

Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Tübingen

Erzeugung von otischen Vorläuferzellen aus humanen
induzierten pluripotenten Stammzellen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

Der medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Schmid, Jörg

Tübingen

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Löwenheim

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. J. Gloeckner

Tag der Disputation: 08.09.2020

Widmung

Für Katrin, meine Eltern und meine Schwester.

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
1.1 Hörverlust beim Menschen	1
1.1.1 Pathogenese des Hörverlusts	2
1.2 Biologische Modelle des Innenohrs für die Medikamententestung	3
1.3 Entwicklung und Embryologie des Innenohrs.....	5
1.3.1 Embryologie des Innenohrs im Menschen	5
1.3.2 Relevante beteiligte Signalwege und Gene	6
1.4 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSZ)	9
1.4.1 Erzeugung von hiPSZ aus Fibroblasten	10
1.4.2 <i>In vitro</i> Differenzierung von hiPSZ und embryonalen Stammzellen zu otischen Vorläuferzellen	10
1.5 Fragestellung	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Zellkulturen von Mausembryonalen Fibroblasten (MEF) und hiPSZ.....	15
2.1.1 Handhabung und Splitten der MEF Zellen	15
2.1.2 Handhabung und Splitten der hiPSZ	16
2.1.3 Nachweis der Pluripotenz der hiPSZ	17
2.1.4 Differenzieren von hiPSZ zu otischen Vorläuferzellen	18
2.2 Immunzytochemische Färbung der differenzierten otischen Vorläuferzellen	24
2.2.1 Fixieren, Permeabilisieren und Blocken der differenzierten otischen Vorläuferzellen	24
2.2.2 Vorbereitung und Anwendung der Primärantikörper	25
2.2.3 Vorbereitung und Anwendung von Sekundärantikörpern und Gegenfärbung	26
2.3 Mikroskopie von immunzytochemisch gefärbten differenzierten otischen Vorläuferzellen	27
2.3.1 High Content Screening der immunzytochemisch gefärbten differenzierten otischen Vorläuferzellen	27
2.3.2 Qualitative Mikroskopie der immunzytochemisch gefärbten differenzierten otischen Vorläuferzellen	28
2.4 RT-qPCR Analyse der differenzierten otischen Vorläuferzellen (Fluidigm™)	28
2.4.1 Isolation von RNA aus differenzierten otischen Vorläuferzellen	29
2.4.2 Reverse Transkription der extrahierten RNA zu cDNA.....	30
2.4.3 Analyse der Fluidigm™ Daten	31

