontrollansatz zu minimieren, wurde ein Ansatz mit LIF versetzt. Als weitere Kontrolle dienten undifferenzierte ES-Zellen aus Monolayerkultur mit LIF-Behandlung. Es wurden frühe Marker aller drei Keimblätter nachgewiesen (Abb.3.12).

Zunächst erfolgte der Nachweis von Oct-4, eines Markers für undifferenzierte ES-Zellen (Okamoto et al. 1990). Oct-4 konnte sowohl in undifferenzierten ES-Zellen, als auch in *embryoid bodies*, die mit niedrigen RA-Konzentrationen von 1nM bis 100nM inkubiert wurden, nach 4 und 7 Tagen detektiert werden.

Im Gegensatz dazu, ist eine deutlich differenzierungsinhibierende Wirkung von hohen RA-Konzentrationen (1 und 2µM) zu erkennen, dies wurde in der Literatur bereits beschrieben und wird durch RA-*Responsive* Elemente im Oct-3/4 Promotor verursacht (Barnea und Bergman 2000).

Als erster früher Marker der drei Keimblätter, zeigt der endodermale Marker Gata-4, der durch RA induziert wird (Arceci et al. 1993), zunächst ein unspezifisches Expressionsmuster, nach 7 Tagen war jedoch die Expression von Gata-4 in den Konzentrationsbereichen von 10 nM bis 1 µM verstärkt detektierbar.

Eine eindeutige Inhibierung der mesodermalem Differenzierung durch RA-Konzentrationen ab 10 nM ist durch den Nachweis des mesodermalen Marker Brachyury (Herrmann et al.

1990) nach 4 und 7 Tagen ersichtlich. Brachyury ist lediglich in den Kontrollen (unbehandelt, LIF-Behandlung) und in der geringsten RA-Konzentration (1nM) eindeutig detektierbar.

Zum Nachweis eines frühen ektodermalen Markers wurde zunächst das intermediäre Filament-Protein Nestin, das ursprünglich als Marker für neuronale Vorläufer und Gliazellen beschrieben wurde (Fraichard et al. 1995), ausgewählt.

Es wird jedoch während der Embryogenese in migrierenden und proliferierenden Zellen exprimiert. Im adulten Gewebe ist es hauptsächlich auf Areale der Regeneration beschränkt und ist allgemein abundant in von Stammzellen abgeleiteten Vorläuferzellen. Während der Differenzierung besitzen Nestin-positive Zellen das Potential in neuroektodermale, endodermale and mesodermale Linien zu differenzieren, so dass Nestin ein Marker für multiple Vorläuferzellen und nicht exklusiv für die neuronale Entwicklung ist.

Nestin ist bereits in ES-Zellen aus der Monolayerkultur detektierbar, verstärkt aber in 4 Tage alten *embryoid bodies*, die mit höheren Konzentrationen (10nM- 1 μ M RA) behandelt wurden, wobei dieser Nachweis auch noch nach 7 Tagen möglich ist (10nM- 2 μ M RA).

Im Kontrast zu den inhibierenden Effekten höherer RA-Konzentrationen, insbesondere auf die mesodermale Differenzierung, kann eine Induktion der ektodermalen Differenzierung, anhand der Pax-6-Expression, nachgewiesen werden.

Während Pax6 (Gotz et al. 1998) ein früher Marker für ektodermale bzw. neuroektodermale Differenzierung ist, ist der Marker für differenzierte neuronale Zellen β -Tubulin III in 4 Tage alten *embryoid bodies* in einem niedrigen Expressionslevel zu detektieren, aber nach 7 Tagen verstärkt in *embryoid bodies*, die mit höheren RA-Konzentrationen (10 nM bis 2 μ M RA) behandelt wurden.

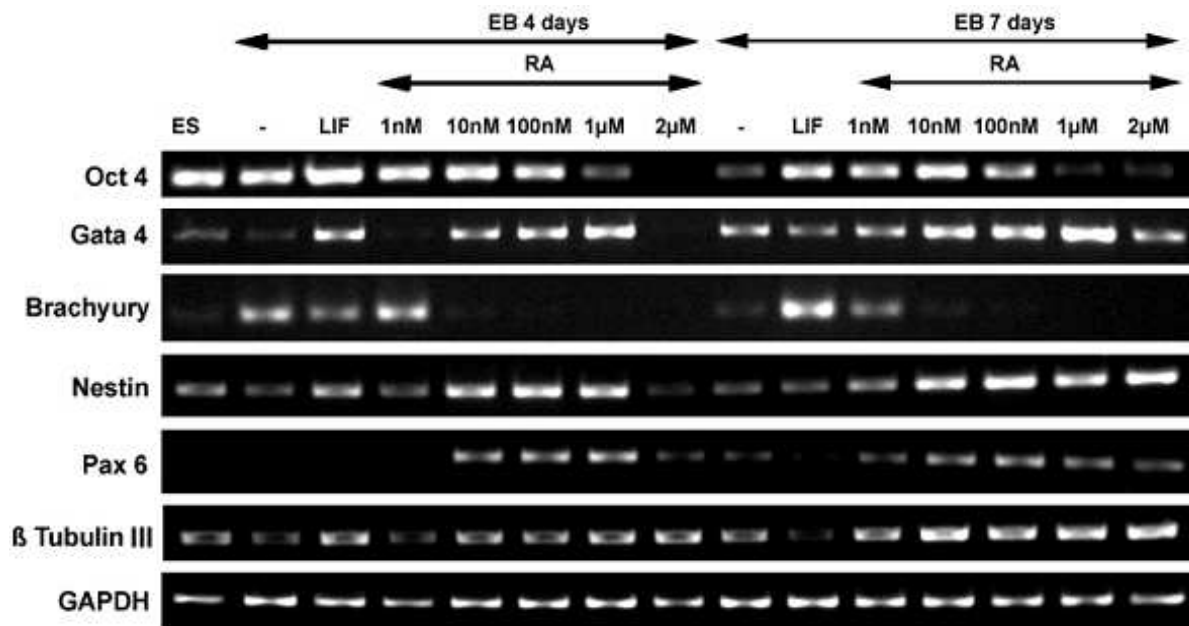


Abb. 3.12: RT-PCR früher Differenzierungsmarker

Die Abbildung zeigt den konzentrations- und zeitabhängigen Effekt von RA auf das pluripotente Differenzierungsvermögen. Dafür wurden ES-Zellen mit einer Konzentrationsreihe auf *drop arrays* inkubiert und nach 4 und 7 Tagen spezifische Differenzierungsmarker, aller drei Keimblätter mittels RT-PCR detektiert. Als experimentelle Kontrollen dienten undifferenzierte ES-Zellen aus einer Monolayerkultur mit LIF. Ebenfalls als Kontrollen dienten ES-Zellen die auf *drop arrays* ohne Zusatz und ES-Zellen die mit LIF, zur Differenzierungsunterbindung, inkubiert wurden. Die Zuordnung der frühen Differenzierungsmarker sind: OCT-4, undifferenzierte ES-Zellen; Gata-4, endodermaler Marker; Brachyury, mesodermaler Marker; Nestin, unspezifischer Vorläufermarker; Pax-6, ectodermaler bzw. neuroektodermaler Marker; βTubulin III, differenzierter Neuronen; GAPDH, Ladekontrolle.

Die Analyse zeigt eine konzentrationsabhängige inhibierende Wirkung von RA auf die mesodermale Differenzierung und eine konzentrations- und zeitabhängige Förderung der ektodermalen, besonders der neuronalen Differenzierung. Desweiteren ist der Oct-4-Nachweis in 7 Tage alten EBs ein Hinweis auf vorhandene undifferenzierte ES-Zellen, mit einem potentiell unlimitierten Proliferationsvermögen.

3.3.3 RA-induzierte neuronale Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen

Die Induktion der neuronalen Differenzierung durch höhere RA-Konzentrationen ist bekannt (Bain et al. 1996) und wurde mit dem *drop array* System bestätigt. Aus den gewonnenen Erkenntnissen konnte ein neues neuronales Differenzierungsprotokoll entwickelt werden. Vorteile des Protokolls in dieser Dissertation ist eine vereinfachte Durchführung, ohne zusätzliche Manipulationen, sowie eine verkürzte Entwicklungsdauer. Die Verbesserung der Effizienz solcher Verfahren ist besonders im Hinblick auf spätere klinischer Anwendung von höchster Bedeutung.

Die Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu einer möglichst homogenen Zellpopulation spezifischer Vorläuferzellen, die sich in Gewebe eingliedern können, erfordert eine genaue Analyse der Differenzierungsbedingungen.

Neben einer Applikation von Wachstumsfaktoren, wie des *basic Fibroblast Growth Factors* (bFGF) und des *Epidermal Growth Factors* (EGF), wird auch RA zum Generieren von Neuronen und Gliazellen genutzt. Die daraus resultierenden neuronalen Vorläuferzellen besitzen entsprechend ihrem Verhalten *in vivo* zunächst die Charakteristik radialer Gliazellen (Malatesta et al. 2003).

In bisherigen Differenzierungsprotokollen werden hohe RA-Konzentrationen (1 μ M-5 μ M) zur Induktion der neuronalen Differenzierung nach mehreren Tagen der Erzeugung von *embryoid bodies* appliziert.

Mit Hilfe der *drop arrays* wurde ein neuronales Differenzierungsprotokoll entwickelt, bei dem die EB-Bildung und die neuronale Induktion in RA-haltigem Medium in einem Schritt durchführbar war. Dadurch konnten differenzierte Neurone schon innerhalb einer Woche nach Versuchsbeginn nachgewiesen werden.

Zur Induzierung der neuronalen Differenzierung wurden ES-Zellen in Differenzierungsmedium, das mit 1 μ M RA versetzt war, für 4 Tage in *drop arrays* inkubiert. Um eine neuronale Differenzierung zu fördern ist die FBS-Konzentration des Differenzierungsmediums auf 10% reduziert und die ES-Zell-Konzentration (Konzentration 1 \times 10⁵ Zellen/ ml), aufgrund des auf die Proliferation inhibitorischen und proapoptotischen Effektes von RA erhöht worden. Als besonders kritischer Schritt der neuronalen Differenzierung hinsichtlich der Überlebensrate der Zellen war die Herauslösung von Zellen aus dem EB-Gewebeverband mittels Trypsin und die anschließende Kultur in serumfreien Medien auf mit extrazellulären Matrixproteinen (Ornithin, Laminin) beschichteten Deckgläschen (Abschn. 2.8.1.1). Nach der

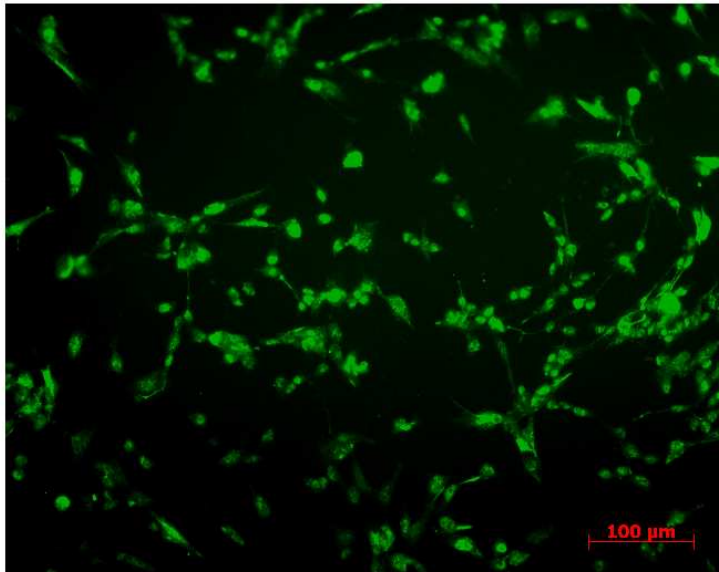
Ernte der *embryoid bodies* wurden sie mit Trypsin vorsichtig vereinzelt (Abschn. 2.8.1). Für die erste Kulturzeit nach dem Ausplattieren erwies sich ITSFn (Insulin, Transferin, Selenium, Fibronectin) (Abschn. 2.6.1.1) als geeignetes Medium für das Überleben der Vorläuferzellen. Die neuronalen Vorläuferzellen benötigen für die weitere Entwicklung und für das Überleben Kontakt zueinander, d.h. eine konfluente Aussaatdichte. Hohe Überlebensraten ließen sich durch einen teilweisen tryptischen Verdau erzielen, bei der es zur Bildung von Clustern kam, aus denen Neuronen auswuchsen. Bei vollständigem Verdau war die Überlebensrate deutlich geringer. Für die Kultivierung der entwickelten neuronalen Zellen wurde ab Tag 2 nach dem Ausplattieren N2-Medium (Abschn. 2.6.1.1) genutzt. Für eine Langzeitkultivierung wurde B27-Medium verwendet (Abschn. 2.6.1.1).

Der Nachweis von differenzierten Neuronen war mit immunofluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen β -Tubulin III nach 7 Tagen nach EB-Ansatz, bzw. nach 3 Tagen in serumfreier Monolayerkultur möglich. Nach weiteren 7 Tagen waren sowohl β -Tubulin III positive Neurone, als auch GFAP positive Astrozyten nachweisbar. Eine genaue quantitative Bestimmung der Ausbeute war äußerst schwierig. Nach dem Ausplattieren war der überwiegende Teil (mehr als 90%) positiv gegenüber RC2 (Abb. 3.12), einem frühen neuronalen Marker radialer Gliazellen (Hartfuss et al. 2003). Dies ist eine hervorragende Ausbeute eines spezifischen Differenzierungsverfahren ohne Vorselektion. Auch dies ist ein entscheidender Faktor im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung, bei einer Übertragung auf das humane System. Durch verminderte Proliferation und Absterben von neuronalen Zellen verschlechterte sich das Verhältnis im weiteren Verlauf. Zellen mit der Morphologie epithelialer Zellen (Keratinocyten) (Abb. 3.13), die ebenfalls durch RA induziert werden, wiesen, wie zu erwarten, eine wesentlich höhere Proliferationsrate auf.

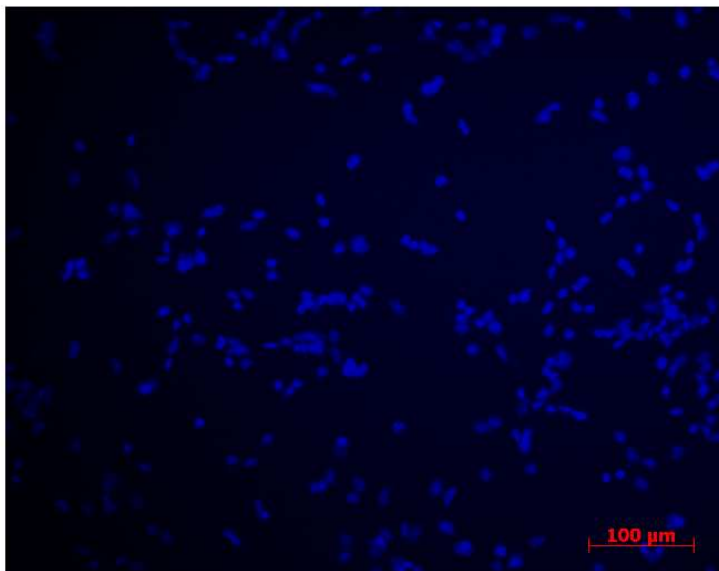
Das verwendete Protokoll zeigt die Eignung des *drop array* Systems für eine effiziente Induktion der neuronalen Differenzierung durch hohe RA-Konzentrationen. Die Reinheit und Homogenität der generierten neuronalen Vorläufer kann durch Selektionsmassnahmen und Nutzung überlebensfördernder Faktoren verbessert werden.

Abb.3.12 Immuncytologischer Nachweis RC2 positiver Zellen 18h nach Ausplattierung in serumfreiem Medium

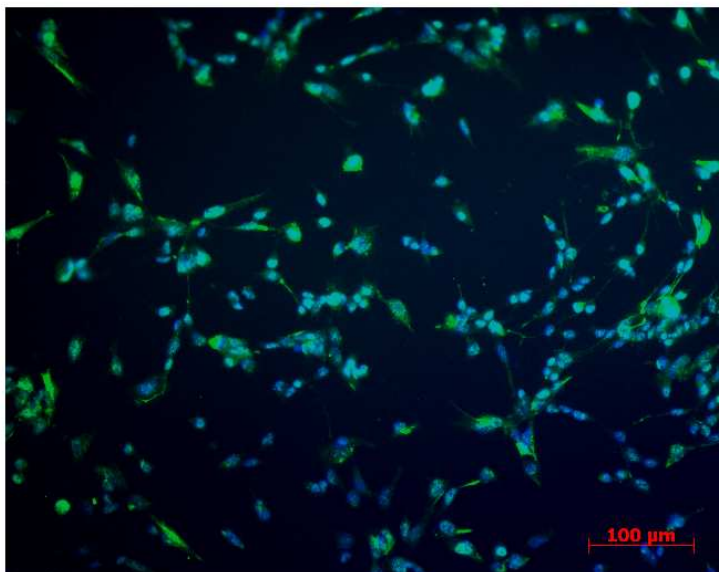
Zur Bestimmung der Effizienz der RA-induzierten neuronalen Induktion wurden Zellen, die positiv für den radialen Marker RC2 sind, immuncytologisch bestimmt. Dafür wurden RC2 positive Zellen mit den Gesamtzellen, deren Nuklei DAPI gefärbt wurden, übereinandergelegt (Merged) und ausgezählt.



RC2



DAPI



Merged

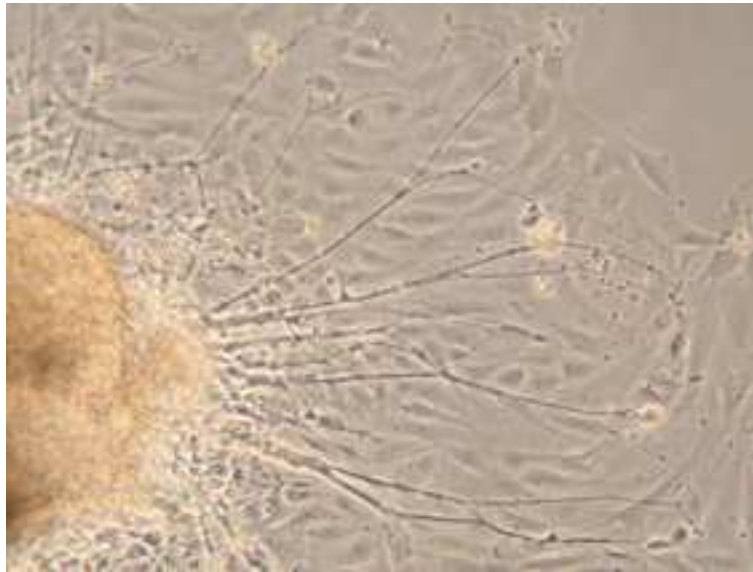


Abb. 3.13: Phasenkontrastaufnahme eines RA behandelten adhärennten unverdauten EBs

Die Aufnahme zeigt einen EB, der 4 Tage mit $1\mu\text{M}$ RA behandelt und nach der Ernte 3 Tage in serumfreier Kultur gehalten wurde. Nach der Adhäsion des EBs auf beschichteten Deckgläsern, wachsen Neuronen und Zellen mit der Morphologie von Epithelzellen aus dem EB-Gewebeverband aus.

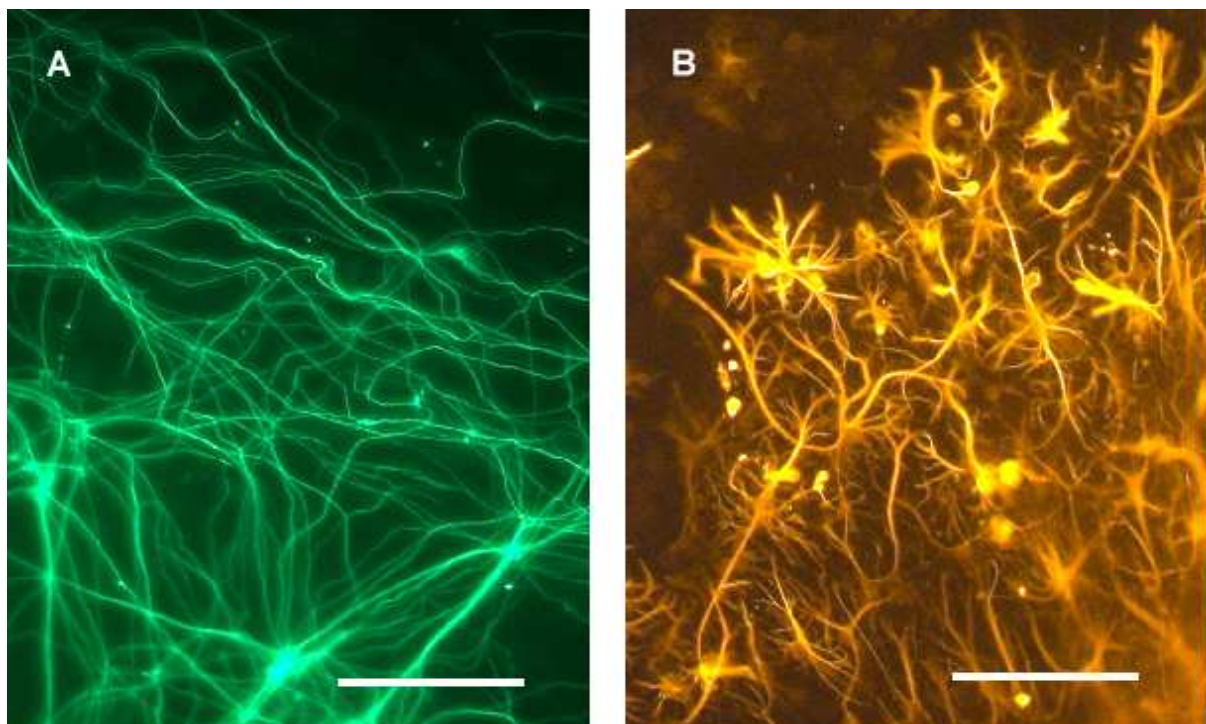


Abb.3.14: Immuncytologischer Nachweis von β -Tubulin III positiven differenzierten Neuronen und GFAP positiven Astrocyten

Verknüpfte differenzierten β -Tubulin III positive Neurone (A) konnten bereits 48h nach dem Ausplattieren nachgewiesen werden. Nach weiteren 5Tagen konnten neben differenzierten Neuronen zusätzlich differenzierte Astrocyten (B) detektiert werden (Messbalken = $125\mu\text{m}$).

3.4 Proteomanalyse der RA induzierten Differenzierung im Nukleus

Im vorangegangenen Abschnitt (Abschn. 3.3) wurde der konzentrations- und zeitabhängige Effekt von Retinoinsäure auf von ES-Zellen abgeleiteten *embryoid bodies* analysiert, insbesondere die Induktion der neuronalen Differenzierung. In diesem Abschnitt wird die Proteom-Analyse des nukleären Subproteoms dargestellt, bei der Faktoren identifiziert wurden, die während der Retinoinsäure-induzierten Differenzierung spezifisch reguliert werden.