2.5 Sonstige Materialien.....	32
3. Ergebnisse	34
3.1 Untersuchung der Pluripotenz der hiPSZ.....	34
3.2 Differenzierung der hiPSZ zu Zellen des nicht-neuronalen Ektoderm (NNE)	37
3.2.1 Fluoreszenzmikroskopie der Zellen des NNE auf 24-Well Platten	37
3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie der Zellen des NNE auf 96-Well Platten	40
3.3 Differenzierung der hiPSZ zu otischen Progenitorzellen (OPZ)	46
3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie der otischen Progenitorzellen nach 20 Tagen Behandlung auf 96-Well Platten	49
3.4 Untersuchungen der Genexpression der otischen Vorläuferzellen mittels multi-qPCR (Fluidigm™)	52
3.4.1 Vergleich der Zelllinien und Inkubationszeit.....	52
3.4.2 Unterschiede in der Genexpression der Zellen durch NNE-Behandlung	55
3.4.3 NNE und OPZ im Vergleich	60
3.4.4 Unterschiede durch OPZ-Behandlung	60
4. Diskussion	62
4.1 Methodische Aspekte.....	63
4.1.1 Besonderheiten der Fluidigm™ Analyse	63
4.1.2 Notwendigkeit eines Mikromillieus für die Entwicklung der Zellen.....	64
4.2 Erzeugung von nicht-neuronalem Ektoderm.....	65
4.2.1 Expressionsmuster der untersuchten Gene in den differenzierten Zellen	65
4.2.2 SIX1 als Marker in der Entwicklung otischer Vorläuferzellen	66
4.3 Erzeugung von späteren otischen Vorläuferzellen	67
4.3.1 Betrachtung der benötigten Zeitspanne zur Differenzierung der otischen Vorläuferzellen	68
4.3.2 Expressionsmuster und Charakteristika der differenzierten otischen Vorläuferzellen	68
4.3.3 Einflüsse einer WNT-Aktivierung und Inhibition auf die Genexpression der otischen Vorläuferzellen	69
4.3.4 Einflüsse einer kurzzeitigen BMP-Inhibition auf die Genexpression der otischen Vorläuferzellen	70
4.4 Ausblick	71
5. Zusammenfassung.....	73
6. Literaturverzeichnis	75
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	79
8. Anhang.....	80
9. Danksagung	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Corti'schen Organs (Querschnitt).	3
Abbildung 2: Auswahl entscheidender Gene entlang der Entwicklung otischer Vorläuferzellen bei Wirbeltieren (verändert nach Ealy et. al 2016).....	9
Abbildung 3: Übersicht über den Ablauf der Differenzierung der hiPSZ und verwendete Signalwegmodulatoren.....	12
Abbildung 4: Aufschlüsselung der 8 Behandlungsansätze zur Differenzierung der Zellen in den ersten 8 Tagen zu NNE.....	20
Abbildung 5: Immunfluoreszenzmikroskopie der Pluripotenzmarker und anderer otischer Marker in hiPS-Zellen.....	36
Abbildung 6: Expression der NNE-Marker in 8 Tage behandelten Zellen.	38
Abbildung 7: Einfluss der Behandlung auf die Zellzahl pro Well nach 8 Tagen Inkubation (NNE) in unterschiedlichen Medien.	42
Abbildung 8: Anzahl der markerpositiven Zellen der Zelllinie K9.7 (A) und K7.1 (B) nach 8 Tagen Inkubation (NNE) in %.	44
Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopie von Zellen der Standardbehandlung und Behandlung 5 nach 8 Tagen Inkubation (NNE).....	45
Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahme des Zellrasens auf einer 6-well Platte an DIV16.....	47
Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Zellen der Linie K9.7 nach OPZ-Behandlung.....	48
Abbildung 12: Quantitative Analyse der unterschiedlich differenzierten Zellen der Linie K9.7 nach insgesamt 20 Tagen Behandlung.....	50
Abbildung 13: Anzahl DAPI positiver Zellen pro Well (96-Well Platten) nach insgesamt 20 Tagen Behandlung abhängig von der vorausgegangenen NNE-Behandlung.	51
Abbildung 14: t-SNE Darstellung der Proben in der Fluidigm™ Genanalyse in Abhängigkeit der Zellreihe.	53
Abbildung 15: t-SNE Darstellung der Proben in der Fluidigm Genanalyse, aufgeschlüsselt nach NNE-Behandlung.	56
Abbildung 16: t-SNE Darstellung der Proben der Fluidigm™ Genanalyse, aufgeschlüsselt nach der Expression ausgesuchter otischer Gene.	59
Abbildung 17: t-SNE Darstellung der Proben der Fluidigm™ Genanalyse, aufgeschlüsselt nach OPZ-Behandlung.	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung von iPS-Medium und MEF-Medium.....	17
Tabelle 2: Komponenten des 5% KOSR Differenzierungsmediums.....	23
Tabelle 3: Substanzen bzw. Signalwegmodulatoren für die Differenzierung der hiPSZ zu otischen Vorläuferzellen.....	23
Tabelle 4: Übersicht der Arbeitsabläufe: Fixieren, Permeabilisieren und Blocken der zu analysierenden Zellen.....	24
Tabelle 5: Reagenzien für den Färbeprozess der zu analysierenden Zellen.....	25
Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper für die NNE-Färbung.....	25
Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper für die Färbung der verschiedenen differenzierten otischen Vorläuferzellen und der pluripotenten Zellen.....	25
Tabelle 8: Sekundärantikörper für die immunzytochemische Färbung der zu analysierenden Zellen.....	26
Tabelle 9: Vorgehen bei der immunzytochemischen Färbung der zu analysierenden Zellen.....	27
Tabelle 10: Vorgehen zur Isolation von RNA aus differenzierten Zellen.....	29
Tabelle 11: Quantifizierung der extrahierten RNA mit dem Qubit® RNA BR Assay Kit.	30
Tabelle 12: Vorgehen bei der reversen Transkription von RNA zu cDNA.....	30
Tabelle 13: Sonstige Materialien der Zellkultur und Analysemethoden.....	32
Tabelle 14: Verwendete Platten in der Zellkultur.....	32
Tabelle 15: Verwendete Pipetten, Spitzen und Reaktionsgefäße in der Zellkultur und Analyse.....	32
Tabelle 16: Verwendete Laborgeräte in der Zellkultur und Analyse.....	33
Tabelle 17: Gene, die in 8 Tage induzierten Zellen (NNE) signifikant höher exprimiert sind als in 18 Tagen induzierten Zellen (OPZ), sowie die Spezifität dieser Gene.	53
Tabelle 18: Gene, die in 18 Tage induzierten Zellen (OPZ) signifikant höher exprimiert sind als in 8 Tage induzierten Zellen (NNE), sowie die Spezifität dieser Gene. ...	54
Tabelle 19: Gene, die bei DIV18-Zellen der NNE-Behandlung 6 signifikant höher exprimiert sind als im Durchschnitt der DIV18 OP-Zellen, sowie die Spezifität dieser Gene.....	57
Tabelle 20: Gene, die im Durchschnitt der DIV18 OP-Zellen signifikant höher exprimiert sind als bei DIV18-Zellen der NNE-Behandlung 6, sowie die Spezifität dieser Gene.....	57