Ziel war es Faktoren zu identifizieren, die als Marker das Differenzierungsgeschehen begleiten, oder die selbst Differenzierungsgeschehen steuern.

Durch eine Beschränkung auf das nukleäre Kompartiment wurde eine Reduzierung der Komplexität erreicht, die für eine Detektion von Faktoren in geringer Kopienzahl (*low abundant*) notwendig ist, da ihre Signale bei Gesamtzellanalysen, von Struktur- und Haushaltsproteinen (*high abundant*), wie z.B. Proteinen des Cytoskeletts, überlagert werden.

Die proteomische Analyse von zellulären Subkompartimenten, zur Detektion organellspezifischer Proteine, erfordert eine Vervielfachung an zellulären Probenmaterial. Der nukleäre Proteingehalt beträgt bis zu 20% des zellulären Gesamtproteingehalts. Mit der verwendeten Zellkernpräparation (Abschn. 2.10.11) konnte beispielsweise aus 1×10^8 Zellen (ca.10mg) etwa 2 mg Kernproteine isoliert werden. Im Vergleich zu Gesamtzellanalysen war daher eine Verfünffachung an zellulären Probenmaterial erforderlich. Ebenfalls ist für eine erfolgreiche Bearbeitung von proteomischen Aufgabenstellungen eine konstante Qualität der Proben essentiell. Die Verwendung von *drop arrays* ermöglicht eine Erzeugung homogener *embryoid bodies* in Massenkultur, die mit dem EB-Dokumentationssystem vor der Verwendung optisch geprüft werden konnten. Des Weiteren ermöglicht die verlängerte Kulturdauer von EBs durch das *drop array*-System, eine weiterführende Ausprägung von Differenzierungseffekten, wie im Abschnitt 3.3 gezeigt, und ist dadurch für die proteomische Analyse von zellulären Subkompartimenten, wie den Nukleus, hervorragend geeignet.

Wie in Abschnitt 3.3.1 gezeigt wurde, besitzen bereits geringe Retinoinsäure-Konzentrationen einen Effekt auf die EB-Entwicklung, so ist die Grösse von *embryoid bodies* bereits bei Konzentrationen von 1nM RA reduziert (Abb. 3.11) und die mesodermale Differenzierung, (Abb. 3.12) sowie die vom mesodermalen Keimblatt ausgehende hämatopoetische Differenzierung, darunter die Ausbildung von Blutinseln, inhibiert.

Für die proteomische Analyse wurde eine Konzentration von 10 nM RA gewählt, weil sie bereits einen deutlichen Effekt auf die Differenzierung von ES-Zellen in *embryoid bodies* aufweist, aber das Wachstumsgeschehen nicht zu stark beeinflusst.

Die mesodermale Differenzierung ist, wie im Abschnitt 3.3.2 am Beispiel von Brachyury (Abb. 3.12) gezeigt, durch diese Konzentration weitestgehend inhibiert und die Größe von *embryoid bodies*, die mit 10 nM Retinoinsäure behandelt wurden, um bis zu 1/3 reduziert (Abschn. 3.3.1). Dadurch war eine grössere Anzahl an RA-behandelten *embryoid bodies* für eine Kernpräparation erforderlich. Aus diesen Gründen wurden für einen Ansatz der quantitativen Analyse, 40 *drop arrays* für unbehandelte Kontrollen und 60 *drop arrays* für *embryoid bodies* die mit 10 nM RA behandelt wurden, verwendet.

3.4.1 Isolierung von Zellkernen aus ES-Zellen

Zur Isolierung von Zellkernen aus in *embryoid bodies* differenzierten ES-Zellderivaten wurde ein in der Arbeitsgruppe entwickeltes Protokoll (Kammer, unveröffentlicht) verwendet und an eine Präparation großer Zellmengen (1×10^8 Zellen) adaptiert.

Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen wurden die differenzierungsinduzierten *embryoid bodies* geerntet, zu diesem Zeitpunkt war eine phänotypische Unterscheidung von *embryoid bodies*, die mit 10nM RA behandelt wurden, gegenüber unbehandelter Kontrollen, durch Ausbleiben der Bildung primitiver Erythrocyten, die embryonales Hämoglobin enthalten, möglich (Abb. 3.15).

Für eine Gewinnung von Zellkernen war eine vorherige Vereinzelung differenzierter ES-Zellen aus dem *embryoid body*-Gewebeverband mittels Trypsin-Behandlung (Abschn. 2.6.9) erforderlich. Dabei erschwerte eine ausgebildete extrazelluläre Matrix, besonders bei RA-behandelten *embryoid bodies*, die Hydrolyse der ECM-Proteine.

Die Gewinnung der Zellkerne erfolgte in einem leicht hypotonen Homogenisationspuffer (Abschn. 2.10.11), in dem die Zellmembran der vereinzelt Zellen durch Verwendung eines Potter-Homogenisators zerstört wird. Ursache dafür sind die wirkenden Zugkräfte im viskosen Homogenisationspuffer, die ein Zerreißen der Zellmembran verursachen. Das Homogenisat wird dann durch ein Saccharose-Kissen mit einer definierten Dichte zentrifugiert, wodurch ein gereinigtes Pellet aus Zellkernen sedimentiert wird. Die anderen zellulären Bestandteile sind im Überstand abgetrennt und können durch Absaugen leicht entfernt werden. Eine Übertragung des vorhandenen Präparationsprotokolls auf einen grösseren Massstab, ermöglichte eine Isolation von Zellkernen aus 1×10^8 Zellen pro Präparation (Abschn. 2.10.11).

**Abb. 3.15: EBs nach der Ernte**

EBs die für 7 Tage mit 10nM RA inkubiert wurden (rechts) weisen keine Rötung durch Blutinselbildung, wie die unbehandelte Kontrolle (links), auf.

Die Abbildung zeigt die Qualität der mit *drop arrays* erzeugten homogenen EBs, die nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen geerntet wurden. Dabei lassen sich EBs, die mit 10 nM RA behandelt wurden, von den unbehandelten EBs durch Fehlen einer ausgeprägten roten Färbung unterscheiden. Die rote Färbung der Kontrolle wird durch entwickelte Blutinsel ähnliche Strukturen verursacht, die primitive Erythrocyten mit embryonalem Hämoglobin enthalten. Die applizierte RA-Konzentration von 10 nM inhibiert die Synthese hämatopoetischer Strukturen durch eine Reduzierung der mesodermalen Differenzierung.

Da ebenfalls eine Reduktion der EB Grösse um bis zu 40% nachgewiesen wurde (Abschn. 3.3.1), wurden für einen Ansatz mit RA 60 *drop arrays* (5760 EBs) und für die unbehandelte Kontrolle 40 *drop arrays* (3840 EBs) verwendet.

3.4.2 Bedingungen für die 2D-Gel-Elektrophorese

Die proteomische Analyse nukleärer Proteine erfolgte mittels 2D-Gel-Elektrophorese, die das Auftrennen von Proteinen in komplexen Proteingemischen entsprechend ihres isoelektrischen Punktes und ihres Molekulargewichtes, sowie eine quantitative Bestimmung der relativen Proteinmenge divergierender Zustände zu einem gewählten Zeitpunkt ermöglicht.

Um optimale Bedingungen für die isoelektrische Fokussierung zu finden und die Wirksamkeit der Kernpräparation zu überprüfen, wurde zunächst eine 2D-Gel-Proteomanalyse mit geringen Proteinkonzentrationen im analytischen Maßstab durchgeführt und anschließend silbergefärbt (Abb. 3.16, Abschn 2.10.7).

Als Nachweis für die Wirksamkeit der Kernpräparation wurden 2D-Muster von Gesamtzelllysaten mit Kernlysaten verglichen, dabei wurden die bekannten Lagen der Proteinspots des cytoskelettalen α -Aktin als Marker herangezogen, die in Gelen der Kernpräparation fehlten, oder deutlich reduziert waren.

Zu Beginn der Analyse von Kernlysaten wurden *embryoid bodies* verwendet, die mit einer Konzentration von 1 nM RA inkubiert wurden. In Gelen dieser Kernlysate konnte ein Mitglied des RA-Signalweges, das aktivierte zelluläre RA-Bindeprotein CRABP1, das nach Bindung von RA in den Kern translokalisiert wird, massenspektrometrisch mit einem Reflex III-MALDI-TOF (Bruker Daltonic) (Tab. 3.1) im Kern nachgewiesen werden (Abb.3.16).

Für eine quantitative Analyse und zur verbesserten massenspektrometrischen Identifikation, wurde kolloidales Coomassie zum Visualisieren der Proteinspots verwendet, dessen Anwendung, durch eine im Vergleich zu einer Silberfärbung geringeren Sensitivität, eine grössere Proteinmenge pro Gel erforderte.

Die Verwendung hoher Proteinkonzentrationen verursachte ein Eintragen zusätzlich geladener Substanzen, die die Lage der Proteinspots negativ beeinflussten und zu horizontalen und vertikalen Streifenbildungen beitrugen.

Der Zellkern beinhaltet vor allem negativ geladene DNA und die für die Anordnung der DNA im Chromatin verantwortlichen alkalischen Histone (ca. 80% des Proteingehaltes im Kern), die ebenfalls an der Steuerung der Genexpression involviert sind. Zur Identifizierung von RA-abhängigen Differenzierungsfaktoren wurden Histone durch Konzentration auf den physiologischen Hauptbereich zellulärer Proteine, zwischen pH 4 und pH 7, weitestgehend ausgeschlossen. Desweiteren wurde angestrebt, die DNA zu entfernen, ohne aber DNA-interagierende Faktoren zu verlieren. Dies gelang durch Einsatz einer DNase (Benzonase)

und einer mit Methanol kombinierten Aceton-Präzipitation (Abschn. 2.10.12), die eine Abtrennung von Salzen ermöglicht.

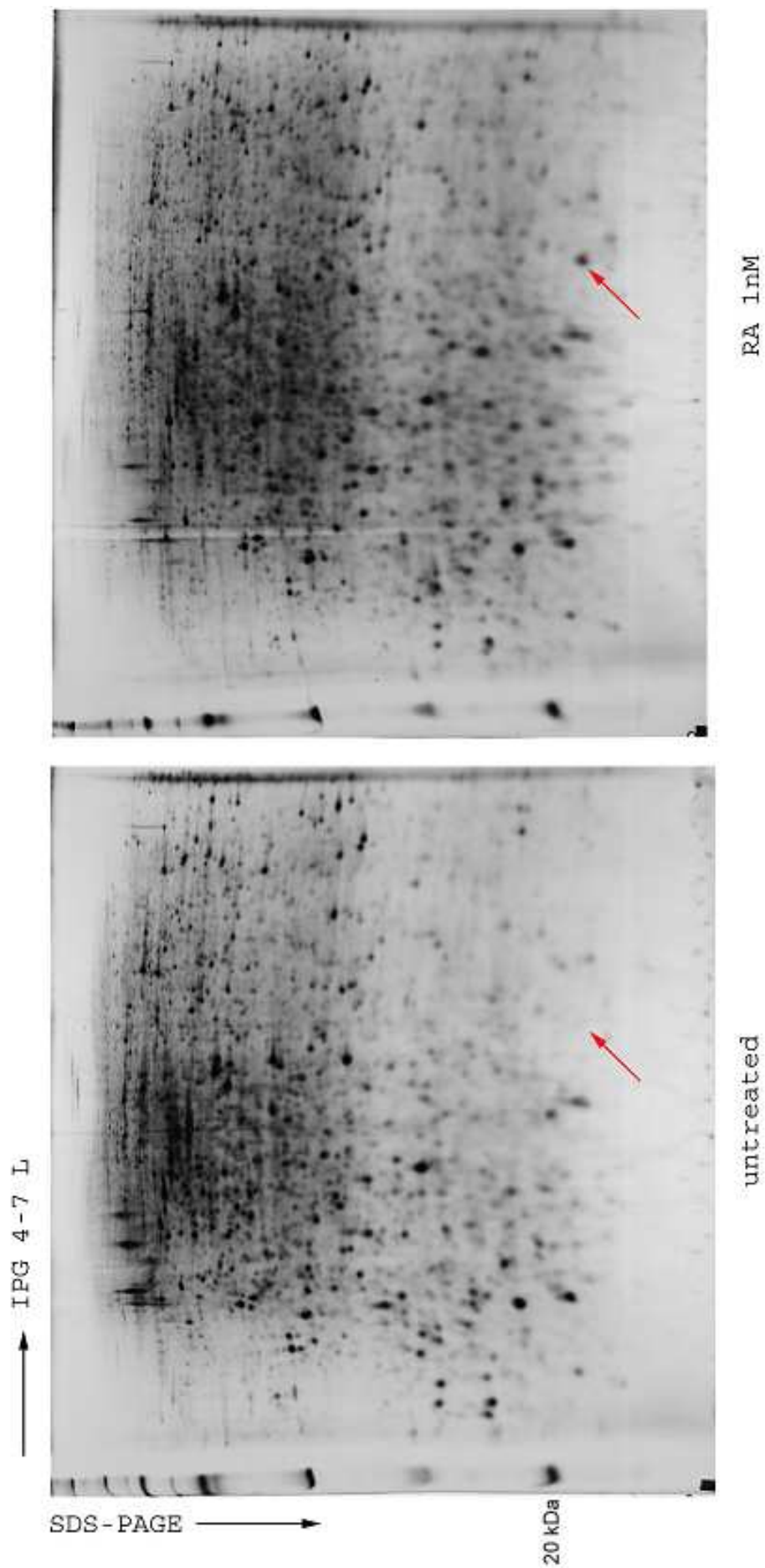
Observiert	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Peptide
9.605,614	9.595,541	9.595,222	0.0319	0	K.ALGVNAMLK + Oxidation (M)
11.135,468	11.125,396	11.125,138	0.0258	0	R.QDGDQFYIK.T
11.816,005	11.805,932	11.805,611	0.0321	0	R.SSENFDELLK.A
14.478,948	14.468,875	14.468,306	0.0569	0	K.VAVAAASKPHVEIR.Q

Tabelle 3.1: Peptidmassen des detektierten Proteins CRABP1

Darstellung der observierten Massen und der daraus resultierenden Peptide der MALDI-massenspektrometrischen Identifikation, des Proteinspots der in analytischen sibergefärbten Kerngele von Proben mit 1 nM RA-Behandlung detektiert wurde.

Abb.3.16: Repräsentative Gele einer Kernpräparation im analytischen Maßstab, sibergefärbt, Identifikation von aktiviertem CRABP1 im Nukleus

CRABP1 hat eine nominelle Masse von 15.6 kDa und einen theoretischen pI von 5.46. Es wurden 50 µg Kernlysate und ein linearer pH-Gradient von 4-7 verwendet.



3.4.3 Experimentelle Durchführung

Nach der Optimierung der experimentellen Bedingungen wurde die Analyse RA-regulierter nukleärer Proteine wie folgt durchgeführt:

Zur Erzeugung von *embryoid bodies* wurden ES-Zellen unter Verwendung des hängenden Tropfen-Systems (*drop arrays*) inkubiert, dabei enthielt ein Ansatz 10 nM RA, der andere blieb unbehandelt. Nach einer Inkubation von 7 Tagen erfolgte die Ernte und die Vereinzelung der differenzierten Zellen aus dem EB-Gewebeverband mittels Trypsinbehandlung. Aus den vereinzelt Zellen, pro experimentellen Ansatz jeweils 1×10^8 , wurden Kerne mit der beschriebenen Kernpräparationsmethode (Abschn. 2.10.11) isoliert, die bei -20°C gelagert werden konnten. Am Beginn einer Proteomanalyse wurden jeweils Zellkerne von vier unabhängigen Ansätzen parallel in 9 M Harnstoff lysiert und die DNA der Proben mit einer DNase (Benzonase, Merck), die einige Minuten in 9M Harnstoff aktiv ist, degradiert. Anschliessend wurden die im Harnstoff gelösten Kernproteine mit einer Aceton/Methanol-Fällung (Abschn. 2.10.12) präzipitiert, um geladene Substanzen, wie z.B. Salze, die die Fokussierung negativ beeinflussen können, abzutrennen. Nach einem Waschschriff mit 80%-igem Aceton wurden die Kernproteinpellets in Lysepuffer (Abschn. 2.10.1) gelöst.

Für die erste Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (Abschn. 2.10.4), wurden jeweils 2 mg Kernproteinlysate für eine passive Rehydratisierung von IPG-Streifen (Sigma) eines linearen Gradienten im pH-Bereich von 4-7 verwendet. Während der isoelektrischen Fokussierung mit dem Immobiline-Dry-Strip-System (Amersham) erfolgte ein Auftrennen der Proteine durch einen stufenweisen Spannungsgradienten nach dem in Tabelle 2.12 aufgeführten Schema, entsprechend ihres isoelektrischen Punktes. Der nachfolgenden zweiten Dimension ging ein Equilibrierschritt voraus, bei dem die Proteine in den IPG-Streifen zunächst durch DTT reduziert und anschliessend alkyliert wurden (Abschn. 2.10.5). In der zweiten Dimension erfolgte eine Auftrennung der Proteine aus dem IPG-Streifen, entsprechend ihrer molekularen Masse, in 15% Polyacrylamid-Gelen (Abschn. 2.10.6). Zur Visualisierung der Proteine im 2D-Polyacrylamid-Gel, wurden diese für mindestens 24h in kolloidalem Coomassie (Abschn. 2.10.1) geschwenkt, bei dem sich das hydrophobe Coomassie an die Proteine im Gel anlagert.

Nach dem Entfärben zeigten bereits erste visuelle Vergleiche eine erhöhte Spotzahl, in den Gelen von Proben mit RA-Behandlung, besonders im niedermolekularem Bereich (Abb.3.17). Dies war ein erster Hinweis für die Förderung proteolytischer Prozesse während einer RA-Behandlung.

Die Detektion von Proteinspots und die statistische Auswertung der eingescannten Gelbilder erfolgte mit der 2D-Gel-Analyse-Software PDQuest (Biorad), die jedem detektierten Spot eine Nummer (SSP= SingelSpot) zuordnet.

Zur statistischen Auswertung wurde eine Boolean-Analyse verwendet, sie beinhaltet eine Kombination aus quantitativer und statistischer Auswertung. Das Kriterium zur Identifikation von differentiell synthetisierten Proteinen war eine mindestens 3-fache Regulierung mit einer Signifikanz von 95% ($p= 0,05$).

Die softwaregestützte Detektion identifizierte 64 differentielle Proteinspots (Abb.3.18), davon waren 38 Proteinspots durch RA-Einfluss nieder- und 26 hochreguliert. Eine graphische Darstellung der relativen Spotintensitäten der detektierten differentiellen Spots zeigt Abbildung 3.19, eine Tabelle mit den relativen Intensitäten (Messwerten) befindet sich im Anhang A. Die differentiellen Proteinspots wurden mit einem Spotpicker (ExQuest, Biorad) ausgeschnitten und anschließend mit einem tryptischen, sogenannten „In-Gel-Verdau-Verfahren“ verdaut (Tab.2.15). Die aus dem proteolytischen Verdau resultierenden Peptide wurden mittels Dionex LC Packing HPLC System aufgetrennt und mit einem high-performance quadrupole TOF (QqTOF) Massen-Spektrometer (Qstar Pulsar I, Applied Biosystems) im ESI-MS/MS-Verfahren detektiert (Abschn. 2.11.2). Die erhaltenen Peptide-Massen-Daten wurden zur Identifikation der Proteine mit der Mascot-Suchmaschine unter Verwendung der NCBI-Datenbank ausgewertet.

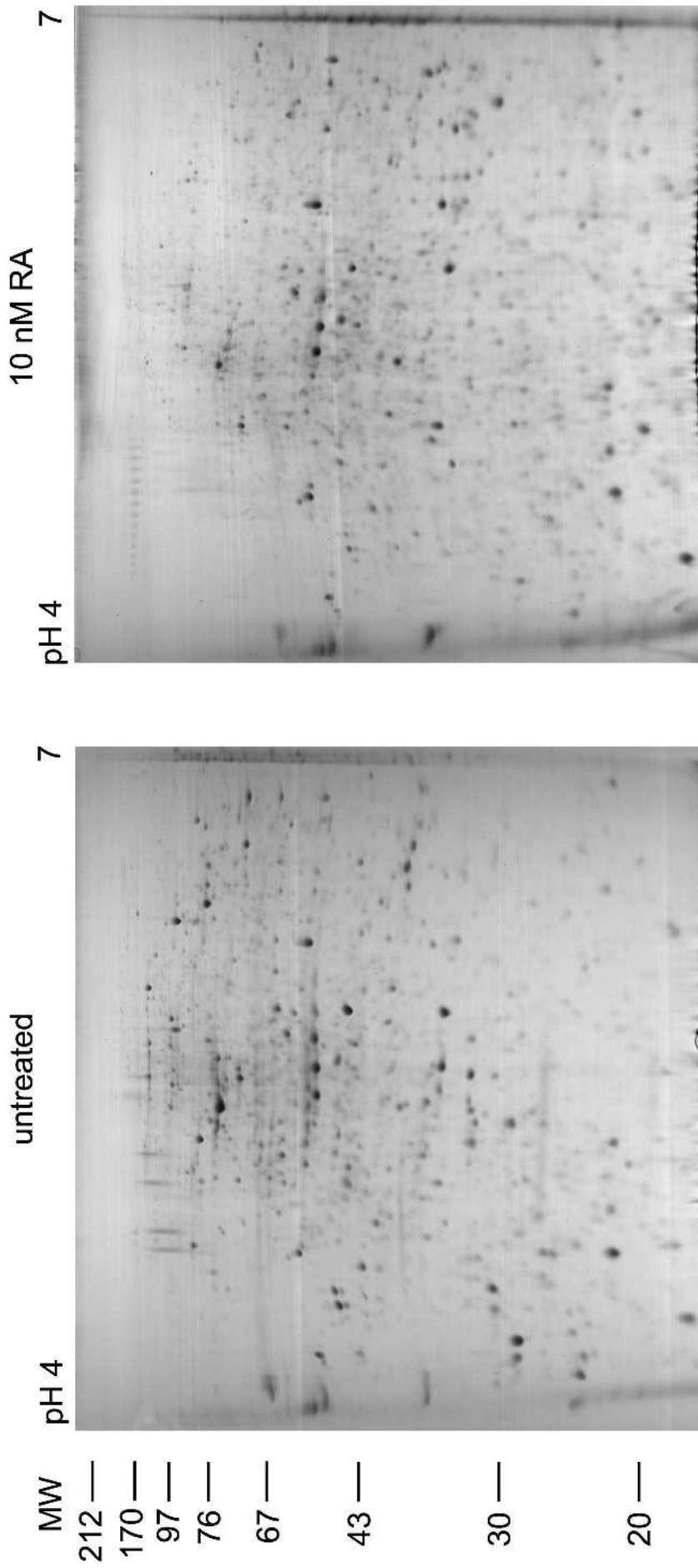
Dabei konnten 62 von 64 differentiell regulierten Proteinspots signifikant ($p= 0,05$) identifiziert werden. Die vollständige Liste der identifizierten Proteine befindet sich im Anhang B.