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AHZ	Äußere Haarzelle
AK	Antikörper
β-ME	2-Mercaptoethanol
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin (Kälberserumalbumin)
c	Konzentration
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
dB	Dezibel
DIV	Day <i>in vitro</i> (Tage <i>in vitro</i> , Start bei DIV0)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribose Nuklease
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DZ	Deiter'sche Zellen
ESZ	Embryonale Stammzellen
FBS	Fetal Bovine Serum (fötales Kälberserum)
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gravitationskoeffizient
hiPSZ	Humane induzierte pluripotente Stammzellen
HZ	Haarzelle
IGF	Insulin-like Growth Factor
iPSZ	Induzierte pluripotente Stammzellen
IHZ	Innere Haarzelle
KO	Knock out
KOSR	Knock Out Serum Replacement
Max.	Maximal
MDB	Membrane Desalting Buffer (Membranentsalzungspuffer)
MEF	Mausembryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
µl	Mikroliter
NEAA	Non-Essential Amino Acids (nicht-essenzielle Aminosäuren)
ng	Nanogramm
NNE	Nicht-neurales Ektoderm
NR	Nummer
OPZ	Otische Progenitorzellen

p	Statistischer p-Wert
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Lösung)
PFA	Paraformaldehyd
PPE	Präplakodales Ektoderm (Panplakodales Ektoderm)
PZ	Pfeilerzellen
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
rhIFG	Recombinant Human Insulin-like Growth Factor
rhBMP	Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
t-SNE	t-distributed stochastic neighbor embedding
X	-fach

1. Einführung

Hörverlust ist laut der WHO eine der sechs häufigsten Erkrankungen, die die Lebensqualität am meisten beeinträchtigen. Bis zu 360 Millionen Menschen sind davon weltweit betroffen (WHO, 2017). Alle heute verfügbaren Modelle zur Erforschung von Hörverlust weisen substanzielle Schwächen auf, die die Entwicklung kausaler Therapien verlangsamen. Die Technologie der humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSZ) birgt das Potential, verschiedenste menschliche Zelltypen für die biomedizinische Forschung bereit zu stellen. Ziel dieser Arbeit ist es, ein zelluläres Modell des Innenohrs basierend auf hiPSZ weiterzuentwickeln, um die Mechanismen des Hörverlustes sowie dessen Vermeidung und die Möglichkeiten für kausale Therapien zu erforschen.

1.1 Hörverlust beim Menschen

Als Hörverlust bezeichnet man eine Minderung des Hörvermögens, deren Ausmaß nach einer Definition der WHO von einer leichten Schwerhörigkeit (26-40dB Abnahme des Hörvermögens) bis zur völligen Ertaubung (>80dB Abnahme) reicht. Nach neueren epidemiologischen Untersuchungen wird die Zahl der Menschen in Deutschland, die nach WHO-Kriterien von Schwerhörigkeit betroffen sind, auf 16% der Bevölkerung geschätzt. Zusätzlich muss auf Grund des demographischen Wandels von einem Anstieg der Prävalenz um etwa 1% pro Jahrfünft gerechnet werden (von Gablenz et al., 2017, von Gablenz and Holube, 2015). Da nahezu jegliche soziale Interaktion von der Sinneswahrnehmung des Hörens abhängig ist, bedeutet ein Hörverlust einen massiven Verlust von Lebensqualität für die Patienten. Auch der volkswirtschaftliche Schaden durch den Verlust der Arbeitsfähigkeit sowie durch Krankheitstage ist enorm (Shield, 2006). Aktuelle Therapien zielen darauf ab, das Resthörvermögen besser zu nutzen, oder im Falle eines Cochleaimplantats beschädigte Strukturen im Innenohr zu überbrücken (Roberson and Rubel, 1994). Kausale Therapien sind bis heute nicht vorhanden.