Abb. 3.17 Repräsentative Gele einer Kernpräparation im präparativen Maßstab (kolloidale Coomassie-Färbung)

Die Abbildung zeigt repräsentative 2D-Gele (2D-PAGE) der nukleären Proteomanalyse im präparativen Maßstab. Dafür wurde jeweils 2mg Kernlysate von vereinzelt Zellen aus EBs, die 7 Tage an *drop arrays* inkubiert wurden, verwendet. Für die erste Dimension (isoelektrische Fokussierung), die der zweiten Dimension vorrangig war, wurden IPG-Streifen mit einem linearen Gradienten im pH-Bereich von 4-7 verwendet.

Zur Visualisierung wurden die Gele 48h in kolloidalem Coomassie geschwenkt und anschließend über mehrere Waschstufen mit Wasser entfärbt.

Die reproduzierbaren Gele weisen durch die angewandten optimierten Methoden scharfe Proteinspots ohne Störungen auf. Auch hier zeigen die Gele der mit RA behandelten Proben eine erhöhte Spotzahl im niedermolekularen Bereich (≤ 30 kDa) auf.



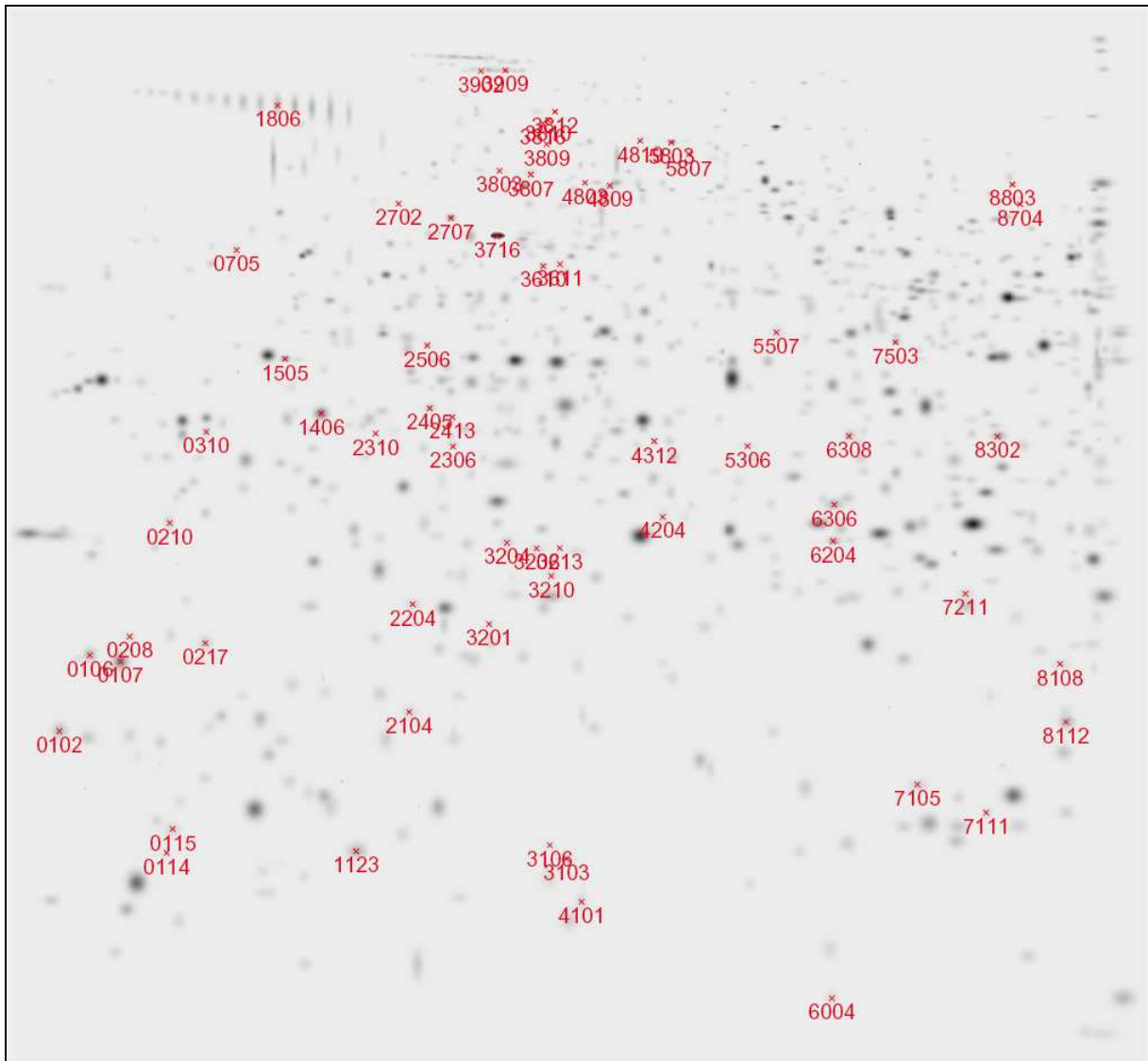
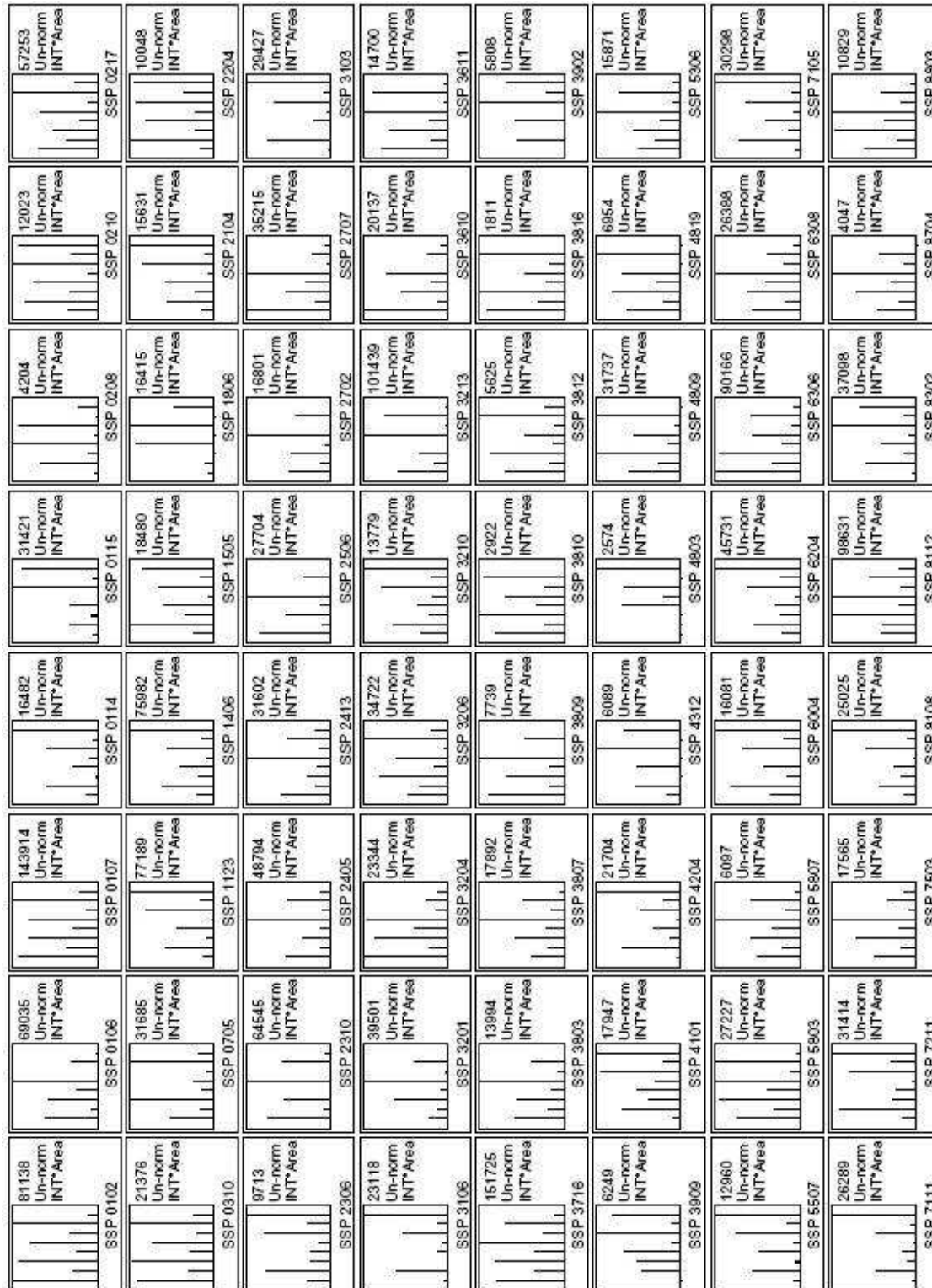


Abb. 3.18 Lage der als reguliert detektierten Protein-Spots

Die Abbildung zeigt ein durch die 2D-Software PDQuest (Biorad) erzeugtes „Mastergel“. Es zeigt die detektierten, mindestens 3-fach regulierten Proteinspots, sowohl der unbehandelten Kontrollen, als auch der mit RA-behandelten Proben. Eine graphische Darstellung der detektierten Spotintensitäten ist in der Abbildung 3.19 ersichtlich.

Abb. 3.19: Graphische Darstellung der relativen Spot-Intensitäten der regulierten 64 Proteinspots (SSP), die mit der 2D-Software PD-Quest detektiert wurden.

Reihenfolge der Peaks in jedem Histogramm: Probe 1: -/+ RA, Probe 2: -/+ RA, Probe 3: -/+ RA, Probe 4: -/+ RA.



3.4.4 Auswertung der massenspektrometrisch identifizierten Proteine

3.4.4.1 Zuordnung zu zellulären Kompartimenten

Die gewonnenen Daten der massenspektrometrischen Identifikation differentieller Proteinspots aus nukleären Extrakten wurden zum besseren Verständnis und zur Übersichtlichkeit anhand von Datenbankeinträgen (NCBI, ExPasy) zellulären Kompartimenten zugeordnet (Tab.3.2. und Abb. 3.20). Mögliche Transportvorgänge zwischen den Kompartimenten wurden dabei zunächst nicht berücksichtigt.

Neben 34 nukleären Proteinen wurden 28 Proteine anderer zellulärer Kompartimente identifiziert. In diesem Abschnitt werden zunächst die identifizierten Proteine der angrenzenden zellulären Kompartimente behandelt, eine Beschreibung der nukleären Proteine erfolgt im nächsten Abschnitt (Abschn. 3.4.4.2).

Die spezifische Selektivität der Kernpräparation ist aus der Aufreinigung weniger mitochondrialer Proteine (3%) ersichtlich. Dieses ebenfalls membranumgebene Organell wurde während der Kernpräparation fast vollständig abgetrennt. Zu den mitochondrialen Proteinen in den RA-Proben gehört eine ATP-Synthase, in den Kontrollen sind Vorläufer mitochondrialer Stressproteine identifiziert worden.

Die Aufreinigung von Proteinen weiterer zellulärer Kompartimente konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dies wurde einerseits durch Verknüpfung dieser Kompartimente mit der Kernmembran, wie Proteinen des endoplasmatischen Reticulum (ER) und des Cytoskeletts, andererseits durch Prozesse die an der äusseren Kernmembran und dem anliegenden ER stattfinden, wie z.B. Prozesse der Translation, der Proteinfaltung und des Proteintransportes, verursacht.

In den Kontrollen wurden Proteine identifiziert, die im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert sind, dazu gehören Isoformen des *Ribosomale Binding Proteins 1*, Rezeptoren die das Binden von Ribosomen am ER vermitteln, sowie Reticulocalbin, dass calciumabhängige Aktivitäten reguliert (Ozawa 1995). Eine differenzierungsabhängige Expression von Reticulocalbin konnte bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (Wilhelm 2004) nachgewiesen werden, seine Synthese ist durch eine RA-Behandlung reduziert.

Kompartiment	SSP	Kontrolle	SSP	10nM RA
Nukleus	106	Nucleophosmin Variante	114	hnRP D-like
	107	Nucleophosmin Variante	5507	hnRP K isoform a
	3803	hnRP K isoform a	7105	hnRP K isoform a
	3807	hnRP K isoform a	1018	Nucleophosmin Variante
	6711	hnRP H1	1123	Nucleolin Fragment
	2707	hnRP K isoform a	2104	Histone h2b
	3204	Modifier 2	2204	Nucleophosmin 1
	2310	Nucleophosmin 1	3106	p68 RNA Helicase Fragment
	217	Nucleophosmin 1	4101	MutS homolog 2 Fragment
	3206	Nucleophosmin 1	4204	non-POU-domain-containing, octamer binding protein
	3213	Nucleophosmin 1	6004	ribosomal Protein S6
	4815	Nucleophosmin 1	7211	Lamin A, isoform A
	3716	Arginine/Serine-Rich Splicing Factor 6	8108	TIS [Mus musculus]
	3809	Lamin B	2003	PTX1 protein isoform
	3810	Lamin B	8302	PTX isoform
	5306	Splicing Factor, Arginine/Serine Rich 9		
	8803	Paraspeckle protein 1		
	8112	PTX1 protein isoform 1		
	8112	PTX1 protein isoform 1		
ER	705	Reticulocalbin 3		
	3812	Ribosome-binding protein 1		
	3816	Ribosome-binding protein 1		
Cytoskelett	102	non-muscle Myosin light Chain 3	1806	Keratin 2 Epidermis
	3610	gamma-Actin		
	3611	gamma-Actin		
	8704	Keratin complex 1, acidic, Gene 17		
2413	Keratin, type I cytoskeletal 10			
HSP	4809	Heat Shock Protein 65	208	HSP 90-beta Fragment
			1406	HSP70
			1505	Heat Shock 70 Protein
Cytoplasma	6308	Proteasome subunit MC14	2306	Cad protein Fragment
	4819	Tripeptidyl-Peptidase II	210	Proteasome 26S ATPase subunit 5
	6306	Peroxiredoxin 3	7111	Eukaryotic translation elongation Factor 2
	310	Elongation Factor 1-beta homolog		
2506	Eukaryotic Translation Elongation Factor 1- delta			
Membran	7503	Stomatin-like protein 2	3210	Fodrin alpha chain - mouse
ECM			115	Laminin B2
			3103	Nidogen 1 Fragment
Mitochondrium	5803	Stress-70 protein, mitochondrial precursor	4312	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A
	5807	Stress-70 protein, mitochondrial precursor		

Tabelle 3.2: Einordnung der massenspektrometrisch identifizierten Proteine entsprechend ihres zellulären Kompartimentes

Cytoskelettale Proteine, die mit der Kernmembran assoziiert sein können, sind γ -Actin, nicht muskuläres Myosin (leichte Kette) und Keratine, darunter epidermales Keratin in den RA behandelten Proben. Eine verstärkte Expression von Keratinen wurde bereits bei Proteomanalysen der RA-induzierten neuronalen Differenzierung beobachtet (Guo et al. 2001), des weiteren ist eine Beteiligung von Retinoiden an der Entwicklung von epithelialen Zellen (Keratinocyten) bekannt

Mit dem Cytoskelett verbunden sind Membranproteine, wie Fodrin (α -Kette), das Actin bindet, sowie das Integral-Protein Stomatin.

Unter den cytoplasmatischen Proteinen sind in beiden Zuständen Elongationsfaktoren zu finden, die wichtige Funktionen bei der Translation übernehmen und bei der Synthese von Membranproteinen am Übergang zum ER lokalisiert sind.

Zu den identifizierten cytoplasmatischen Enzymen in den Kontrollen gehört eine Serin-Protease (Tripeptidyl-peptidase II), sowie ein Enzym, dass an der Redoxregulation der Zelle beteiligt ist (Peroxiredoxin), in beiden Bedingungen sind Proteasomuntereinheiten detektiert worden, die eine entscheidende Rolle bei der Proteindegradation spielen.

Heatshock Proteine mit Chaperon-Funktion sind wichtig für Faltung und Aufrechterhaltung der Struktur bei Stress und Transportvorgängen vom Cytoplasma in den Nukleus (HSP70 Proteinsynthese, HSP 65: Faltung neuer Proteine). Eine weitere Funktion übt HSP 90 durch eine Interaktion mit TP53/p53 (*Tumor Specific Antigen*) aus und ist damit an der Regulation von Proliferation und Apoptose beteiligt, es liegt in den RA-Behandelten Proben als Fragment vor.

In den mit RA behandelten Proben sind 2 Proteine der extrazellulären Matrix zu finden, eine verstärkte Ausprägung der ECM konnte bereits beim tryptischen Vereinzeln der EBs beobachtet werden. Dabei beeinflusst RA die Synthese des ECM-Proteins Laminin direkt durch RA-Response Elemente (RARE) im Laminin-Promotor (Vasios et al. 1989).

Das in den Gelen von RA-behandelten Proben detektierte cytoplasmatische Cad-Protein, dessen phosphorylierte Form im Nukleus nachgewiesen wurde (Sigoillot et al. 2005), ist an der Arginin-Synthese während des Harnstoff-Zyklus im Mitochondrium, sowie an der Pyrimidin Synthese beteiligt. Es ist darüberhinaus involviert an der Regulation des Zellwachstums, sowie an apoptotischen Prozessen.

Neben dem CAD-Protein wurden weitere hier aufgeführte Proteine, wie verschiedene HSP-Formen und Proteasomen-Untereinheiten, durch regulatorische Prozesse in den Zellkern translokalisiert und nachgewiesen.

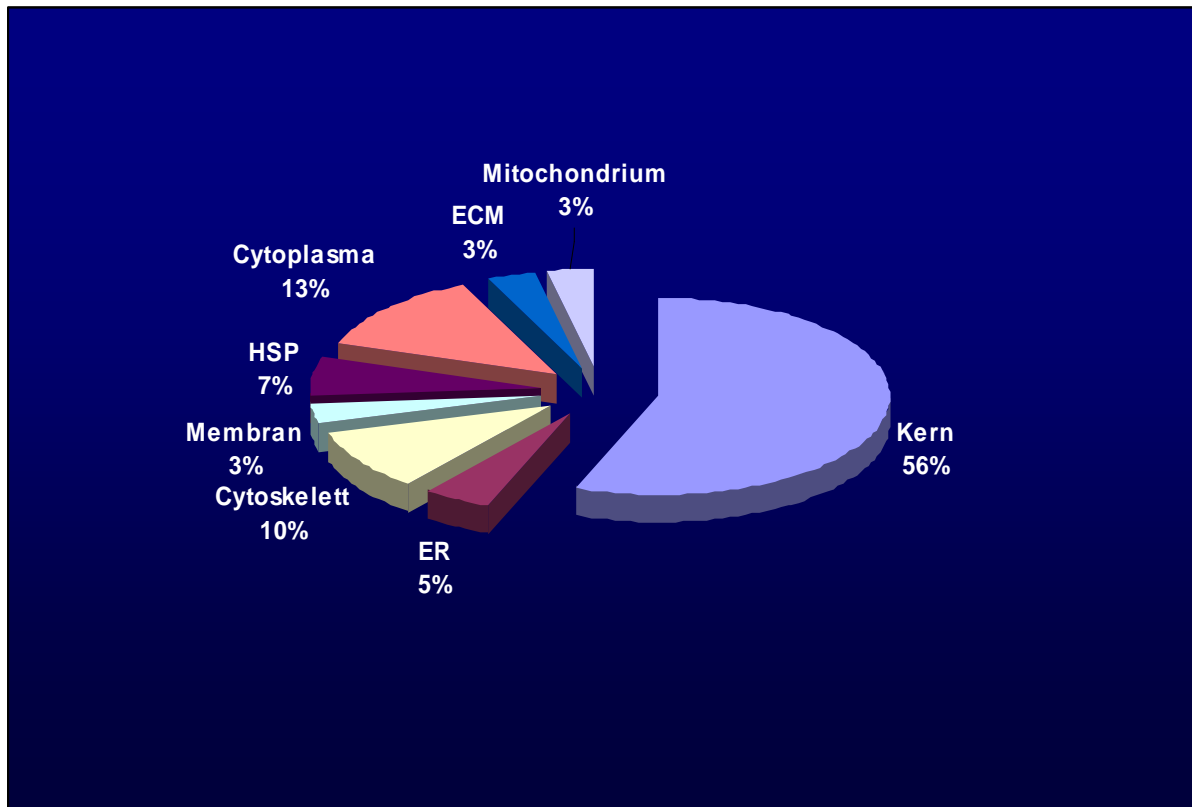


Abb. 3.20: Grafische Darstellung der zellulären Verteilung der identifizierten Proteine
 Einordnung zu zellulären Kompartimenten erfolgt entsprechend ihrer Datenbankeinträge
 (NCBI, Expassy)

3.4.4.2 Funktionelle Zuordnung der nukleären Proteine

Die identifizierten nukleären Proteine konnten entsprechend ihrer konservierten Proteindomänen, die funktionelle Rückschlüsse ermöglichen, näher klassifiziert werden. Zur Darstellung des Verhältnisses zwischen Kontrolle und RA-behandelten Proben werden die ermittelten Faktoren in Klammern angegeben (Faktoren > 1 verstärkt durch RA-Einfluss, Faktoren < 1 durch RA-Einfluss inhibiert).

Die Funktion der in beiden Zuständen identifizierten PTX Proteine ist nicht bekannt, sie verfügen über eine Homeodomäne und wurden im Nukleus lokalisiert (Crawford et al. 1997; Kwok et al. 2001), es wird aber auch eine Funktion beim Übergang vom ER zum Golgi diskutiert.

Der grösste Anteil der nukleären Proteine besitzt RNA-Erkennungssequenzen (RRM, RNA *recognition motif*) und ist an der Prozessierung von RNA beteiligt. Darunter verschiedene Isoformen heterogener nukleärer ribosomaler Proteine (hnRPs, *heterogenous nuclear Ribosomal Protein*), die Komplexe mit mRNA bilden und auch am Transport von mRNA aus dem Nukleus mitwirken. Einige hnRP-Isoformen agieren als transkriptionelle Regulatoren, so unterstützt die D-like Isoform (Faktor 8.58) eine Aktivierung der Transkription in differenzierten Myotuben (Boopathi et al. 2004), die K-Isoform (in beiden Zuständen) ist ein Transkriptionsfaktor, der an den myc-Promotor bindet (Takimoto et al. 1993).

Weitere Faktoren mit Beteiligung an der mRNA-Prozessierung sind *Splicing*-Faktoren (Faktor 0.26 und 0.32), sowie die RNA-Helicase p68 (Faktor 10.44) mit Helicase-Domäne (DEAD-Box-Domäne) und ATPase-Aktivität. Die detektierte p68 RNA-Helicase liegt in den Gelen als degradiertes Fragment vor, zusätzlich besitzt es eine Funktion bei der Regulation der Transkription, so ist es ein Co-Aktivator von p53 (Bates et al. 2005).

Weitere am Spleissen beteiligte Proteine sind *Paraspeckle* (Faktor 0.28) und NONO (*non-POU-Domain-containing, Octamer Binding Protein*) (Faktor 5.67), die während der RNA-Prozessierung miteinander heterodimere Komplexe bilden und ihre Funktion über eine DBHS- (*Drosophila Behavior, Human Splicing*) Domäne ausüben.

TIS (Topoisomerase-inhibitor Suppressed) oder auch *Programmed Cell Death Protein 4* (Faktor 4.99), das in den Gelen von RA-behandelten Proben verstärkt detektiert wurde, besitzt ebenfalls RNA-Erkennungssequenzen. Es ist ein Tumorsuppressor-Protein, das die Aktivität des Elongationsfaktors Elf4 inhibiert und ist möglicherweise an apoptotischen Prozessen beteiligt (Yang et al. 2003).

Als zweite funktionelle Gruppe sind DNA-bindende und -modifizierende Proteine identifiziert worden, wie Modifier (Faktor 0.13) beteiligt an der Chromatinorganisation, sowie die als Fragment detektierte DNA *mismatch* ATPase Muts (Faktor 3.22).

Durch die angestrebte Reduzierung der Histon-Proteine wurde lediglich ein Histon (Faktor 5.6) mit H2B Domäne als reguliert detektiert. Die Synthese der ribosomalen Proteine, wie die des detektierten ribosomalen Proteins S6 (Faktor 3.3), erfolgt im Nucleolus.

Es konnte ein Wechsel der Filamente der Kernlamina von Lamin B (Faktor 0.22 und 0.3) zu Lamin A (Faktor 3.84) nachgewiesen werden, der durch eine RA-Behandlung reguliert wird, dabei induziert RA die Lamin A-Synthese durch ein neues, sogenanntes Lamin-RA-Response Element (L-RARE) im Lamin A-Promotor (Okumura et al. 2000).

Des weiteren wurden zahlreiche Spots zweier Nucleophosmin-Isoformen, überwiegend in den Kontrollen identifiziert, die eine Nucleoplasmin-Domäne besitzen. Die beschriebenen

biochemischen Eigenschaften (pI, Molekulargewicht) entsprechen aber dem Spot 2310, dessen Lage in den Gelen, aller vier unabhängiger Proben in Abb. 3.19 dargestellt und dessen relative Intensitäten in Abb. 3.20 grafisch abgebildet sind. In den RA-behandelten Proben wurde ein Nucleolin-Fragment (Faktor 6.82) verstärkt detektiert werden (Abb. 3.19 und Abb. 3.20).

Sowohl Nucleolin, als auch Nucleophosmin sind an der ribosomalen Biogenese beteiligt.

Dabei spielt Nucleolin eine Rolle bei der Reifung von rRNA und dem Zusammenbau von Ribosomen (Srivastava und Pollard 1999). Eine weitere Funktion von Nucleolin ist eine Beteiligung an der Chromatin-Dekondensation durch eine Histon H1-Bindung.

Nucleophosmin ist am Spleißen von ribosomaler prä-rRNA (Savkur und Olson 1998) und an der Centrosom-Duplikation (Okuda 2002) beteiligt. Beide besitzen einen entscheidenden Einfluss auf Proliferation und Apoptose während Differenzierungsprozessen und wurden nachfolgend weiter untersucht (Abschn. 3.4.4.3 und Abschn. 3.4.4.4).

Funktion	Protein	Konservierte Domäne	
RNA-Bindung und Prozessierung	Paraspeckle Protein 1	2 x RRM DBHS	
	Nucleolin	4 x RRM	
	Non-POU-Domain-containing, Octamer Binding Protein	2x RRM DBHS	
	p68 RNA Helicase	DEAD c, Heli c, 2x P68 HR	
	hnRP K Isoform a	2x RRM	
	hnRP H1	2x RRM	
	hnRP D like	2x RRM	
	Tis: Topoisomerase Inhibitor Suppressed	2x RRM	
	Arginine/serine-rich splicing factor 6	2x RRM 1	
	Splicing factor, arginine/serine rich 9	2x RRM	
	Kernlamina	Lamin B	Filament, IF-tail
		Lamin A	Filament, IF-tail
		Modifier	Chromo, chsh
DNA-Bindung und Modifizierung	Muts: DNA mismatch repair ATPase	Muts	
	Nucleophosmin (9x)	Nucleoplasmin	
	Histone H2B	H2B	
	Translation	ribosomal Protein S6	ribosomal Protein S6e

Tab.3.3: Einordnung der identifizierten nukleären Proteine entsprechend ihrer Funktion und ihren konservierten Domänen, die Rückschlüsse auf die zelluläre Funktion ermöglichen

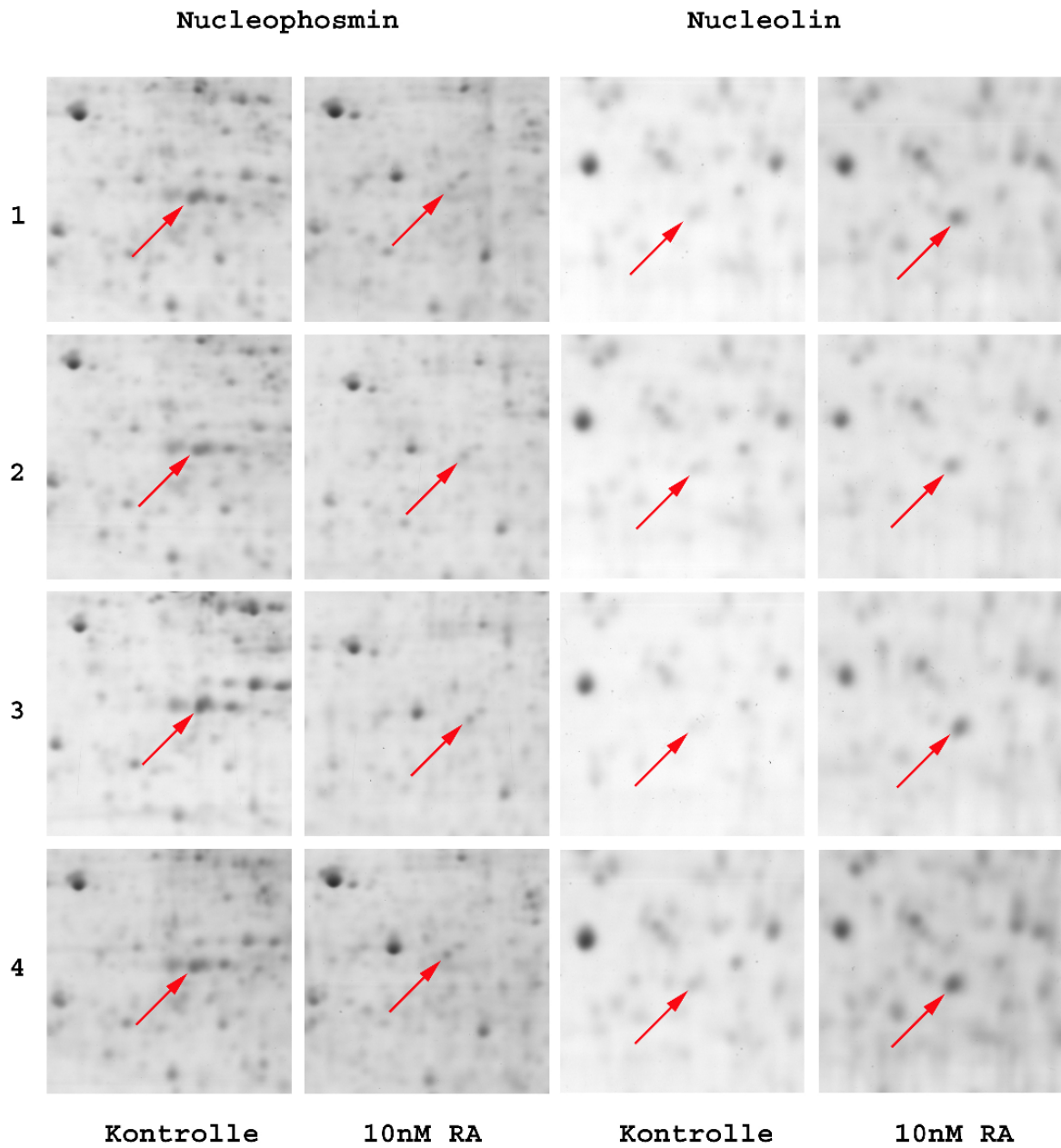


Abb. 3.19: Protein-Spots von Nucleophosmin und Nucleolin der nukleären Proteomanalyse von vier unabhängigen Proben unter Einfluss von 10nM Retinoinsäure.

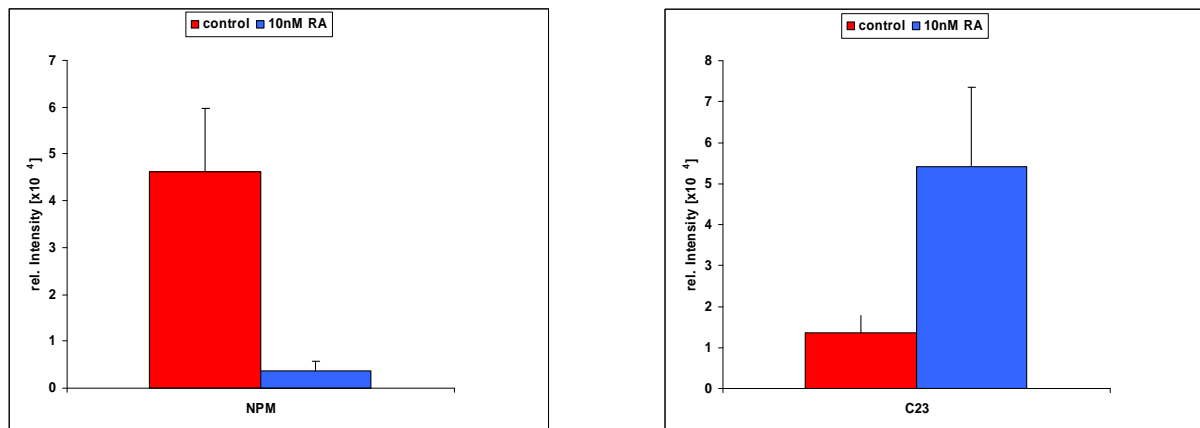


Abb.3.20: Grafische Darstellung der relativen Intensitäten von NPM und C23

Die Abbildung zeigt die mit der 2D-Software PDQuest gemessenen relativen Intensitäten (Graustufen) von Nucleophosmin (NPM, Spot 2310) und des Nucleolin- (C23) Fragmentes. NPM wird durch eine 10nM RA-Behandlung deutlich inhibiert. Das Fragment von C23 tritt durch eine RA-Behandlung verstärkt auf.

3.4.4.3 Analyse der nukleären Proteine: Nucleophosmin

In diesem Abschnitt werden die identifizierten Proteinspots des nukleären Proteins Nucleophosmin (NPM) näher analysiert, dessen nukleäre Lokalisation hauptsächlich in RA-behandelten EBs stark reduziert ist (Abb. 3.20) und dessen Peptide in multiplen Proteinspots identifiziert wurden.

Nucleophosmin ist ein multifunktionelles Protein, das einen nachgewiesenen Einfluss auf die Stammzellentwicklung, die embryonale Entwicklung (Grisendi et al. 2005), die Ribosomen-Biogenese (Savkur und Olson 1998), auf Proliferation und Apoptose (Zeller et al. 2001) sowie auf die Tumorprogression durch Bindung an p53 und Arf (Colombo et al. 2002; Bertwistle et al. 2004), besitzt.

Die nominelle Masse von Nucleophosmin beträgt 32.5 kDa, im SDS-Gel ist eine molekulare Masse von 37 kDa beschrieben, der isoelektrischen Punkt ist bei pH 4.62 kalkuliert.

Die Lokalisation des als Nucleophosmin detektierten Spots SSP 2310 (Spotnummer 2310) entspricht diesen biochemischen Eigenschaften. NPM ist in den mit RA behandelten Kerngelelen auf 1/13 der Vergleichsmengen reduziert. Die Nucleophosmin-Spots (SSP 2310) eines Analyse-Sets, bestehend aus 4 unabhängigen Proben, der nukleären Proteomanalyse, sind in Abbildung 3.19 dargestellt.

Die zusätzlich zu Spot 2310 detektierten Protein-Spots, in den Kontrollen (SSP 106, 107, 217, 3206, 3213, 4815), aber auch in Gelen von RA behandelten EBs (SSP 2204, 1018), enthielten

ebenfalls Peptide bzw. ein Peptid, die als Nucleophosmin identifiziert wurden. Dabei gehören die Spots 106,107, 1018, zu einer 24.9 kDa Variante mit einem theoretischen pI von 4,33.

Um die tatsächliche Lage von Nucleophosmin, seiner Isoformen und Derivate aufzuklären, wurde eine 2D-Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen Nucleophosmin, der sowohl phosphoryliertes, als auch unphosphoryliertes NPM erkennt, verwendet, der ein Epitop innerhalb der C-terminalen 68-Aminosäuren erkennt. Um etwaige präparative Schwankungen der Proteinmenge auszuschließen, wurden Gesamtzelllysate von EBs, die 7 Tage differenziert wurden und entweder unbehandelt (Kontrolle) oder mit 10 nM RA inkubiert wurden, verwendet. Für die 2D-Gelelektrophorese wurden jeweils 10 µg eines Gesamtzelllysates, unter Verwendung von 7cm IPG-Streifen mit einem linearen pH-Gradienten von 4-7 genutzt. Im Anschluss an die zweite Dimension wurden die Proteine in 15%igen Poly-Acrylamid-Minigelen auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion mit primärem Anti-Nucleophosmin-Antikörper und sekundären HRP-gekoppelten Antikörper (Abschn. 2.3) erfolgte mit Chemilumineszenz, wie in Abschnitt 2.9.4 beschrieben.

Auf den entwickelten Röntgenfilmen, des 2D-Western-Blots, konnten jeweils zwei nebeneinanderliegende Signale von positiven Proteinspots, bei 37 kDa detektiert werden (Abb. 3.22). Im Gegensatz zur deutlichen Reduktion im Zellkern während der Proteomanalyse, ist die Reduktion des zellulären Gesamtgehalts an Nucleophosmin nicht so stark ausgeprägt. Eine Beteiligung von Nucleophosmin an Transportvorgänge vom Nucleus ins Cytoplasma ist nachgewiesen und essentiell für seine Funktion (Borer et al. 1989).

Der geringe quantitative Unterschied von Nucleophosmin in Gesamtzelllysaten ist ein Hinweis auf eine Verschiebung im Proteom vom Kern ins Cytoplasma. Der Einfluss von RA könnte die nukleäre Menge von Nucleophosmin reduzieren, die zelluläre Gesamtmenge aber nicht wesentlich verringern.

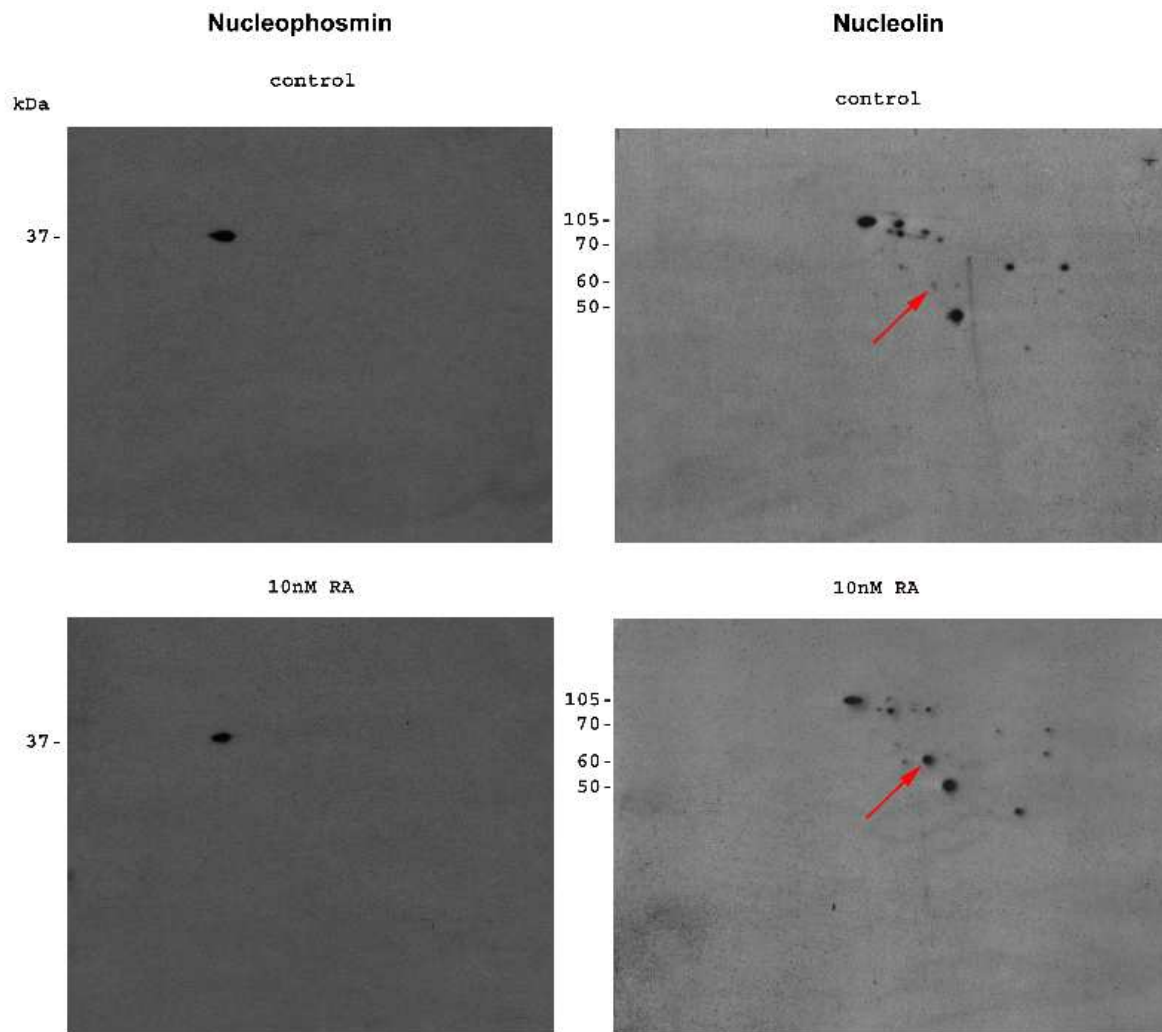


Abb.3.22: 2D-Westernblots gegen Nucleophosmin und Nucleolin

Zur spezifischen Detektion der massenspektrometrisch identifizierten nuklären Proteine Nucleophosmin und Nucleolin wurden Westernblots von 2D-Minigelen angefertigt. Dabei zeigt die Detektion zweier nebeneinanderliegender Spots, die Nucleophosmin positiv sind, eine leichte Reduzierung des Signals. Die Reduktion ist nicht so stark wie in 2D-Gelen von Kernextrakten ausgeprägt, ein Hinweis auf eine Verschiebung des Nucleophosmin-Proteinpools. Der Nachweis des anderen nuklären Phosphoproteins Nucleolin, zeigt die durch das 2D-Verfahren aufgetrennte Fragmente. Die Fragmentation ist in den Gelen von RA-behandelten Proben stärker ausgeprägt. Die autokatalytische Fragmentation ist vom Proliferationssatus der Zellen abhängig. Der antiproliferative Effekt von RA spiegelt sich hier durch eine höhere autokatalytische Aktivität des Nucleolin wider.

3.4.4.4 Analyse der nukleären Proteine: Nucleolin

Ein weiteres nukleäres Phosphoprotein ist Nucleolin, das ebenfalls multifunktionale Aufgaben übernimmt, wie eine Beteiligung an der Ribosomen-Biogenese (Jordan 1987), an Proliferation und Apoptose (Pasternack et al. 1991).

Im Kontrast zur nukleären Reduzierung von Nucleophosmin durch eine RA-Behandlung, konnte ein Nucleolin-Fragment bei ca. 20 kDa verstärkt (6,8-fach) beobachtet werden. Eine autokatalytische Funktion von Nucleolin wurde beschrieben (Lapeyre et al. 1987; Olson et al. 1990; Chen et al. 1991), dabei ist die Stabilität in nicht proliferierenden Zellen reduziert.

Hier sollte eine Anwendung des spezifischen 2D-Western-Blots das vollständige Protein, sowie weitere Derivate detektieren. Zur Detektion wurde der polyklonale Antikörper gegen Nucleolin genutzt, der die Aminosäuren 2-17 am C-Terminus erkennt. In proliferierenden Zellen beträgt die molekulare Größe von Nucleolin 105 kDa, eine autokatalytische Aktivität ist beschrieben (Fang und Yeh 1993), bei der Peptide in einer Größe von 70, 60 und 50 kDa entstehen. Mittels 2D-Westernblot konnten die Fragmente aufgetrennt werden (Abb.3.22), dabei tritt verstärkt ein Fragment bei 60 kDa auf, nicht jedoch das 20 kDa Fragment aus der Proteomanalyse, das vom Antikörper nicht detektiert wird.

Die Analyse zeigt, dass der antiproliferative Effekt von Retinoidsäure während der Differenzierung in *embryoid bodies* zur Destabilisierung von Nucleolin beiträgt.

Die nukleäre Proteomanalyse RA-abhängiger Differenzierungsfaktoren ermöglichte die Detektion RNA-prozessierender und DNA-modifizierender Proteine, sowie eines RA-abhängigen Wechsels der Kernlaminafilamente von Lamin B zu Lamin A. Vor allem ermöglichte die durchgeführte Proteomanalyse eine Detektion von Faktoren, die den antiproliferativen und proapoptotischen Effekt einer RA-Behandlung bestätigt, wie die verstärkte Synthese des Tumorsuppressor-Proteins TIS und die Degradation der RNA-Helicase p68. Ein RA-abhängiger Effekt auf die multifunktionalen nukleären Phosphoproteine Nucleolin und Nucleophosmin konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Zum einen ist die autokatalytische Aktivität von Nucleolin durch Inhibierung der Proliferation erhöht, zum anderen ist der Nucleophosmin-Pool im Nukleus reduziert. Die daraus resultierende Verminderung der Ribosomen-Biogenese, besitzt einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Proliferation.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden – durch *in vitro* Arbeiten - grundlegende Aspekte der Stammzellbiologie behandelt. Der inhaltliche Schwerpunkt lag auf dem Generieren von spezifischen Vorläuferzellen für potentielle Anwendungen in der regenerativen Medizin und Untersuchungen früher embryonaler Entwicklungsprozesse in Differenzierungsmodellen.

Zum einen wurden frühe hämatopoetische Entwicklungsprozesse am EB-Differenzierungsmodell analysiert, wie sie *in vivo* im extraembryonalen Dottersack bei der Blutinselbildung zu beobachten sind. Zum anderen wurden neuronale Vorläuferzellen mit potentiellen Regenerationsvermögen generiert. Eine proteomische Analyse ermöglichte die Detektion nukleärer Faktoren, die unter Einfluss des Morphogens Retinoinsäure reguliert werden. Dafür wurden vorhandene Analyse-Systeme genutzt und erweitert, sowie neue Verfahren entwickelt.

4.1 Kultivierung von EBs im *drop array*-System

Für eine zukünftige Anwendung von Verfahren, die eine regenerative Stammzellbiologie ermöglichen, ist die Entwicklung und Analyse von neuen Methoden essentiell. Dies beginnt mit der Wahl bzw. Entscheidung für ein Verfahren zur Einleitung der Differenzierung von embryonalen Stammzellen.