1.1.1 Pathogenese des Hörverlusts

Unterschiedliche Ätiologie des Hörverlusts

Die häufigsten Ursachen einer Hörminderung sind zum einen die Schalleitungsschwerhörigkeit, deren pathologisches Korrelat vor allem eine gestörte Weiterleitung des Schalls vom Außenohr über das Mittelohr zum Innenohr ist. Schallempfindungsschwerhörigkeit oder sensorineurale Schwerhörigkeit, zum Anderen, bezeichnet eine Schädigung oder den Verlust der Haarsinneszellen, Stützzellen oder Neurone im Innenohr und im zentralen Nervensystem (Nadol, 1993). Die Ursachen der sensorineuralen Schwerhörigkeit sind vielfältig: von angeborener bzw. genetisch bedingter Schwerhörigkeit über Altersschwerhörigkeit (Presbyakusis) bis hin zu Schäden durch Infektionen sowie akuten und chronischen Schalltraumen. Ungewollte Arzneimittelwirkungen von teils sehr weit verbreiteten und häufig eingesetzten Medikamenten stellen vermeidbare Auslöser für Schwerhörigkeit dar, wie zum Beispiel die Gruppe der Aminoglykosidantibiotika (Huth et al., 2011) oder bestimmte platinhaltige Zytostatika (Laurell and Bagger-Sjoback, 1991). Die ototoxischen Nebenwirkungen schränken oft die therapeutische Breite von Medikamenten und somit deren Effizienz stark ein (Huth et al., 2011).

Strukturelle Ursachen

Auf histologischer Ebene liegt die Ursache des sensorineuralen Hörverlusts in der Schädigung bestimmter Strukturen im Corti'schen Organ im Innenohr (Nadol, 1993, siehe Abbildung 1). Sowohl die inneren Haarzellen, die für die Transduktion des mechanischen Signals in ein elektrisches zuständig sind, als auch die äußeren Haarzellen, die amplifizierend arbeiten, sowie die Stützzellen, können durch die oben genannten Noxen geschädigt werden. Der Untergang dieser Zellen, und somit der Hörverlust, ist beim Säugetier weitestgehend irreversibel (Roberson and Rubel, 1994). Allerdings wurde gezeigt, dass Wirbeltiere wie Fische und Vögel in der Lage sind, zugrunde gegangene Haarsinneszellen zu regenerieren (Cotanche, 1987). Auch bei Säugern wurde *in vivo* ein gewisses Potential zur Regeneration von Haarsinneszellen gefunden

(Forge et al., 1993), allerdings kann dadurch der Hörverlust nicht rückgängig gemacht werden.

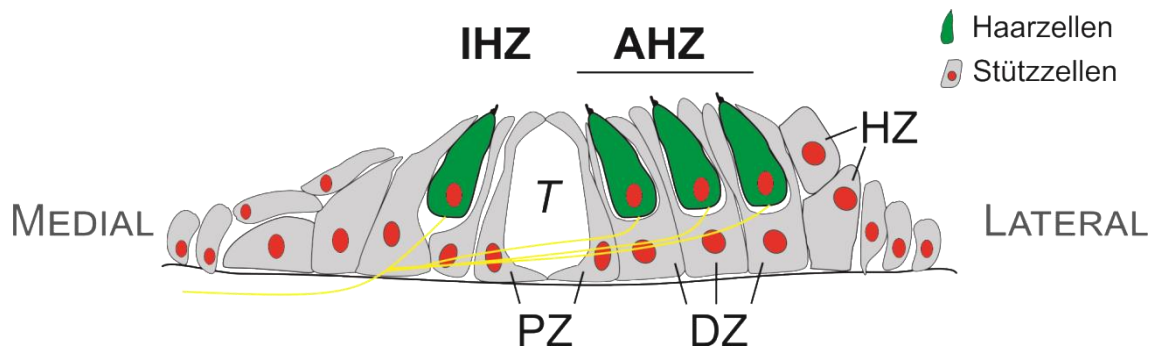


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Corti'schen Organs (Querschnitt).

Neben drei Reihen äußerer Haarzellen (AHZ, grün) steht eine Reihe innere Haarzellen (IHZ, grün) sowie die Stützzellen (grau), die sich u.A. wiederum in Deiter'sche Zellen (DZ), Hensen'sche Zellen (HZ) und Pfeilerzellen (PZ) unterzeilen lassen. T: Corti'scher Tunnel. Die Zerstörung der mechanosensiblen inneren Haarzellen hat einen irreversiblen Hörverlust zur Folge.