Zur *in vitro* Differenzierung von ES-Zellen werden neben der Co-Kultur mit wenigen stromalen Zelllinien (Nakano et al. 1994) und einigen Monolayerverfahren (Nishikawa et al. 1998) vorrangig embryoide Körperchen, sogenannte *embryoid bodies* (Doetschman et al. 1985) verwendet. In diesen dreidimensionalen Aggregaten ist die Differenzierung von embryonalen Stammzellen bei gleichzeitigem Entzug des differenzierungsinhibierenden Cytokines LIF induziert.

Im *in vitro* Modell *embryoid body* können frühe zelluläre Entwicklungsprozesse nachvollzogen werden, wie sie im Embryo ablaufen (Doetschman et al. 1985). Nach der Aggregation von ES-Zellen werden *embryoid bodies* zunächst charakterisiert durch eine äußere Schicht aus extraembryonalem Entoderm und einen Kern von Zellen, die analog zu Zellen des Epiblasten (ICM) sind. Der Epiblast ist *in situ* der Ursprung der drei primären Keimblätter im Embryo.

Während der weiteren Differenzierung entstehen im EB-Kern durch lokal begrenzte apoptotische Prozesse Kavitäten. Die Entstehung dieser Kavitäten ist analog zur Bildung der amniotischen Höhle im Embryo (Coucouvanis und Martin 1999).

Zur Erzeugung von *embryoid bodies* werden vorwiegend zwei Verfahren verwendet, zum einen durch die Kultur von ES-Zellen in einer hochkonzentrierten Suspension (Doetschman et al. 1985), zum anderen erfolgt die EB-Bildung im hängenden Tropfenverfahren (*hanging drop*) (Wobus et al. 1991). Die Vorzüge der *hanging drop* Methode, gegenüber der Suspensionskultur, ist eine kontaktfreie Kultivierung ohne Adhäsion zu Kulturgefäßen, sowie die Homogenität der erzeugten *embryoid bodies*.

Das verwendete *drop array* Systems (Kammer, Patent) nutzt die Vorzüge der *hanging drop* Methode. Darüber hinaus ermöglicht das System die Kultivierung von EBs in Massenkultur, sowie in vergrößerten Tropfenvolumina über einen längeren Zeitraum und bietet vielfältige Einsatzmöglichkeiten für automatisierte Verfahren (Abschn. 3.2.1 und 3.3.1).

Die Vorzüge des verwendeten *drop array* Systems wurden für neue Analyse- und Differenzierungsverfahren genutzt und erweitert.

4.2 Die hämatopoetische Differenzierung

Das Generieren von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) durch humane ES-Zelldifferenzierung, als Alternative zur etablierten Knochenmarkstransplantation, ist ein potentielles Ziel der regenerativen Stammzellbiologie.

Damit könnte das Problem der geringen Verfügbarkeit von adulten HSC-Spenderzellen gelöst werden. Mit der „therapeutischen cloning Strategie“ (Wilmut et al. 1997), d.h. Erzeugung von autologen ES-Zellen durch einen Transfer von somatischen Zellkernen in eine enukleierte Oocyte, könnten immunologische Abstossungsreaktionen ausgeschlossen werden.

Die Erzeugung von humanen Embryonen zur Stammzellgewinnung ist jedoch mit ethischen Bedenken verknüpft. In einer aktuellen Arbeit konnten adulte dermale Fibroblasten zu pluripotenten Zellen (iPS, *induced pluripotent stem cells*) mit den Faktoren: Oct3/4, Sox2, Klf4, und c-Myc, „reprogrammiert“ werden (Takahashi et al. 2007). Dieser Ansatz könnte das ethische Problem lösen. Bis diese Methode etabliert ist, sind murine ES-Zellen eine ideales Analyseobjekt, um Verfahren zu entwickeln, die dann zumindest teilweise auf das humane System übertragen werden können.

Auch zum Generieren von HSCs sind neue Verfahren notwendig, dies setzt das Verständnis der hämatopoetischen Prozesse während der Differenzierung *in vivo* voraus.

In situ ist der extra-embryonale viscerale Dottersack der erste Ort der Bildung von hämatopoetischen Zellen und Blutgefäßen während der Embryogenese (Boucher und Petersen, 1996, Palis, 1995). Ausgehend vom Mesoderm entstehen Hämangioblasten, die gemeinsamen Vorläufer von Endothel- und hämatopoetischen Zellen (Choi, 1998, Robb und Elefanty, 1998). Aus ihnen gehen sogenannte Blutinseln hervor, sie bestehend aus einer äußeren Schicht endothelialer Zellen, die lose gepackte differenzierte rote Blutzellen umschließen.

Die anschließende Vaskulogenese tritt kurz nach der Blutinselbildung im visceralen Dottersack auf.

Embryoid bodies bilden *in vitro* Strukturen, die Blutinseln ähnlich sind und imitieren damit zahlreiche Differenzierungsereignisse, wie sie im Dottersack auftreten (Doetschman et al. 1985). Im Verlauf der EB-Differenzierung formieren sich Blutinselstrukturen, die Blut- und Endothelzellen beinhalten und somit ein Modell für Studien der Vaskulogenese und Hämatopoese sind (Doetschman, 1985, Hirashima, 1999, Vittet, 1996).

Die Verwendung des Live-EB-Imaging Systems (Abschn. 3.1.4) ermöglichte erstmalig die visuelle Darstellung der Aggregation von ES-Zellen im hängenden Tropfen, sowie des anschließenden Wachstums des gebildeten *embryoid bodies* durch Proliferation und Differenzierungsereignisse (Abschn. 3.2.1). Vor allem konnte die Entstehung früher hämatopoetischer Differenzierungsprozesse in *embryoid bodies*, wie sie *in vivo* im extraembryonalen Dottersack bei der Blutinselbildung ablaufen, im Modell visuell dokumentiert werden. Dies umfasst die Bildung von erythroiden Strukturen im EB-Inneren, bis zur Freisetzung primitiver Erythrozyten aus dem EB in einem hängenden Tropfen, über einen Zeitraum von 9 Tagen. Dabei verlieren Zellen des gebildeten hämatopoetischen Gewebes die Adhäsion zueinander und verlassen den EB.

Die Fähigkeit von ES-Zellen hämatopoetische Zellen zu bilden, wurde bereits Anfang der 90er-Jahre beschrieben (Wiles und Keller 1991). Eine Analyse der frühen hämatopoetischen Differenzierung erfolgte dabei hauptsächlich durch den molekularen Nachweis hämatopoetischer Marker oder von hämatopoetischen Oberflächenmolekülen.

Parallel zur visuellen Dokumentation konnte das zeitliche Expressionsmuster von Genen erfasst werden, die an der Hämatopoese beteiligt sind (Abschn. 3.2.3). Die Entwicklung hämatopoetischer Zellen geht vom Mesoderm aus. Der mesodermale Marker *Brachyury* (Herrmann et al. 1990; Wilkinson et al. 1990) ist bei Nutzung des *drop array*-Systems nach 3 Tagen der EB-Bildung am stärksten ausgeprägt. Im gleichen Zeitraum können Marker des Hämangioblastenstadiums nachgewiesen werden, die gemeinsamen Vorläufer von

hämatopoetischen- und endothelialen Zelllinien. Dabei ist *Flk-1* (Tag 3), der Rezeptor des VEGFs (*vascular epidermal growth factor*) (Quinn et al. 1993), ein Marker für Zellen mit dem Entwicklungspotential, sowohl für definitive und primitive hämatopoetische Zellen, als auch für endotheliale Zellen.

Zeitgleich wird *SCLL* exprimiert (Tag 3), ein bHLH Transkriptionsfaktor, der essentiell für eine Initiation des hämatopoetischen Programms beim putativen Hämangioblastenstadiums ist (Robertson, Dev. 2000). Dabei ist der Transkriptionsfaktor *Gata-1* (verstärkt am Tag 4) essentiell für die Entwicklung erythroider Linien (Pevny, 1991, Simon, 1992).

Als frühester Oberflächenmarker für erste hämatopoetische Vorläufer wurde CD 41 (Tag 4) identifiziert, seine Expression korreliert mit der Initiation der definitiven Hämatopoese (Mikkola, Blood, 2003). Dies deckt sich mit der Beobachtung der Bildung von erythroiden Strukturen im Inneren des EBs, die primitive Erythrocyten beinhalten, die positiv für embryonales Globin (β H-1, ab Tag 4) sind.

Die Initiierung der hämatopoetischen Differenzierung erfolgt spontan, ausgehend von mesodermalen Zellen, die während der ES-Zell-Differenzierung gebildet werden. Das hämatopoetische Potential der beobachteten hämatopoetischen Zellen konnte durch eine präparative Selektion der hämatopoetischen Vorläufer (Abschn. 3.2.4) mit einer weiterführenden cytokinunterstützten hämatopoetischen Differenzierung (Abschn. 3.2.5) analysiert werden. Bisher wurden die gesamten ES-Zellen disaggregierter *embryoid bodies* für Analysen der Bildung hämatopoetischer Kolonien genutzt (Keller et al. 1993), die Zahl hämatopoetischer Kolonien ist im Vergleich zur angewandten spezifischen Isolierung hämatopoetischer Vorläufer deutlich geringer. Die isolierten Zellen besitzen sogenanntes „*Multilineage Potential*“, d.h. durch eine Kultur in viskoser Methylzellulose mit den Cytokinen SCF (*stem cell factor*), IL-3, IL-6 und Erythropoietin, konnten verschiedene hämatopoetische Zelllinien differenziert werden. Dabei bestand der größte Teil der differenzierten Zellen aus primitiven Erythrocyten, die durch Erythropoietin induziert wurden (Abb. 3.8).

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte hämatopoetische Differenzierung von isolierten ES-Zellen war beschränkt auf Kolonien myeloischer Zelllinien, wie primitive Erythrocyten (BFC-E), Granulozyten, Monozyten, Macrophagen (CFU-GMM) (Abb. 3.8) und Mastzellen (Abb. 3.9). Das Generieren von B-Zellen durch Inkubation mit dem Interleukin IL-7, wie es bei Knochenmarkszellen angewandt wird, war nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

Die während der cytokinunterstützten Differenzierung detektierten Mastzellen (Abb. 3.9) haben einen gemeinsamen hämatopoetischen Vorläufer, sie sind *in situ* die Haupteffektor

Zellen der IgE Antikörper verknüpften allergischen Reaktion, dabei wird ihre immunologische Funktion hauptsächlich durch den hochaffinen IgE Rezeptor FcεRI vermittelt (Galli et al. 1993, Beaven et al. 1993, Kinet et al. 1999).

Keller konnte Mastzellen von hämatopoetischen Vorläufern nur in geringer Zahl nachweisen (Keller et al. 1993), dagegen konnte Tsai reine Populationen mit einer Methode die auf Flüssigmedium basiert generieren. Dabei wird die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in Richtung Mastzellen durch Il-3 und SCF gefördert (Tsai, 2000). Die Charakterisierung der generierten Mastzellen war in der vorliegenden Arbeit durch den Nachweis von spezifischen Mastzellproteasen (Abb. 3.10) möglich. Von ES-Zellen abgeleitete Mastzellen haben die Merkmale des Bindegewebs-Typus (Tsai et al. 1991).

Mit dem hier erstmalig dargestellten Differenzierungsverfahren können reine Mastzellpopulationen gewonnen werden. Die als Modell für *in vitro* Analysen inflammatorischer Reaktionen, wie z.B. Allergien genutzt werden könnten.

Neben der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen konnten in *embryoid bodies* Kavitäten nachgewiesen werden, die von endothelartigen Zellen umgeben waren (Abb. 3.5), dies ist ein Hinweis auf die Entwicklung von Blutgefäßen. Die Vaskulogenese ist der Hämatopoese angeschlossen, die auskleidenden Endothelzellen stammen ebenfalls, wie die hämatopoetischen Zellen, vom gemeinsamen Vorläufer, dem Hämangioblasten ab. Der EB als Modell der Angiogenese könnte u.a. wichtige Erkenntnisse z.B. bei der Blutversorgung (Angiogenese) von Tumoren liefern (Wartenberg, 1998).

4.3 Retinoinsäure abhängige Differenzierung

Eine gezielte Differenzierung von ES-Zellen zu spezifischen Zelltypen kann durch Einwirkung zahlreicher Faktoren, wie z.B. von Cytokinen und Wachstumsfaktoren, die entwicklungsabhängige Signalwege regulieren, erreicht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Morphogen Retinoinsäure (RA) analysiert, das *in vivo* an der Ausbildung der anterior-posterioren Körperachse beteiligt ist (Gruss und Kessel 1991; Kessel und Gruss 1991) und *in vitro* eine zeit- und konzentrationsabhängige Wirkung auf die Differenzierung von ES-Zellen ausübt (Wobus et al. 1997).

Resultate aus der Analyse der zeit- und konzentrationsabhängigen Wirkung von Retinoinsäure auf die Differenzierung embryonaler Stammzellen bildeten das experimentelle Fundament für die anschließende Proteomanalyse Retinoinsäure-regulierter Kernproteine (Abschn. 3.4).

Eine Verwendung des vorhandenen EB-Dokumentationssystems ermöglichte den konzentrationsabhängigen Effekt von Retinoinsäure auf die EB-Entwicklung automatisiert aufzunehmen und zu messen, weiterhin konnte ein Vergleich der Cytotoxizität der Lösungsmittel Ethanol und DMSO dargestellt werden (Abschn. 3.3.1).

Dabei wurde die Sensitivität von ES-Zellen zu Chemikalien genutzt, die als anerkannte Alternative zu Tierversuchen, zur Untersuchung der Embryotoxizität von chemischen Stoffen, verwendet werden kann.

Die Analyse zeigt, dass das Wachstum von ES-Zellen in *embryoid bodies* durch steigende RA-Konzentrationen inhibiert ist. Ein antiproliferativer Effekt von RA auf verschiedene Tumor-Zelllinien HL-60 (*acute promyelocytic leukemia*), MCF7 (*mammary carcinoma*), SCC4, SCC15 und A431 (*squamous cell carcinomas*) (Frey et al. 1991) wurde durch Verwendung des EB-Dokumentationssystem (Abb. 3.2) bei ES-Zellen ebenfalls beobachtet. Die Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes während der EB-Entwicklung konnte mit diesem automatisierten Verfahren genauer analysiert werden (Abschn. 3.3.1).

Der zeit- und konzentrationsabhängigen Effekt von Retinoinsäure auf die Entwicklung von *embryoid bodies* konnte durch Nachweis früher Keimblattmarker dargestellt werden.

Insbesondere die Inhibierung der mesodermalen Differenzierung am Beispiel des mesodermalen Markers *Brachyry* und die Induktion der ektodermalen, bzw. neuronalen Differenzierung, durch verstärkte Expression des ektodermalen Markers *Pax-6*, sowie des neuronalen Markers β -tubulin III.

Weiterhin wurde der inhibitorische Effekt hoher RA-Konzentrationen auf die Oct-4 Expression, des Markers für undifferenzierte ES-Zellen, nachgewiesen. Die Oct-4 Repression wird dabei direkt durch RA-*responsive* Elemente im Oct-3/4 Promotor verursacht (Barnea und Bergman 2000).

In den analysierten *embryoid bodies* konnte auch noch nach 7 Tagen der Differenzierungsinduktion Oct-4, ein Marker undifferenzierter ES-Zellen, detektiert werden. Dieser Hinweis auf undifferenzierten ES-Zellen in 7 Tage alten *embryoid bodies* zeigt, dass Zellen aus EBs nicht direkt für Transplantationsexperimente verwendet werden können, weil sie durch ungehemmte Proliferation das Potential für die Entstehung von Teratokarzinomen besitzen.

4.4 Retinoinsäure induzierte neuronale Differenzierung

Zur Generierung von spezifischen Zelltypen werden verschiedene Strategien angewandt.

Zum einen wird die gezielte Differenzierung von ES-Zellen durch differenzierungsfördernde Faktoren, wie von Cytokinen oder Wachstumsfaktoren spezifisch induziert, zum anderen können die gewünschten Zelltypen anhand einer Markerexpression selektioniert, bzw. unerwünschte Zellen eliminiert werden.

Die zeit- und konzentrationsabhängige Analyse zeigt, dass hohe RA-Konzentrationen die neuronale Differenzierung fördern.

Die Art und Weise, wie Retinoinsäure die neuronale Differenzierung induziert, ist nicht völlig geklärt. Es wird sowohl eine direkte Induktion, als auch eine indirekte Förderung der neuronalen Entwicklung, durch eine Inhibierung der mesodermalen Differenzierung diskutiert. Eine hemmende Regulation des Wnt- Signalweges ist einer der möglichen Wege des Retinoinsäure induzierten Mechanismus der neuronalen Differenzierung muriner ES-Zellen, da β -Catenin direkt mit dem RA-Rezeptor (RAR) interagiert und so den Wnt- β -Catenin anti-neuronalen Signalweg durch eine verstärkte Regulation des sezernierten *Frizzled-Related Protein 2* (Sfrp2) inhibiert (Aubert et al. 2002).

Ein anderer möglicherweise beteiligter Faktor ist FGF, der während der Embryonalentwicklung durch endogene Retinoinsäure reprimiert wird und dadurch die neuronale Differenzierung der posterioren neuronalen Platte fördert. Im Gegensatz dazu, führt eine Überexpression der an der RA-Synthese beteiligten Raldh2 (Retinaldehydrogenase), während der Differenzierung, zu einer zeit und konzentrationsabhängigen Repression anteriorer Strukturen, (Chen et al. 2001; Shiotsugu et al. 2004).

Die Kenntnisse der zeit- und konzentrationsabhängigen Analyse wurden für die Etablierung eines neuronalen Differenzierungsprotokolls verwendet, das die EB-Bildung mit der RA-Inkubation in einen Schritt einschließt. Nach EB-Erzeugung und Induktion der neuronalen Differenzierung erfolgte eine serumfreie Kultivierung in mehreren Schritten, um eine mesodermale Differenzierung zu unterbinden. Dadurch konnten differenzierte Neuronen innerhalb einer Woche nachgewiesen werden (Abb. 3.14).

RA behandelte ES-Zellen bilden zunächst neuronale Vorläuferzellen mit der Charakteristik von radialen Gliazellen, ähnlich der *in vivo* Situation (Malatesta et al. 2003). Diese Vorläufer differenzieren zu glutamatergen Neuronen, die funktionell miteinander verbunden sind (Bibel et al. 2004) und auch das Potential haben, zu Astrozyten zu differenzieren. Die Entwicklungsbeschränkung von Retinoinsäure-induzierten Neuronen wurde durch Transplantationsexperimente bestätigt (Plachta et al. 2004) Wenn Retinoinsäure induzierte

Vorläufer in das Rückenmark von Hühnerembryonen transplantiert werden, entwickeln sich Motoneurone und spezifische Subtypen von Interneuronen im anterioren Rückenmark, nicht aber zum dorsalen Phänotyp, oder zu sensorischen Neuronen dorsaler Spinalganglien.

Im Gegensatz zur Restriktion der RA-Differenzierung, konnte ein weit breiteres Entwicklungspotential von ES-Zellen, wie z.B. zu sensorischen Neuronen, mit anderen neuronalen Differenzierungsprotokollen im Hühnerembryo nachgewiesen werden (Plachta, 2004).

Eine Differenzierung von spezifischen Zelltypen ohne Selektion reicht nicht aus, um homogene Zell-Populationen zu erreichen. Die nach der neuronalen Induktion aus dem *embryoid bodies*-Gewebeverband herausgelösten Zellen waren überwiegend (mehr als 90%) positiv für RC2, ein Marker für radiale Gliazellen (Misson et al. 1988). Während der weiteren neuronalen Differenzierung war jedoch eine erhöhte Letalität der neuronalen Zellen zu beobachten. Ähnlich der *in vivo* Situation, wird die neuronale Differenzierung von apoptotischen Prozessen begleitet. Bei der Entstehung von Hirnstrukturen eliminieren apoptotische Prozesse während der Entwicklung 20-80% der Neuronen (Hamburger et al. 1981; Oppenheim et al. 1991). *In vitro* induziert Retinoinsäure die Apoptose von ES-Zellen während der neuronalen Differenzierung, die mit einer Reduktion von *Bcl-2* gekoppelt ist (Niizuma et al. 2006). Dabei wird das apoptotische Signal durch RA-Rezeptoren vermittelt. *In vivo* wird die Apoptose ebenfalls durch endogenes RA in embryonalen Neuronen induziert (Okazawa et al. 1996).

Obwohl der größte Teil der differenzierten Zellen von dissoziierten EBs zunächst positiv für den radialen Gliamarker RC2 war (Abb.3.12), konnte nach einer längeren Kultivierung (nach 7 Tagen) keine homogene Zellpopulation nachgewiesen werden. Gründe dafür sind zu einen auftretende apoptotische Prozesse der differenzierenden Neuronen, zum anderen die Proliferation anderer Zelltypen, vor allem von Zellen mit der Morphologie epithelialer Zellen. Desweiteren bildeten die differenzierten Neuronen keine homogene Zellpopulation aus, sondern es konnten sowohl differenzierte Neuronen, als auch Astrocyten nach einer Woche Inkubation, bzw. Differenzierung nachgewiesen werden.

Besondere Bedeutung erlangen die in dieser Arbeit vorgestellten neuen Protokolle in zweierlei Hinsicht.

1. Die Erzeugung neuronaler Zellen wird erheblich beschleunigt und
2. der neuronale Zelltyp wird mit hoher Ausbeute (90%) hergestellt.

Beides ist für einen Einsatz von Differenzierungsprotokollen von eminenter Bedeutung.

4.5 Proteomanalyse von RA regulierten Faktoren im Nukleus

In der vorliegenden Arbeit wurden proteomische Verfahren zur Detektion von nukleären Faktoren angewandt, die während der ES-Zelldifferenzierung durch das Morphogen Retinoinsäure in ihrer Expression beeinflusst werden.

Ergänzend zu genomischen Methoden ermöglichen Verfahren, die unter dem Begriff Proteomics zusammengefasst werden, die weitergehende Analyse zellulärer Proteine.

Dies ist von besonderer Bedeutung, da die zellulären Proteine dynamischen Veränderungen unterliegen, wie beispielsweise posttranslationalen Modifikationen, die einen entscheidenden Anteil an der Regulation zellulärer Prozesse besitzen.

Als etabliertes proteomisches Verfahren wurde die 2D-Gel-Elektrophorese (Klose 1975; O'Farrell 1975) genutzt. Sie ermöglicht die reproduzierbare zweidimensionale Auftrennung komplexer Proteingemische (mehrere tausend Proteine) entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (erste Dimension) und ihrer molekularen Masse (zweite Dimension), sowie eine relative Quantifikation von Proteinen zu einem bestimmten Zeitpunkt.

Durch Anwendung verschiedener Fraktionierungs-Verfahren, wie beispielsweise einer vorgeschalteten Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer physikalischen (pI), oder chemischen Eigenschaften (Modifizierung z.B. Phosphorylierung), sowie einer isolierten Analyse subzellulärer Kompartimente, kann die Komplexität von Proteingemischen reduziert werden. Dadurch können auch Faktoren von geringer Kopienzahl (*low abundant*) detektiert werden, die bei Gesamtzell-Analysen von Faktoren in großer Kopienzahl (*high abundant*), wie z.B. Proteine des Cytoskeletts, überlagert werden.

Die Konzentration in dieser Arbeit auf die Analyse des nukleären Subproteoms von ES-Zellen ermöglichte die Detektion von nukleären Faktoren, die unter Einfluss von Retinoinsäure reguliert werden. Dies wird besonders deutlich durch den Nachweis eines Mitgliedes des RA-Signalweges, des aktivierten zellulären RA-Binde-Proteins (Crabp 1) im Nukleus, das den nukleären RA-Rezeptor (RAR) nach RA-Behandlung aktiviert (Chambon 1996).

4.5.1 Isolierung von Zellkernen aus ES-Zellen

Die Erzeugung von homogenen *embryoid bodies* in Massenkultur konnte mit dem *drop array* System im Hochdurchsatzverfahren erzielt werden.

Die erfolgreiche Bearbeitung des Projektes setzte die Verwendung eines etablierten Verfahrens zur Isolation von Zellkernen, sowie eine für eine subzelluläre Analyse erforderliche Menge an homogenen EBs voraus. Das verwendete Kernpräparationsprotokoll (Abschn. 2.10.11) wurde in der Arbeitsgruppe entwickelt und an den erforderlichen Durchsatz angepasst. Der grosse Vorteil dieser Methode ist, dass ein gereinigtes Pelett sedimentiert wird, das von den restlichen zellulären Bestandteilen leicht abgetrennt und gewaschen werden kann. Die Effizienz der Kernpräparation wird durch die Detektion eines überwiegenden Anteils an Proteinen (über 56 %), die primär im Nukleus lokalisiert sind, sowie durch einen geringen Anteil mitochondrialer Proteine (3%), des zweitgrößten membranumgebenen Organells, dargestellt.

Unter den detektierten Proteinen anderer zellulärer Kompartimente befinden sich zahlreiche Proteine die ebenfalls im Nukleus beschrieben wurden, sowie Proteine, die an nukleären Transportvorgängen beteiligt sind.

Ein vollständiger Ausschluss von Proteinen anderer zellulärer Kompartimente ist nicht möglich, da andere Kompartimente mit der Kernmembran verknüpft sind, wie z.B. Proteine des endoplasmatischen Reticulums (ER) oder des Cytoskeletts, bzw. zelluläre Prozesse am ER und der Kernmembran stattfinden.

Zu den Prozessen die am ER stattfinden gehört die Proteinbiosynthese von Membranproteinen. Es konnten Proteine die an der Initiierung der Translation beteiligt sind detektiert werden, wie Elongations-Faktoren, die eine GTP-abhängige Bindung der aminoacyl-tRNA zur A-Seite der Ribosomen während der Proteinbiosynthese fördern. Elongationsfaktoren (Elf-1 alpha) wurden bereits in nukleären Exportkomplexen mit XPO5, EEF1A1, Ran und aminoacyl-tRNA nachgewiesen (Calado et al. 2002).

Als weitere Faktoren die u.a. an der Proteinbiosynthese beteiligt sind, konnten verschiedene Proteine aus der Familie der Heatshock-Proteine detektiert werden. Mit ihrer Chaperon-Funktion übernehmen die *Heatshock*-Proteine wichtige Aufgaben bei der Faltung und Aufrechterhaltung der Struktur von Proteinen während der Proteinbiosynthese, bei zellulärem Stress, sowie bei Transportvorgängen zwischen zellulären Organellen, wie z.B. zwischen Cytoplasma und Nukleus (HSP70 Proteinsynthese, HSP 65: Faltung neuer Proteine, HSP 90: Interagiert mit TP53/p53 *Tumor Specific Antigen*). Einige HSPs (HSP, 70, 90) werden bei

zellulärem Stress in den Nukleus translokalisiert und üben dort ihre Funktion aus (Pouchelet et al. 1983; Welch und Feramisco 1984; Imamoto et al. 1992; Kato et al. 1999).

Die nukleäre Kernmembran ist vom Membransystem des ER umgeben, eine Beteiligung von Reticulocalbin bei der ES-Zell-Differenzierung konnte bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (Wilhelm 2004) nachgewiesen werden. Es ist möglicherweise an der Regulation calcium-abhängiger Aktivitäten im Lumen des endoplasmatischen Reticulums oder im post-ER-Kompartiment beteiligt (Ozawa und Muramatsu 1993), dabei wird die Synthese von Reticulocalbin durch eine RA-Behandlung inhibiert.

Die Behandlung von *embryoid bodies* mit Retinoinsäure bewirkte eine verstärkte Ausbildung von extrazellulären Matrix (ECM) Proteinen, dies konnte bereits beim Vereinzeln der mit RA behandelten *embryoid bodies* beobachtet werden, da die Vereinzlung durch die ausgeprägte ECM erschwert wurde und Kontaminationen während der Kernpräparation verursachte. Nicht vollständig zerlegte EBs können bei der Präparation die Kernfraktion verunreinigen und sind damit eine mögliche Ursache für kompartimentsfremde Proteine im Kernlysat. Die molekulare Masse der detektierten Proteine des ECM ist durch die Trypsin-Behandlung während der EB-Vereinzlung reduziert.

Die Proteomanalyse bestätigte eine verstärkte Ausprägung der ECM in den mit Retinoinsäure behandelten Proben durch eine verstärkte Laminin und Nidogen Synthese. Dabei wird die Laminin Synthese direkt durch Bindung des durch Retinoinsäure aktivierten nukleären RA-Rezeptors (RAR) an RA-Response-Elemente im Promotor des Laminin induziert (Vasios et al. 1989).

Verschiedene Formen des Cytokeratin werden während der Retinoinsäure induzierten neuronalen Differenzierung verstärkt synthetisiert (Guo et al. 2001). Ein Einfluss von Retinoinsäure auf die Entwicklung epithelialer Zellen ist bekannt. Die Förderung der Differenzierung zu epithelialen Zellen wurde bereits während der neuronalen Differenzierung beobachtet.

4.5.2 Funktionelle Zuordnung der nukleären Proteine

Die Behandlung von ES-Zellen während der Differenzierung mit Retinoinsäure induzierte die Synthese des Kernlamina Proteins Lamin A. Im Gegensatz zum universellen Lamin B, sind A-Typ Lamine weder in frühen Embryonen, noch in embryonalen Carcinoma (EC) Zelllinien zu finden. Nach einer RA-Behandlung exprimiert die EC-Zelllinie P19 A-Typ Lamine. Okumura beschreibt ein neues RA-Responsive-Element, das Lamin-A/C-RA-Responsive

Element (L-RARE), dass innerhalb des Lamin A/C-Promotors lokalisiert ist (Okumura et al. 2000). Der Wechsel von Lamin B zu Lamin A durch eine RA-Behandlung wurde in der durchgeführten Proteomanalyse in von ES-Zellen abgeleiteten EBs erstmalig nachgewiesen. Lamin A ist ein Caspase Substrat und wird während der Apoptose gespalten (Takahashi et al. 1996).

In dieser Studie wurden zahlreiche nukleäre Proteine identifiziert, die an Prozessen der zellulären Transkription bzw. der translationellen Kontrolle involviert sind. Dabei konnten Kernproteine detektiert werden, die sowohl eine Rolle bei der RNA-Bindung und Prozessierung, als auch an der DNA-Bindung und -Modifikation spielen.

Nach der Transkription unterliegt die prä-mRNA zahlreichen Reifungsprozessen und geht dabei mit Ribonukleoproteinen Komplexe ein. Die Prozessierung der prä-mRNA findet im Spleißosom statt. RNA modifizierende Proteine zeichnen sich durch RNA-bindende Domänen aus.

Der größte Anteil der identifizierten nukleären Proteine besitzt solche RNA-Erkennungssequenzen (RRM, RNA *recognition motif*) und ist an der Prozessierung von mRNA beteiligt. Darunter sind verschiedene Isoformen von hnRPs (*heterogenous nuclear Ribosomal Protein*), die Komplexe mit mRNA bilden und auch am Transport von mRNAs aus dem Nukleus mitwirken. Einige hnRP-Isoformen agieren als transkriptionelle Regulatoren, so unterstützt die durch Retinoin säure verstärkte *D-like* Isoform eine Aktivierung der Transkription in differenzierten Myotuben (Boopathi et al. 2004), die K-Isoform (in beiden Zuständen) ist ein Transkriptionsfaktor, der an den myc-Promotor bindet (Takimoto et al. 1993). Die Funktion von hnRNPs reicht dabei von der mRNA Verpackung und Transport, bis zum RNA-Spleißen und *Silencing* (Krecic und Swanson 1999).

Unter normalen Wachstumsbedingungen befinden sich die hnRNPs nach dem Verlassen des Nukleolus im Nukleus. Ein Subset von hnRNPs (hnRNPs A und K) pendelt ständig zwischen Nukleus und dem Cytoplasma, andere Formen (C1/C2 und U) verbleiben im Kern (Pinol-Roma et al. 1989).

Neben den durch eine RA-Behandlung reduzierten *Splicing*-Faktoren konnte ein Paraspeckel Protein und das durch RA verstärkte NONO (*Non-POU-Domain-Containing, Octamer Binding Protein*), die miteinander heterodimere Komplexe bilden, detektiert werden. Beide besitzen eine DBHS- (*Drosophila Behavior, Human Splicing*) Domäne, die durch zwei tandem RNA-Erkennungsmotive mit einer *helix-turn-helix* (hth) DNA-Bindedomäne charakterisiert wird (Fox et al. 2002; Shav-Tal und Zipori 2002). Proteine mit dieser DBHS-

Domäne regulieren nukleäre Rezeptoren, wie Progesteron-Rezeptoren und Thyroid Rezeptoren und nehmen ebenfalls an der mRNA Regulation im Nukleus teil.

In den mit RA-behandelten *embryoid bodies* konnte verstärkt ein Fragment (ca. 20 kDa) der RNA-Helicase p68 (DDX 5) detektiert werden. Ihre Helicase Funktion übt sie durch eine sogenannte DEAD-Box-Domäne und ATPase Aktivität aus. Sie ist essentiell für die RNA-Prozessierung und wird mit Spleißosomen co-aufgereinigt (Gottschalk et al. 1998).

Zusätzlich zur Funktion der RNA-Prozessierung, übt p68 eine Aufgabe als transkriptioneller Regulator aus. Es ist an der Regulation des Zellwachstums und an der Förderung von Tumoren beteiligt (Stevenson et al. 1998; Causevic et al. 2001) und interagiert als transkriptioneller Co-Aktivator mit dem nukleären Östrogen-Rezeptor α , nicht jedoch mit dem Retinoinsäure-Rezeptor α (Endoh et al. 1999).

Eine besondere Bedeutung übt p68 als ein potenter transkriptioneller Co-Aktivator des p53 Tumorsuppressors aus, dabei aktiviert es die Transkription von p53 *Responsive* Promotoren und interagiert in der Zelle mit p53 (Bates et al. 2005).

Der Transkriptionsfaktor p53 wird durch zellulären Stress, inklusive DNA-Zerstörung induziert, bzw. stabilisiert (Vogelstein et al. 2000; Lohrum et al. 2001). Als Co-Suppressor unterstützt p68 die Funktion von p53, wie die Hemmung der Proliferation und Förderung von Apoptose und DNA-Reparatur.

Zusätzlich wird p68 wie p53 zum p21 Promotor (*Cyclin-Kinase Inhibitor*) rekrutiert, das die Cdk-Cyclin-Komplexe hemmt und ein Verbleiben in der G-Phase verursacht (Bates et al. 2005).

Mögliche Rückschlüsse aus der Detektion des p68 Kinase-Fragmentes sind zum einen, eine reduzierte RNA-Prozessierung, zum anderen wird die Inhibierung der Proliferation und die Förderung der Apoptose durch den proteolytischen Abbau beeinträchtigt.

Neben den RNA bindenden und prozessierenden Proteinen sind als zweite funktionelle Gruppe DNA-bindende und modifizierende Proteine identifiziert worden, wie das durch Retinoinsäure reduzierte Modifier Protein, das an der Chromatinorganisation beteiligt ist.

Das humane Homolog (*heterochromatin like protein*) von Modifier erkennt und bindet Histon H3-Enden, dabei führt die Methylierung von Lysin-9 zu einer epigenetischen Repression. Die Interaktion des *heterochromatin like proteins* mit dem Lamin B Rezeptor (LBR) kann zu einer Assoziation des Heterochromatins mit der inneren nuklearen Membran beitragen.

Als weiteres DNA modifizierendes Protein, wurde die DNA *mismatch* ATPase Muts in den mit RA behandelten *embryoid bodies* als Fragment detektiert.

Es gibt in beiden Zuständen weitere Hinweise auf die Degradation von Proteinen während der ES-Zelldifferenzierung, durch differentielle Expression von Proteasom-Untereinheiten, wie die Proteasome Untereinheit MC14 in den unbehandelten EBs, sowie die 26s Proteasom-Untereinheit, die am Ubiquitin-Signalweg beteiligt ist und deren Beteiligung an der Degradation sowohl im ER, als auch im Nukleus nachgewiesen wurde (Naujokat und Hoffmann 2002).

Weiterhin konnte in den unbehandelten *embryoid bodies* eine Serin-Protease (*Tripeptidyl-Peptidase II*) nachgewiesen werden.

Die Proteomanalyse unterstrich die hemmende Wirkung von Retinoinsäure auf die Proliferation und die Förderung der Apoptose und ermöglichte eine Detektion von (nukleären) Faktoren, die an diesen Prozessen beteiligt sind, darunter in den mit Retinoinsäure behandelten *embryoid bodies* ein Fragment (ca. 50 kDa) des CAD Proteins.

CAD ist ein multienzymatisches 240 kDa Protein, das drei enzymatischen Aktivitäten besitzt: der Carbamoyl Phosphate Synthetase (CPSII), der Aspartate Transcarbamoylase (AT-Case) und der Dihydrogenoretase (DHOase). Es ist verantwortlich für die *de novo* Synthese von Pyrimidine Nukleotiden und das Zellwachstum. Die proteolytische Spaltung des CAD Proteins ist ebenfalls ein Hinweis auf apoptotische Prozesse, dessen phosphorylierte Form primär im Nukleus lokalisiert ist (Sigoillot et al. 2005). CAD ist ein MAP-Kinase- (*Mitogen Activated Protein Kinase*) Target, dabei wird Thr-456 kurz vor dem Beginn der S-Phase phosphoryliert (Graves et al. 2000). Die CPS II Aktivität des CAD-Proteins reguliert den Signalweg, da sie den ersten und begrenzenden Schritt des Signalweges katalysiert. Eine verstärkte CPS II Aktivität wurde in Tumorzellen nachgewiesen (Reardon und Weber 1985).

Während der Apoptose, durch eine selektive Proteolyse des CAD-Proteins, verliert CPS II die Aktivität, dies erfolgt parallel zur Aktivität der Caspase-3. Es wurden zwei Caspase-3 Spaltungsstellen von CPS II nachgewiesen, die eine reduzierte Pyrimidin-Synthese während der Apoptose erklären (Huang et al. 2002).

Das nukleäre Protein TIS (*programmed cell death protein 4*) ist ein Tumorsuppressor Protein, das die Proteinbiosynthese der Translationsinitiierung unterdrückt. Eine verstärkte Synthese von TIS ist während der RA-induzierten granulocytischen Differenzierung in NB4 und HL60 AML Zelllinien nachgewiesen worden (Ozpolat et al. 2007). In dieser Arbeit wurde dies erstmal während die RA-induzierten Differenzierung von ES-Zellen bestätigt.

Die Spotzahl der 2D-Gele von RA behandelten Proben ist besonders im niedermolekularen Bereich deutlich erhöht (Abb. 3.16 und 3.17). Die Detektion von degradierten Proteinen, wie

das oben beschriebene CAD-Protein mit Caspase-Schnittstellen, ist ein weiterer Hinweis auf proteolytische Prozesse bzw. auf Apoptose.

Bereits behandelt wurde die p68-Helicase, ebenfalls konnte ein Fragment des *Heatshockproteins* HSP90 in den RA behandelten Proben detektiert werden. HSP90 besitzt eine antiapoptotische Funktion. Das hsp90 β Gen wird während der UV induzierten Apoptose von Jurkat-Zellen reprimiert (Zhang et al. 2004). Der proteolytische Abbau von HSP90 in RA-behandelten EBs könnte somit Teil apoptotischer Prozesse sein.

Eine Degradation des an der DNA-Mismatchreparatur beteiligten Muts-Proteins, könnte ebenfalls durch unzureichende DNA-Reparatur proapoptotisch wirken, oder es ist wird bereits durch apoptotische Prozesse degradiert.

4.5.3 Analyse der nukleären Proteine: Nucleolin und Nucleophosmin

Auch das an der DNA-Bindung und Modifikation beteiligte Nucleolin wird degradiert und wurde parallel zu Nucleophosmin näher analysiert.

Nucleolin ist in den mit Retinoinsäure behandelten *embryoid bodies* mehr destabilisiert, dies wird durch ein auftretendes Fragment während der Proteomanalyse, sowie ein verstärktes Fragment im Western-Blot verdeutlicht (Abb. 3.19).

Das nukleäre Nucleophosmin ist durch RA-Behandlung reduziert, der zelluläre Gesamtgehalt ist aber nicht wesentlich beeinflusst.

Die beiden nukleären Phosphoproteine Nucleolin und Nucleophosmin sind multifunktionelle Proteine, die an der ribosomalen Biogenese beteiligt sind. Die ribosomale Biogenese reguliert die Translation und hat damit einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinbiosynthese. Zahlreiche zelluläre Prozesse, wie Proliferation und Zellwachstum sind von der Bereitstellung von Ribosomen abhängig. Neben dieser funktionellen Aufgabe übernehmen Nucleolin und Nucleophosmin noch weitere wichtige zelluläre Funktionen. Sie sind Faktoren, die die zelluläre Proliferation beeinflussen und ebenfalls an apoptotischen Prozessen beteiligt sind.

Nucleophosmin (NPM) ist in den Kernen von RA-behandelten *embryoid bodies* deutlich reduziert (Abb. 3.19), die Reduktion des zellulären Gesamtgehaltes von NPM ist jedoch nicht so stark ausgeprägt (Abb. 3.22). Es ist ein abundantes multifunktionelles Phosphoprotein das hauptsächlich in der granulären Region des Nucleolus lokalisiert ist (Spector et al. 1984). Zahlreiche zelluläre Ereignisse sind mit NPM verknüpft, inklusive Ribosomen-Biogenese, Protein-Chaperoning und Centrosomen-Duplikation (Kondo et al. 1997; Okuda et al. 2000; Okuwaki et al. 2001).

Es ist essentiell während der Embryonalentwicklung und für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität (Grisendi et al. 2005).

Bei der Tumorgenese spielt es eine bedeutende Rolle, so ist das Gen in zahlreichen humanen hämatopoetischen Tumorerkrankungen, wie AML (*acute myeloid leukaemia*) und CML (*chronic myelogenous leukaemia*) zu verschiedenen Partner Genen transloziert.

NPM moduliert positiv und negativ die Aktivität von Tumorsuppressor Genen wie p53 (Colombo et al. 2002; Kurki et al. 2004) und Arf (Bertwistle et al. 2004; Korgaonkar et al. 2005) und wird durch Stressstimuli, inklusive DNA Schädigung (Wu und Yung 2002), sowie Hypoxie (Li et al. 2004) induziert.

Eine verstärkte nukleäre Aktivität, wie die Ribosomen-Biogenese ist Voraussetzung für Proliferation, so exprimieren proliferierende Zellen Nucleophosmin in großen Mengen (Chan et al. 1989).

NPM bewegt sich wie andere nukleäre Proteine aktiv zwischen subzellulären Kompartimenten, dabei ist der Transport essentiell für seine Funktion (Borer et al. 1989). Der nukleäre Export von NPM fördert das Zellwachstum, so vermittelt NPM beispielsweise den Export des ribosomalen Proteins l5 vom Nukleus in das Cytosol durch den CRM1-abhängigen Mechanismus.

Die Translokation von NPM aus dem Nucleolus in den Nukleus ist ein essentielles Ereignis während der Progression in die S-Phase, wenn der Export durch den Tumor Suppressor Arf inhibiert wurde, arretieren die Zellen in G1 (Brady et al. 2004).

Arf interagiert mit NPM und fördert die Polyubiquitinierung, die in einer proteasomalen Degradation resultiert. Die Bindung von Arf an Mdm2 (Chin et al. 1998) verursacht die Inhibierung seiner E3-Ligase-Aktivität (Honda und Yasuda 1999) und stabilisiert, bzw. aktiviert den Tumorsuppressor p53. Eine Arf-Überexpression verursacht einen Zellzyklus-Arrest in G1 und G2 in einer p53-abhängigen Weise.

Der Verlust der NPM Expression resultiert in einer ausgeprägten Inhibierung der zellulären Proliferation und verstärkter Apoptose (Itahana et al. 2003; Bertwistle et al. 2004; Brady et al. 2004; Grisendi et al. 2005).

Ein weiterer Hinweis, dass NPM die Stress induzierte Apoptose moduliert, ist die Beobachtung, dass Nucleophosmin bei einer Behandlung von humanen Leukämiezellen K562 und HeLa-Zellen mit einer Vielzahl von proapoptotischen Medikamenten zunächst ins Nucleoplasma translokalisiert wird (Chan und Chan 1999).

Während der Apoptose wird das Bcl-2 Familien-Mitglied Bax durch Konformationsänderung aktiviert und in die Mitochondrien translokalisiert, wo es die Cytochrom C-Freisetzung

aktivieren kann, die in einer Caspase-Aktivierung resultiert (Wolter et al. 1997; Narita et al. 1998). Nucleophosmin wurde als neues Bax-Chaperone beschrieben, das an der Regulation der Apoptose beteiligt ist und durch Konformationsänderung an aktiviertes Bax bindet. Ein weiterer Hinweis für eine Beteiligung an der Translokation von Bax ist, dass NPM nach einem apoptotischen Stimulus im Cytoplasma akkumuliert, bevor Bax in die Mitochondrien translokalisiert wird (Kerr et al. 2007).

Ebenfalls im subnukleären Kompartiment des Nukleus, dem Nukleolus, ist der Hauptanteil von Nucleolin lokalisiert. Das Phosphoprotein von exponentiell wachsenden eukaryotischen Zellen befindet sich hauptsächlich in der dichten fibrillären und granulären Region des Nucleolus (Bugler et al. 1982). Nucleolin wurde aber auch sowohl im Cytoplasma, als auch an der Zelloberfläche beschrieben (Deng et al. 1996).

Die ursprünglich beschriebene Funktion beschränkte sich auf die Transkription ribosomaler DNA (rDNA), sowie der Reifung und des Zusammenbaus von Ribosomen (Jordan 1987) und korreliert somit direkt mit der Regulation der Transkription.

Des Weiteren wurde Nucleolin als eine DNA/ RNA-Helicase (Tuteja et al. 1995), als DNA-abhängige ATPase und als transkriptioneller Repressor (Yang et al. 1994) beschrieben.

Es ist involviert in den cytoplasmatischen nukleolären Transport von ribosomalen Komponenten und preribosomalen Partikeln.

Darüber hinaus spielt Nucleolin aufgrund seiner multiplen Domänenstruktur eine Rolle, die nukleolare Aktivitäten mit Zellproliferation und mitotischer Dynamik verbindet, inklusive Chromatin-Kondensation und Dekondensation (Erard et al. 1990).

Nucleolin ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, zum einen führt die Regulation der Phosphorylierung durch Faktoren, wie Androgene, bFGF, FGF2, Insulin, Dex durch die Protein Kinase NII (PKN2), zu einer verstärkten ribosomalen rDNA Transkription (Jordan 1987) durch die Polymerase I in der G1 zur S-Phase des Zellzyklus. Zum anderen wird während der Mitose Nucleolin durch die Cdc2-Kinase phosphoryliert und ist an der Kondensation des Chromatins beteiligt, in dem es mit Histon H1 interagiert.

Intaktes Nucleolin ist in proliferierenden Zellen mit einem Anteil von 5% das Hauptprotein im Nucleolus. In nichtproliferierenden Zellen sind aufgrund der Autodegradation von Nucleolin degradierte Formen nachgewiesen worden (Lapeyre et al. 1987; Olson et al. 1990; Chen et al. 1991; Fang und Yeh 1993).

Ebenfalls ist eine Beteiligung von Nucleolin am Zelltod und Apoptose nachgewiesen. Während des T-Lymphocyten vermittelten apoptotischen Zelltodes wird Nucleolin in der

Zielzelle durch Granzym A fragmentiert, das autolytische Endonukleasen aktiviert, die eine Fragmentation der DNA und damit Apoptose auslöst (Pasternack et al. 1991).

Die detektierte Destabilisierung von Nucleolin durch eine RA-Behandlung zeigt auch hier den inhibierenden Effekt von RA auf die Proliferation, einerseits durch eine Inhibierung der Ribosomen-Biogenese und Chromatin-Kondensation, zum anderen fördert destabilisiertes Nucleolin apoptotische Prozesse.

Zusammenfassend ermöglichte die Proteomanalyse die Detektion nukleärer Proteine, die durch RA-Einwirkung reguliert werden, wie Filamente der Kernlamina, Faktoren der RNA-Prozessierung, der DNA-Modifikation, sowie von Faktoren die eine Rolle bei der Proliferation und Apoptose spielen. Die Ergebnisse der Proteomanalyse sind die Basis für die Aufklärung molekularer Mechanismen. Darunter potentielle Faktoren die als Marker des Differenzierungsgeschehens und apoptotischer Prozesse dienen könnten.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden neuartige Methoden zur Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) angewandt und entwickelt, die Analysen früher Differenzierungsprozesse im Modellsystem, sowie die spezifische Differenzierung von Zelltypen ermöglichten.

Die Einleitung der Differenzierung embryonaler Stammzellen erfolgte mit einem System (*drop arrays*) zur Aggregation von ES-Zellen, dessen Design die Erzeugung homogener *embryoid bodies* (EBs) in Massenkultur (mehrere tausend) ermöglichte. Das vorhandene *drop array*-System (Kammer, Patent) war Grundlage weiterer EB-Analyse-Verfahren. Mit einem visuellen Aufnahme-System (*Live-Imaging-System*) konnten frühe hämatopoetische Differenzierungsprozesse während der EB-Entwicklung dokumentiert werden. Die beobachteten hämatopoetischen Vorläufer konnten isoliert und zu hämatopoetischen Zellen der myeloischen Linien, sowie zu Mastzellpopulationen differenziert werden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der zeit- und konzentrationsabhängige Effekt des Morphogens Retinoinsäure analysiert. Mit einem EB-Dokumentations-System, bei dem die EBs an den *arrays* automatisiert aufgenommen und gemessen wurden, konnte der antiproliferative Effekt von RA während der EB-Entwicklung dargestellt werden. Unter Verwendung des *drop array*-Systems konnte die RA-induzierte neuronale Differenzierung für die Entwicklung eines neuen neuronalen Differenzierungsprotokolls genutzt werden, bei dem die EB-Erzeugung und die neuronale Induktion in einem Schritt durchgeführt wurde.

Es wurde ein Protokoll zur Isolierung von Zellkernen angewandt, das eine Proteomanalyse des Nukleus ermöglichte, bei der Proteine detektiert wurden, die durch eine RA-Behandlung reguliert werden. Darunter der nukleäre Nachweis des aktivierten CRABP1, sowie von Faktoren die an der RNA-Prozessierung und DNA-Modifikation beteiligt sind. Ein direkter RA-abhängiger Effekt ist die Induktion des Lamin A Filamentes. Es konnten zahlreiche Proteine detektiert werden, die den antiproliferativen und proapoptotische Effekt von RA unterstreichen. Darunter das Tumorsuppressor Protein TIS, das die Translationsinitiation inhibiert und durch eine RA-Behandlung verstärkt synthetisiert wurde.

Einige Proteine sind proteolytisch degradiert, wie das CAD-Protein, das Caspase Schnittstellen besitzt, sowie die RNA- Helicase p68. Die RA-Behandlung von EBs reduzierte die nukleäre Menge des Nucleophosmin-Pools und verstärkte die autokatalytische Degradation von Nucleolin. Beide sind multifunktionelle Proteine, die an der Ribosomen-

Biogenese involviert sind und einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Proliferation besitzen.

Die in dieser Arbeit angewandten und weiterentwickelten Verfahren leisten einen Beitrag zur Verbesserung der Analyse von embryonalen Stammzellen.

Anhang

A: Relative Spotintensitäten der detektierten differentiell regulierten Proteinspots

Den detektierten Proteinspots wurden von der 2D-Analyse-Software PDQuest (BioRad) Spotnummern (SSP) zugeteilt.

SSP	Kontr. 1	RA 1	Kontr. 2	RA 2	Kontr. 3	RA 3	Kontr. 4	RA 4
102	81138.1	23008.7	75442.2	19877.3	64142.1	26051.1	80828.2	8919
106	41945.2	4481.8	39990.4	17421.8	69034.6	195.7	20713.2	1407.8
107	132573.7	52881.9	117064.2	40698.4	117842.7	18351.3	143914.4	28880.9
114	2204.8	9974.9	319.5	4559.8	1477.2	9853.4	759.7	16481.9
115	1243.9	9869.2	1890	9918.9		31421.3	1634.2	28009.1
208	159.3	2836.1	423.6	4204.5	139.7	3902	107.8	918.7
210	4131.9	10247.3	3938.2	8960.8	1255.1	12023.3	3650.4	11054.9
217	40065.3	20507.1	29842.4	11944.5	39029.7	5788.1	57253.3	14692.6
310	19411.3	6432.8	20397.9	5802.7	15490.8	4120.3	21375.6	5186
705	16228.5	5230.9	30917	4209.2	7733.1	2621.5	31684.6	5828
1123	8994.3	43880.5	6929.8	33465.2	2710.8	61881.6	13087.1	77189.2
1406	15442.2	47035.3	14156	30676.3	6241.6	41998.9	10449.2	75981.8
1505	4377.1	18480.3	6383.2	10873.4	1229.2	12067.6	3022.6	15528.4
1806	959.1	1815.5		15312		16414.5		7829.3
2104	2279.5	8640.3	3339.2	8946.2	1100.4	13205.8	1572.5	15630.8
2204	1561.2	10048.1	2244.6	8149.2	2129.9	9231.2	3646.4	9510
2306	2578.6	7452.3	2290.4	2345	1376.1	7696.9	2758.2	9712.9
2310	48205.5	5582.9	35809	1355.4	64545.3		36667.1	3998.2
2405	26129.7	5954.6	16043.9	5884.9	48794.4	4843.2	25094.1	5865.6
2413	18446	5578.1	8694.4	4777.2	31601.6	4433.9	16307.3	5854.7
2506	23437.7	2579.9	14523.6	3394.5	27703.9		8535.2	
2702	8173.5	1923.7	7883	1120	16801.3		7056.2	
2707	35215.3	5964.9	18536	10336.5	35094.1	1523.7	7738.9	2171.4
3103	775.2	21987.1	379	6004.2	1173.5	19721.5	2080.1	29427.4
3106	898.1	14038.8	203.6	2797.4	1405.3	11953.3	2462.9	23118.4
3201	8308.5	4755.7	24634.8	2917.9	39501.1	1004.9	15471.1	
3204	23344.2	5170	19965.9	9060.1	22392.5	3167	5918.7	2592.3
3206	15945.2	11301.3	27530.3	5642.3	20647.1	1213.1	34722.1	6436.5
3210	4326.2	8738	3053.6	4797.5	2414.5	10698.9	2542.3	13778.5
3213	59771.7	14645.6	32692.7	924.1	101439.3	2418.9	75874.5	2627.8
3610	20136.8	2438.1	11067.6	3978.3	14560.6		4801.3	1658
3611	11359.7	2801.5	9887.3	3025.2	14700.3	561.5	12995	549.3
3716	121789.7	52635	124510.9	52813.5	151725.2	37122.5	105309.5	16820.8
3803	8216.3	2714	7835.4	2085.9	13994.4	1002.1	5398.2	
3807	7042.8	3496.3	10339.5	3854	17892	2774.3	8482.9	1039.6
3809	6868.7	1346.6	5221	1286.2	7738.8		3647.8	
3810	2374.1	652.3	2921.7	942	2060.7	680	2801	
3812	3974.4	997.5	4904.4	786.5	2641.8	649.1	5625.2	1255.7
3816	1641.5	544	1799.4	389.7	839.3	310.5	1811	

3902		3223.4		3399.8		5807.8	1171.2	3946
3909		2840.3	3281.6	4272	664.5	6249	641	5083.8
4101	1723.6	12531.3	6663.6	9148.4	5434.1	17048.8	3796.2	17946.9
4204	882.6	14943	2908.8	6823	1169.2	10532.3	4571.7	21704.5
4312	1037.3	3292.8		3137.5		6089.5		4103.9
4803				1776.4	523.5	1720.6		2573.7
4809	19611.9	8474.2	31737.5	4829.9	17513.8	1924.3	31131.5	
4819	4354.3	1440.7	5681.6	1918.6	4771.3		6954.1	
5306	7923.2	4788	8791.9	3996.3	15870.8	1400.4	11518.3	1490.4
5507	950.6	7299	543.9	6325.4	755.4	9670.5	1915.8	12960.2
5803	19706.1	8000.2	26066.7	10550	27218.8	3099.1	27226.7	906.3
5807	3084.3	1293.8	3507.6	1979.1	6096.5	1024.1	3533.2	331.2
6004	5400.7	12918.8	2280.6	6632		10764.4	2854.6	16080.7
6204	9523.3	24593.5	10227.6	12592.8	2533.4	28345.6	10274.3	45731.1
6306	90166	29573.9	85127.2	18101.3	50996.7	8642.7	51407.6	5624.4
6308	14863.7	4132	16361.4	10647	26388	4983.3	10038.2	1587.5
7105	1738.9	21869.1	3794.7	11900.4	2125.5	19410.9	2443.8	30298.2
7111	1126.6	12624.9	2460	4414.3	784.3	12253.9	1644.4	26289.2
7211	4801.5	28476.6	8630.4	7681.7	1237.4	24974.7	9453.5	31414.3
7503	8554.1	3112.8	12433.1	3551.9	17565.2	1411.7	5862.6	2586.6
8108	3375	10964	4361	6497.7	949.7	14732.7	2792	25025.2
8112	40977.8	39235.3	97498.9	19817.6	98630.9	17155.2	54510	19023.5
8302	1841	22042.6	5197.1	15343.5	2828.6	37097.7	5443.4	24929
8704	1825.6	798.6	2875	1185.1	4046.8	595.6	1728.7	
8803	6665.8	2286.5	10387	4123.7	10828.6	1872.4	4469.5	634.6

B: Übersicht der massenspektrometrisch identifizierten Proteine

SSP	Acc. Nr.	Protein	Peptide	Seq. Abd.	Nom. Masse	pI	Ratio
102	gi 435585	non-muscle Myosin light chain 3	3	21	15721	4.8	0.26
106	gi 26390517	Nucleophosmin	1	5	24967	4.33	0.14
107	gi 26390517	Nucleophosmin	1	5	24967	4.33	0.28
114	gi 12847801	heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein D-like	2	12	16521	4.9	8.58
115	gi 293691	Laminin B2	1	0	176939	5.08	12.46
208	gi 123681	Heat shock Protein HSP 90-beta (HSP 84)	1	1	83273	4.97	14.28
210	gi 12804959	Proteasome 26S ATPase subunit 5	1	2	45597	7.11	3.26
217	gi 32451985	Nucleophosmin 1	2	7	32540	4.62	0.32
310	gi 5902663	Elongation Factor 1-beta homolog	2	12	24693	4.47	0.28
705	gi 12834876	Reticulocalbin 3	1	5	30144	4.6	0.21
1018	gi 26390517	Nucleophosmin	1	5	24967	4.33	7.64
1123	gi 13529464	Nucleolin Fragment	3	3	76733	4.7	6.82
1406	gi 74208631	HSP70	4	6	70827	5.32	4.23
1505	gi 1661134	Heat Shock 70 Protein	2	3	70793	5.37	3.79
1806	gi 398168	Keratin 2 Epidermis	4	5	70934	8.23	10.78
2003	gi 12846043	PTX isoform	1	2	42440	6.39	3.38
2104	gi 51303	Histone h2b	3	23	13928	10.31	5.6
2204	gi 32451985	Nucleophosmin 1	1	3	32540	4.62	3.85
2306	gi 31418608	Cad protein: Carbamoylphosphate synthase small subunit	2	1	110449	6.11	3.02
2310	gi 32451985	Nucleophosmin 1	2	5	32540	4.62	0.08
2405	negativ						0.19
2413	gi 125069	Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin-10) (CK-10)	5	9	57807	5.01	0.28
2506	gi 10442752	Eukaryotic Translation Elongation Factor 1-delta	5	25	31274	4.91	0.16

2702	negativ						0.15
2707	gi 14165439	heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein K isoform a	9	20	50996	5.19	0.21
3103	gi 53384	Nidogen 1 (Fragment)	3	2	136439	5.22	17.5
3106	gi 51263	p68 RNA Helicase (Fragment)	12	18	69277	9.06	10.44
3204	gi 53165	Modifier 2	3	17	19740	4.96	0.13
3206	gi 32451985	Nucleophosmin 1	2	5	32540	4.62	0.25
3210	gi 109842	Fodrin alpha chain – Mouse (Spectrin repeats)	4	10	43390	5.15	3.08
3213	gi 32451985	Nucleophosmin 1	2	2	32540	4.62	0.08
3610	gi 809561	gamma-Actin	9	26	40992	5.56	0.21
3611	gi 809561	gamma-Actin	8	21	40992	5.56	0.14
3716	gi 12836310	Arginine/serine-rich Splicing Factor 6	8	21	38974	11.44	0.32
3803	gi 14165439	heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein K isoform a	9	20	50996	5.19	0.22
3807	gi 14165439	heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein K isoform a	10	23	50996	5.19	0.26
3809	gi 293689	Lamin B	17	28	66719	5.14	0.22
3810	gi 293689	Lamin B	9	14	66719	5.14	0.3
3812	gi 12860388	Ribosome-Binding Protein 1 (Ribosome Receptor Protein) (mRRp)	7	8	96985	5.8	0.22
3816	gi 37360362	Ribosome-Binding Protein 1 (Ribosome Receptor Protein) (mRRp)	2	2	90251	5.34	0.27
4101	gi 726086	MutS homolog 2 (Fragment)	2	1	104101	5.71	3.22
4204	gi 12963531	non-POU-domain-containing, octamer binding Protein	2	3	54564	8.86	5.67
4312	gi 1718086	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A, ubiquitous Isoform	2	3	68225	5.62	4.01
4809	gi 51452	Heat Shock Protein 65 (HSP60)	12	21	58833	5.48	0.2
4815	gi 32451985	Nucleophosmin 1	2	5	32540	4.62	
4819	gi 575955	Tripeptidyl-Peptidase II	5	3	139790	6.12	0.31

5306	gi 15126569	Splicing Factor, arginine/serine rich 9	5	23	25645	8.74	0.26
5507	gi 14165439	Heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein K Isoform a	5	10	50996	5.19	8.7
5803	gi 14917005	Stress-70 protein, mitochondrial Precursor (75 kDa glucose-regulated protein) (GRP 75)	2	3	73483	5.91	0.23
5807	gi 14917005	Stress-70 protein, mitochondrial Precursor (75 kDa glucose-regulated protein)	1	1	73483	5.91	0.29
6004	gi 17158044	ribosomal Protein S6	1	3	28663	10.85	3.3
6204	gi 37589940	heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein H1	4	9	49168	5.89	3.42
6306	gi 13542859	Peroxiredoxin 3	5	18	28109	7.15	0.22
6308	gi 2062107	Proteasome subunit MC14	4	14	29872	8.14	0.32
6711	gi 37589940	heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein H1	9	22	49168	5.89	
7105	gi 14165439	heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein K isoform a	2	5	50996	5.19	8.26
7111	gi 13938072	Eukaryotic translation elongation factor 2	3	3	95253	6.14	9.24
7211	gi 52865	Lamin A, Isoform A	2	3	65367	6.05	3.84
7503	gi 12833038	Stomatin-like Protein 2	4	10	38506	9.11	0.24
8108	gi 1711240	TIS [Mus musculus]	4	14	28880	8.97	4.99
8112	gi 12846043	PTX1 protein isoform 1	1	2	42440	6.39	0.33
8302	gi 12846043	PTX1 protein isoform 1	1	2	42440	6.39	6.49
8704	gi 7106335	Keratin complex 1, acidic, gene 17	5	10	48132	5	0.33
8803	gi 20071204	Paraspeckle Protein 1	4	7	58721	6.26	0.28

Literaturverzeichnis

- Adler, S., C. Pellizzer, et al. (2006). "The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation." Toxicol In Vitro **20**(3): 265-71.
- Angelov, D. N., S. Arnhold, et al. (1998). "Temporospatial relationships between macroglia and microglia during in vitro differentiation of murine stem cells." Dev Neurosci **20**(1): 42-51.
- Arceci, R. J., A. A. King, et al. (1993). "Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart." Mol Cell Biol **13**(4): 2235-46.
- Arsenian, S., B. Weinhold, et al. (1998). "Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis." Embo J **17**(21): 6289-99.
- Aubert, J., H. Dunstan, et al. (2002). "Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation." Nat Biotechnol **20**(12): 1240-5.
- Bain, G., D. Kitchens, et al. (1995). "Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro." Dev Biol **168**(2): 342-57.
- Bain, G., W. J. Ray, et al. (1996). "Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture." Biochem Biophys Res Commun **223**(3): 691-4.
- Barnea, E. and Y. Bergman (2000). "Synergy of SF1 and RAR in activation of Oct-3/4 promoter." J Biol Chem **275**(9): 6608-19.
- Bates, G. J., S. M. Nicol, et al. (2005). "The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor." Embo J **24**(3): 543-53.
- Bedi, A., B. A. Zehnauer, et al. (1994). "Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia." Blood **83**(8): 2038-44.
- Bertwistle, D., M. Sugimoto, et al. (2004). "Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23." Mol Cell Biol **24**(3): 985-96.
- Bibel, M., J. Richter, et al. (2004). "Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage." Nat Neurosci **7**(9): 1003-9.
- Blakesley, R. W. and J. A. Boezi (1977). "A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G250." Anal Biochem **82**(2): 580-2.
- Boiani, M. and H. R. Scholer (2005). "Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(11): 872-84.
- Boncinelli, E., A. Simeone, et al. (1993). "Homeobox genes in the developing central nervous system." Ann Genet **36**(1): 30-7.

- Boopathi, E., N. Lenka, et al. (2004). "Regulation of murine cytochrome c oxidase Vb gene expression during myogenesis: YY-1 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein (JKTBP1) reciprocally regulate transcription activity by physical interaction with the BERF-1/ZBP-89 factor." J Biol Chem **279**(34): 35242-54.
- Borer, R. A., C. F. Lehner, et al. (1989). "Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm." Cell **56**(3): 379-90.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Bradley, A., M. Evans, et al. (1984). "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines." Nature **309**(5965): 255-6.
- Brady, S. N., Y. Yu, et al. (2004). "ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway." Mol Cell Biol **24**(21): 9327-38.
- Bremer, S. and T. Hartung (2004). "The use of embryonic stem cells for regulatory developmental toxicity testing in vitro--the current status of test development." Curr Pharm Des **10**(22): 2733-47.
- Brüstle, O., K. N. Jones, et al. (1999). "Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants." Science **285**(5428): 754-6.
- Bugler, B., M. Caizergues-Ferrer, et al. (1982). "Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein." Eur J Biochem **128**(2-3): 475-80.
- Burdon, T., I. Chambers, et al. (1999). "Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells." Cells Tissues Organs **165**(3-4): 131-43.
- Burkert, U., T. von Ruden, et al. (1991). "Early fetal hematopoietic development from in vitro differentiated embryonic stem cells." New Biol **3**(7): 698-708.
- Calado, A., N. Treichel, et al. (2002). "Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA." Embo J **21**(22): 6216-24.
- Causevic, M., R. G. Hislop, et al. (2001). "Overexpression and poly-ubiquitylation of the DEAD-box RNA helicase p68 in colorectal tumours." Oncogene **20**(53): 7734-43.
- Chambers, I., D. Colby, et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell **113**(5): 643-55.
- Chambon, P. (1996). "A decade of molecular biology of retinoic acid receptors." Faseb J **10**(9): 940-54.
- Chan, P. K. and F. Y. Chan (1999). "A study of correlation between NPM-translocation and apoptosis in cells induced by daunomycin." Biochem Pharmacol **57**(11): 1265-73.

- Chan, W. Y., Q. R. Liu, et al. (1989). "Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth." Biochemistry **28**(3): 1033-9.
- Chen, C. M., S. Y. Chiang, et al. (1991). "Increased stability of nucleolin in proliferating cells by inhibition of its self-cleaving activity." J Biol Chem **266**(12): 7754-8.
- Chen, Y., N. Pollet, et al. (2001). "Increased XRALDH2 activity has a posteriorizing effect on the central nervous system of *Xenopus* embryos." Mech Dev **101**(1-2): 91-103.
- Chin, L., J. Pomerantz, et al. (1998). "The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene--two products--two pathways." Trends Biochem Sci **23**(8): 291-6.
- Choi, K., M. Kennedy, et al. (1998). "A common precursor for hematopoietic and endothelial cells." Development **125**(4): 725-32.
- Colombo, E., J. C. Marine, et al. (2002). "Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53." Nat Cell Biol **4**(7): 529-33.
- Coucouvani, E. and G. R. Martin (1999). "BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo." Development **126**(3): 535-46.
- Crawford, M. J., C. Lanctot, et al. (1997). "Human and murine PTX1/Ptx1 gene maps to the region for Treacher Collins syndrome." Mamm Genome **8**(11): 841-5.
- Cumano, A., J. C. Ferraz, et al. (2001). "Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution." Immunity **15**(3): 477-85.
- Cumano, A., C. Furlonger, et al. (1993). "Differentiation and characterization of B-cell precursors detected in the yolk sac and embryo body of embryos beginning at the 10- to 12-somite stage." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6429-33.
- Dang, S. M., M. Kyba, et al. (2002). "Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems." Biotechnol Bioeng **78**(4): 442-53.
- Dani, C., A. G. Smith, et al. (1997). "Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro." J Cell Sci **110** (Pt 11): 1279-85.
- Deng, J. S., B. Ballou, et al. (1996). "Internalization of anti-nucleolin antibody into viable HEp-2 cells." Mol Biol Rep **23**(3-4): 191-5.
- Dinsmore, J., J. Ratliff, et al. (1996). "Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation." Cell Transplant **5**(2): 131-43.
- Doetschman, T. C., H. Eistetter, et al. (1985). "The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium." J Embryol Exp Morphol **87**: 27-45.

- Drab, M., H. Haller, et al. (1997). "From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model." Faseb J **11**(11): 905-15.
- Drews, O. (2006). Hämatopoetische Prozesse in spärlichen Aggregaten embryonaler Stammzellen der Maus ("embryoid bodies". Institut für Zellbiologie, ZBiT/Proteomics. Tübingen, Tübingen: 93.
- Dupe, V., M. Davenne, et al. (1997). "In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE)." Development **124**(2): 399-410.
- Durston, A. J., J. van der Wees, et al. (1998). "Retinoids and related signals in early development of the vertebrate central nervous system." Curr Top Dev Biol **40**: 111-75.
- Endoh, H., K. Maruyama, et al. (1999). "Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha." Mol Cell Biol **19**(8): 5363-72.
- Erard, M., F. Lakhdar-Ghazal, et al. (1990). "Repeat peptide motifs which contain beta-turns and modulate DNA condensation in chromatin." Eur J Biochem **191**(1): 19-26.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-6.
- Fang, S. H. and N. H. Yeh (1993). "The self-cleaving activity of nucleolin determines its molecular dynamics in relation to cell proliferation." Exp Cell Res **208**(1): 48-53.
- Fox, A. H., Y. W. Lam, et al. (2002). "Paraspeckles: a novel nuclear domain." Curr Biol **12**(1): 13-25.
- Fraichard, A., O. Chassande, et al. (1995). "In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons." J Cell Sci **108 (Pt 10)**: 3181-8.
- Frey, J. R., R. Peck, et al. (1991). "Antiproliferative activity of retinoids, interferon alpha and their combination in five human transformed cell lines." Cancer Lett **57**(3): 223-7.
- Godin, I. E., J. A. Garcia-Porrero, et al. (1993). "Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors." Nature **364**(6432): 67-70.
- Gorry, P., T. Lufkin, et al. (1994). "The cellular retinoic acid binding protein I is dispensable." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 9032-6.
- Gottschalk, A., J. Tang, et al. (1998). "A comprehensive biochemical and genetic analysis of the yeast U1 snRNP reveals five novel proteins." Rna **4**(4): 374-93.
- Gotz, M., A. Stoykova, et al. (1998). "Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex." Neuron **21**(5): 1031-44.
- Gould, A., N. Itasaki, et al. (1998). "Initiation of rhombomeric Hoxb4 expression requires induction by somites and a retinoid pathway." Neuron **21**(1): 39-51.
- Graves, L. M., H. I. Guy, et al. (2000). "Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase." Nature **403**(6767): 328-32.

- Grisendi, S., R. Bernardi, et al. (2005). "Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis." Nature **437**(7055): 147-53.
- Gruss, P. and M. Kessel (1991). "Axial specification in higher vertebrates." Curr Opin Genet Dev **1**(2): 204-10.
- Guo, X., W. Ying, et al. (2001). "Proteomic characterization of early-stage differentiation of mouse embryonic stem cells into neural cells induced by all-trans retinoic acid in vitro." Electrophoresis **22**(14): 3067-75.
- Hamburger, V., J. K. Brunso-Bechtold, et al. (1981). "Neuronal death in the spinal ganglia of the chick embryo and its reduction by nerve growth factor." J Neurosci **1**(1): 60-71.
- Hartfuss, E., E. Forster, et al. (2003). "Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation." Development **130**(19): 4597-609.
- Hemmati-Brivanlou, A. and D. Melton (1997). "Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise." Cell **88**(1): 13-7.
- Herrmann, B. G., S. Labeit, et al. (1990). "Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse." Nature **343**(6259): 617-22.
- Hole, N., G. J. Graham, et al. (1996). "A limited temporal window for the derivation of multilineage repopulating hematopoietic progenitors during embryonal stem cell differentiation in vitro." Blood **88**(4): 1266-76.
- Honda, R. and H. Yasuda (1999). "Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53." Embo J **18**(1): 22-7.
- Huang, M., P. Kozlowski, et al. (2002). "Caspase-dependent cleavage of carbamoyl phosphate synthetase II during apoptosis." Mol Pharmacol **61**(3): 569-77.
- Imamoto, N., Y. Matsuoka, et al. (1992). "Antibodies against 70-kD heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins." J Cell Biol **119**(5): 1047-61.
- Itahana, K., K. P. Bhat, et al. (2003). "Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation." Mol Cell **12**(5): 1151-64.
- Johnson, G. R. and M. A. Moore (1975). "Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis." Nature **258**(5537): 726-8.
- Jordan, G. (1987). "At the heart of the nucleolus." Nature **329**(6139): 489-90.
- Kato, K., K. Yamanaka, et al. (1999). "Dimethylarsinic acid exposure causes accumulation of Hsp72 in cell nuclei and suppresses apoptosis in human alveolar cultured (L-132) cells." Biol Pharm Bull **22**(11): 1185-8.
- Kawasaki, H., K. Mizuseki, et al. (2000). "Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity." Neuron **28**(1): 31-40.

- Keller, G., M. Kennedy, et al. (1993). "Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture." Mol Cell Biol **13**(1): 473-86.
- Kennedy, M., M. Firpo, et al. (1997). "A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis." Nature **386**(6624): 488-93.
- Kerr, L. E., J. L. Birse-Archbold, et al. (2007). "Nucleophosmin is a novel Bax chaperone that regulates apoptotic cell death." Oncogene **26**(18): 2554-62.
- Kessel, M. and P. Gruss (1991). "Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid." Cell **67**(1): 89-104.
- Kim, J. H., J. M. Auerbach, et al. (2002). "Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease." Nature **418**(6893): 50-6.
- Klose, J. (1975). "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals." Humangenetik **26**(3): 231-43.
- Kolm, P. J. and H. L. Sive (1997). "Retinoids and posterior neural induction: a reevaluation of Nieuwkoop's two-step hypothesis." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **62**: 511-21.
- Kondo, T., N. Minamino, et al. (1997). "Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity." Oncogene **15**(11): 1275-81.
- Korgaonkar, C., J. Hagen, et al. (2005). "Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function." Mol Cell Biol **25**(4): 1258-71.
- Krecic, A. M. and M. S. Swanson (1999). "hnRNP complexes: composition, structure, and function." Curr Opin Cell Biol **11**(3): 363-71.
- Krumlauf, R. (1994). "Hox genes in vertebrate development." Cell **78**(2): 191-201.
- Kurki, S., K. Peltonen, et al. (2004). "Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation." Cancer Cell **5**(5): 465-75.
- Kwok, S. C., X. Liu, et al. (2001). "Molecular cloning, expression, localization, and gene organization of PTX1, a human nuclear protein that is downregulated in prostate cancer." DNA Cell Biol **20**(6): 349-57.
- Kyba, M. and G. Q. Daley (2003). "Hematopoiesis from embryonic stem cells: lessons from and for ontogeny." Exp Hematol **31**(11): 994-1006.
- Kyba, M., R. C. Perlingeiro, et al. (2002). "HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors." Cell **109**(1): 29-37.
- Lammer, E. J., D. T. Chen, et al. (1985). "Retinoic acid embryopathy." N Engl J Med **313**(14): 837-41.
- Lanza, R. P., J. B. Cibelli, et al. (1999). "Human therapeutic cloning." Nat Med **5**(9): 975-7.

- Lapeyre, B., H. Bourbon, et al. (1987). "Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(6): 1472-6.
- Li, J., X. Zhang, et al. (2004). "Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53." J Biol Chem **279**(40): 41275-9.
- Li, M., L. Pevny, et al. (1998). "Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection." Curr Biol **8**(17): 971-4.
- Lohrum, M. A., D. B. Woods, et al. (2001). "C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export." Mol Cell Biol **21**(24): 8521-32.
- Maden, M. (1999). "Heads or tails? Retinoic acid will decide." Bioessays **21**(10): 809-12.
- Malatesta, P., M. A. Hack, et al. (2003). "Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate." Neuron **37**(5): 751-64.
- Marshall, H., M. Studer, et al. (1994). "A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene Hoxb-1." Nature **370**(6490): 567-71.
- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **78**(12): 7634-8.
- McDonald, J. W. and M. J. Howard (2002). "Repairing the damaged spinal cord: a summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination." Prog Brain Res **137**: 299-309.
- Medvinsky, A. and E. Dzierzak (1996). "Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region." Cell **86**(6): 897-906.
- Metcalf, D. D., D. Baram, et al. (1997). "Mast cells." Physiol Rev **77**(4): 1033-79.
- Mikkola, H. K., Y. Fujiwara, et al. (2003). "Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo." Blood **101**(2): 508-16.
- Millauer, B., S. Witzigmann-Voos, et al. (1993). "High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis." Cell **72**(6): 835-46.
- Misson, J. P., M. A. Edwards, et al. (1988). "Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker." Brain Res Dev Brain Res **44**(1): 95-108.
- Moore, M. A. and D. Metcalf (1970). "Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo." Br J Haematol **18**(3): 279-96.
- Nakano, T., H. Kodama, et al. (1994). "Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture." Science **265**(5175): 1098-101.

- Narita, M., S. Shimizu, et al. (1998). "Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14681-6.
- Naujokat, C. and S. Hoffmann (2002). "Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis." Lab Invest **82**(8): 965-80.
- Niizuma, H., Y. Nakamura, et al. (2006). "Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma." Oncogene **25**(36): 5046-55.
- Nishikawa, S. I., S. Nishikawa, et al. (1998). "In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos." Immunity **8**(6): 761-9.
- Niwa, H., T. Burdon, et al. (1998). "Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3." Genes Dev **12**(13): 2048-60.
- O'Farrell, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." J Biol Chem **250**(10): 4007-21.
- Okamoto, K., H. Okazawa, et al. (1990). "A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells." Cell **60**(3): 461-72.
- Okazawa, H., J. Shimizu, et al. (1996). "Bcl-2 inhibits retinoic acid-induced apoptosis during the neural differentiation of embryonal stem cells." J Cell Biol **132**(5): 955-68.
- Okuda, M. (2002). "The role of nucleophosmin in centrosome duplication." Oncogene **21**(40): 6170-4.
- Okuda, M., H. F. Horn, et al. (2000). "Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication." Cell **103**(1): 127-40.
- Okumura, K., K. Nakamachi, et al. (2000). "Identification of a novel retinoic acid-responsive element within the lamin A/C promoter." Biochem Biophys Res Commun **269**(1): 197-202.
- Okuwaki, M., K. Matsumoto, et al. (2001). "Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone." FEBS Lett **506**(3): 272-6.
- Olson, M. O., M. N. Kirstein, et al. (1990). "Limited proteolysis as a probe of the conformation and nucleic acid binding regions of nucleolin." Biochemistry **29**(24): 5682-6.
- Oppenheim, R. W., D. Prevette, et al. (1991). "Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor." Science **251**(5001): 1616-8.
- Ozawa, M. (1995). "Structure of the gene encoding mouse reticulocalbin, a novel endoplasmic reticulum-resident Ca(2+)-binding protein with multiple EF-hand motifs." J Biochem (Tokyo) **118**(1): 154-60.
- Ozawa, M. and T. Muramatsu (1993). "Reticulocalbin, a novel endoplasmic reticulum resident Ca(2+)-binding protein with multiple EF-hand motifs and a carboxyl-terminal HDEL sequence." J Biol Chem **268**(1): 699-705.

- Ozpolat, B., U. Akar, et al. (2007). "Programmed cell death-4 tumor suppressor protein contributes to retinoic acid-induced terminal granulocytic differentiation of human myeloid leukemia cells." Mol Cancer Res **5**(1): 95-108.
- Pasternack, M. S., K. J. Bleier, et al. (1991). "Granzyme A binding to target cell proteins. Granzyme A binds to and cleaves nucleolin in vitro." J Biol Chem **266**(22): 14703-8.
- Pease, S., P. Braghetta, et al. (1990). "Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF)." Dev Biol **141**(2): 344-52.
- Perlingeiro, R. C., M. Kyba, et al. (2001). "Clonal analysis of differentiating embryonic stem cells reveals a hematopoietic progenitor with primitive erythroid and adult lymphoid-myeloid potential." Development **128**(22): 4597-604.
- Piccolo, S., Y. Sasai, et al. (1996). "Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4." Cell **86**(4): 589-98.
- Pinol-Roma, S., M. S. Swanson, et al. (1989). "A novel heterogeneous nuclear RNP protein with a unique distribution on nascent transcripts." J Cell Biol **109**(6 Pt 1): 2575-87.
- Plachta, N., M. Bibel, et al. (2004). "Developmental potential of defined neural progenitors derived from mouse embryonic stem cells." Development **131**(21): 5449-56.
- Pouchelet, M., E. St-Pierre, et al. (1983). "Localization of the 70 000 dalton heat-induced protein in the nuclear matrix of BHK cells." Exp Cell Res **149**(2): 451-9.
- Pownall, M. E., A. S. Tucker, et al. (1996). "eFGF, Xcad3 and Hox genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in *Xenopus*." Development **122**(12): 3881-92.
- Quinn, T. P., K. G. Peters, et al. (1993). "Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(16): 7533-7.
- Reardon, M. A. and G. Weber (1985). "Increased carbamoyl-phosphate synthetase II concentration in rat hepatomas: immunological evidence." Cancer Res **45**(9): 4412-5.
- Rohwedel, J., K. Guan, et al. (1999). "Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro." Cells Tissues Organs **165**(3-4): 190-202.
- Rohwedel, J., K. Guan, et al. (1998). "Loss of beta1 integrin function results in a retardation of myogenic, but an acceleration of neuronal, differentiation of embryonic stem cells in vitro." Dev Biol **201**(2): 167-84.
- Rolletschek, A., P. Blyszczuk, et al. (2004). "Embryonic stem cell-derived cardiac, neuronal and pancreatic cells as model systems to study toxicological effects." Toxicol Lett **149**(1-3): 361-9.
- Rolletschek, A., H. Chang, et al. (2001). "Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors." Mech Dev **105**(1-2): 93-104.

- Savkur, R. S. and M. O. Olson (1998). "Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease." Nucleic Acids Res **26**(19): 4508-15.
- Schilling, T. F. and R. D. Knight (2001). "Origins of anteroposterior patterning and Hox gene regulation during chordate evolution." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1414): 1599-613.
- Scholer, H. R., S. Ruppert, et al. (1990). "New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4." Nature **344**(6265): 435-9.
- Shav-Tal, Y. and D. Zipori (2002). "PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins." FEBS Lett **531**(2): 109-14.
- Shiotsugu, J., Y. Katsuyama, et al. (2004). "Multiple points of interaction between retinoic acid and FGF signaling during embryonic axis formation." Development **131**(11): 2653-67.
- Shivdasani, R. A., E. L. Mayer, et al. (1995). "Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL." Nature **373**(6513): 432-4.
- Sigoillot, F. D., D. H. Kotsis, et al. (2005). "Nuclear localization and mitogen-activated protein kinase phosphorylation of the multifunctional protein CAD." J Biol Chem **280**(27): 25611-20.
- Simeone, A., D. Acampora, et al. (1991). "Differential regulation by retinoic acid of the homeobox genes of the four HOX loci in human embryonal carcinoma cells." Mech Dev **33**(3): 215-27.
- Simon, M. C., L. Pevny, et al. (1992). "Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1- mouse embryonic stem cells." Nat Genet **1**(2): 92-8.
- Sive, H. L., B. W. Draper, et al. (1990). "Identification of a retinoic acid-sensitive period during primary axis formation in *Xenopus laevis*." Genes Dev **4**(6): 932-42.
- Smith, A. G., J. K. Heath, et al. (1988). "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides." Nature **336**(6200): 688-90.
- Solter, D. and B. B. Knowles (1978). "Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1)." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(11): 5565-9.
- Spector, D. L., R. L. Ochs, et al. (1984). "Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23." Chromosoma **90**(2): 139-48.
- Srivastava, M. and H. B. Pollard (1999). "Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights." Faseb J **13**(14): 1911-22.
- Stevens, R. L. and K. F. Austen (1989). "Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells." Immunol Today **10**(11): 381-6.
- Stevenson, R. J., S. J. Hamilton, et al. (1998). "Expression of the 'dead box' RNA helicase p68 is developmentally and growth regulated and correlates with organ differentiation/maturation in the fetus." J Pathol **184**(4): 351-9.

- Stewart, C. L., P. Kaspar, et al. (1992). "Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor.[see comment]." Nature **359**(6390): 76-9.
- Strubing, C., G. Ahnert-Hilger, et al. (1995). "Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons." Mech Dev **53**(2): 275-87.
- Swindell, E. C., C. Thaller, et al. (1999). "Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo." Dev Biol **216**(1): 282-96.
- Takahashi, A., E. S. Alnemri, et al. (1996). "Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8395-400.
- Takahashi, K., K. Tanabe, et al. (2007). "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors." Cell.
- Takimoto, M., T. Tomonaga, et al. (1993). "Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human c-myc promoter, in vitro." J Biol Chem **268**(24): 18249-58.
- Taylor, S. M. and P. A. Jones (1979). "Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine." Cell **17**(4): 771-9.
- Thomas, K. R. and M. R. Capecchi (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." Cell **51**(3): 503-12.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-7.
- Tsai, M., T. Takeishi, et al. (1991). "Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(14): 6382-6.
- Tuteja, N., N. W. Huang, et al. (1995). "Human DNA helicase IV is nucleolin, an RNA helicase modulated by phosphorylation." Gene **160**(2): 143-8.
- Vasios, G. W., J. D. Gold, et al. (1989). "A retinoic acid-responsive element is present in the 5' flanking region of the laminin B1 gene." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(23): 9099-103.
- Vogelstein, B., D. Lane, et al. (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-10.
- Welch, W. J. and J. R. Feramisco (1984). "Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells." J Biol Chem **259**(7): 4501-13.
- Wiebel, F. F., V. Rennekampff, et al. (2002). "Generation of mice carrying conditional knockout alleles for the transcription factor SRF." Genesis **32**(2): 124-6.
- Wiles, M. V. and G. Keller (1991). "Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture." Development **111**(2): 259-67.

- Wilhelm, T. (2004). Proteomanalytische Identifikation differenzierungsabhängiger Faktoren in "Embryoid Bodies" muriner ES-Zellen. Institut für Zellbiologie, Abteilung Molekularbiologie. Tübingen, Universität Tübingen: 85.
- Wilkinson, D. G., S. Bhatt, et al. (1990). "Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation." Nature **343**(6259): 657-9.
- Williams, R. L., D. J. Hilton, et al. (1988). "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells." Nature **336**(6200): 684-7.
- Wilmut, I., A. E. Schnieke, et al. (1997). "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells." Nature **385**(6619): 810-3.
- Wobus, A. M., H. Holzhausen, et al. (1984). "Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo." Exp Cell Res **152**(1): 212-9.
- Wobus, A. M., G. Kaomei, et al. (1997). "Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes." J Mol Cell Cardiol **29**(6): 1525-39.
- Wobus, A. M., G. Wallukat, et al. (1991). "Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers." Differentiation **48**(3): 173-82.
- Wolter, K. G., Y. T. Hsu, et al. (1997). "Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis." J Cell Biol **139**(5): 1281-92.
- Wu, M. H. and B. Y. Yung (2002). "UV stimulation of nucleophosmin/B23 expression is an immediate-early gene response induced by damaged DNA." J Biol Chem **277**(50): 48234-40.
- Yamada, N., H. Matsushima, et al. (2003). "Generation of a large number of connective tissue type mast cells by culture of murine fetal skin cells." J Invest Dermatol **121**(6): 1425-32.
- Yang, H. S., A. P. Jansen, et al. (2003). "The transformation suppressor Pcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation." Mol Cell Biol **23**(1): 26-37.
- Yang, T. H., W. H. Tsai, et al. (1994). "Purification and characterization of nucleolin and its identification as a transcription repressor." Mol Cell Biol **14**(9): 6068-74.
- Yoder, M. C. and K. Hiatt (1997). "Engraftment of embryonic hematopoietic cells in conditioned newborn recipients." Blood **89**(6): 2176-83.
- Zeller, K. I., T. J. Haggerty, et al. (2001). "Characterization of nucleophosmin (B23) as a Myc target by scanning chromatin immunoprecipitation." J Biol Chem **276**(51): 48285-91.
- Zhang, Y., J. S. Wang, et al. (2004). "Repression of hsp90beta gene by p53 in UV irradiation-induced apoptosis of Jurkat cells." J Biol Chem **279**(41): 42545-51.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Interfakultären Institut für Zellbiologie in der Arbeitsgruppe ZBiT/Proteomics der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Alfred Nordheim danke ich sehr herzlich für die Aufnahme am Institut und seine wissenschaftliche Beratung bei der Anfertigung dieser Promotion.

Herrn Prof. Dr. Stefan Stevanovic möchte ich mich für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Vor allem möchte ich Herrn Dr. Winfried Kammer für die umfassende wissenschaftliche Ausbildung, sowie für seine hervorragende Leitung unserer Arbeitsgruppe ZBiT/ Proteomics danken.

Herrn Johannes Madlung danke ich für seine Unterstützung bei der LC-MS/MS-Analyse.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Sieglinde Haug und Frau Birsén Yurbas, die mit ihrer herzlichen Art den Laboralltag aufheiterten.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Heidi und meiner Familie für die in jeder Hinsicht immerwährende Unterstützung meines Studiums und meiner Promotion bedanken.

Lebenslauf

Thomas Wilhelm
geb. am 10.10.1971 in Bad Salzungen

Schulische Ausbildung

1978 - 1988 Magnus Poser Oberschule Bad Salzungen
1994 - 1997 Abendgymnasium Göppingen

Berufsausbildung

1988 - 1990 VEB Stilmöbel Barchfeld

Berufstätigkeit

1990 - 1997 Fa. Barth Industrieverpackungen Donzdorf

Zivildienst

1997 - 1998 Klinik Am Eichert Göppingen

Studium

1998 - 2004 Studium der Biologie an der Eberhard Karls Universität
Tübingen
Diplomarbeit: „Proteomanalytische Identifikation
differenzierungsabhängiger Faktoren in „Embryoid Bodies“
muriner ES-Zellen“ am Lehrstuhl für Molekulare
Zellbiologie der Universität Tübingen
2004 - 2007 Doktorarbeit am Interfakultären Institute für Zellbiologie in
der Arbeitsgruppe ZBiT/Proteomics der Universität
Tübingen

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Entwicklung und Anwendung neuer Analyseverfahren zur Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen“ selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nicht verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, den 28.11.2007