1.2 Biologische Modelle des Innenohrs für die Medikamententestung

Anforderungen an die Modelle

Um ototoxische Medikamente sowie Therapien für Hörverlust zu untersuchen, werden geeignete Modellsysteme benötigt. Gleichzeitig können damit protektive Medikamente erforscht werden, die die unerwünschten Wirkungen der bereits eingesetzten ototoxischen Medikamente abschwächen. Außerdem könnten die Mechanismen der Haarzellregeneration tiefergehend erforscht werden. Dazu müssen die Modelle idealerweise menschlichen Ursprungs sowie reproduzierbar und quantifizierbar sein. Um an ihnen große Substanzbibliotheken untersuchen zu können, sollten die Modelle zudem in großem Maßstab einsetzbar sein. Zurzeit existieren einige Ansätze, die jedoch jeweils nicht alle diese Voraussetzungen zufriedenstellend erfüllen.

Bereits verfügbare Modelle

In vivo Modelle mit Zebrafischen und Mäusen stellen das Innenohr in seiner Komplexität gut dar, auch genetisch sowie funktionell sind diese Systeme dem menschlichen ähnlich (Whitfield, 2002, Nicolson, 2005). Allerdings sind diese Modellsysteme sehr ressourcenintensiv. Außerdem wurde gezeigt, dass sich die Ergebnisse von Experimenten mit Zebrafischen nicht vollständig auf Säuger übertragen lassen (Esterberg et al., 2013). *Ex vivo* Modelle basieren auf explantierten Gewebe- oder Organkulturen, die zwar einfacher in der Handhabung sind, aber ebenfalls viel Zeit und Versuchstiere benötigen (Tropitzsch et al., 2014). Um den Aufwand zu reduzieren wurden immortalisierte Mauszelllinien eingeführt (Rivolta and Holley, 2002). Allerdings erfahren diese Zellen bei der Herstellung genetische Veränderungen, die sich nachteilig im Experiment auswirken können.

Eine potentielle Lösung dieser Probleme stellen Modelle mit Stammzellen dar, die menschlichen Ursprungs sind, einen erneuerbaren Pool an Zellen bieten, sowie experimentell robust reproduzierbar sein können. Stammzellen stellen aufgrund ihrer Eigenschaft der Selbsterneuerung einen fast unbegrenzten Pool an Nachschub dar. Durch die Verwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSZ, Takahashi and Yamanaka, 2006) sind diese Assays im Gegensatz zu solchen mit humanen embryonalen Stammzellen (hESZ) nahezu frei von ethischem Konfliktpotential. HiPSZ können durch die Rekapitulation der Entwicklung in der Kulturschale zunächst in Vorläuferzellen des Innenohrs und anschließend zu Stütz- und Haarzell-ähnlichen Zellen differenziert werden (Ealy et al., 2016, Koehler et al., 2013). Sie stellen dann als solche ein humanes *in vitro* Modell des Sinnesepithels dar. Allerdings sind diese Ansätze bis dato noch nicht effizient, robust und reproduzierbar genug, um im großen Stil Anwendung zu finden

1.3 Entwicklung und Embryologie des Innenohrs

1.3.1 Embryologie des Innenohrs im Menschen

Überblick

Die Ursprünge des Innenohrs der Säugetiere liegen im nicht-neuronalen Ektoderm (NNE) des Embryos, lateral der rostralen Neuralleiste (Moore, 2011). Netzwerke von Transkriptionsfaktoren, die von extrinsischen und parakrinen Signalen vor allem aus dem Mesoderm gesteuert werden, entscheiden über die Charakteristika der sich entwickelnden Areale. Aus einer umschriebenen Region innerhalb des NNE, dem präplakodalen Ektoderm (PPE, auch panplakodales Ektoderm), bilden sich zu Beginn der 4. Woche nach Gestation Verdickungen auf der Oberfläche, die sich in der Folge zu den kranialen sensorischen optischen, olfaktorischen, adenohipophysären, trigeminalen und den am weitesten posterior liegenden otischen Plakoden entwickeln (Schlosser, 2010, Lleras-Forero and Streit, 2012). Diese Plakoden bilden die embryonalen Anlagen aller sensorischen Systeme des Kopfes und deren afferente und efferente neuronale Verbindungen zum zentralen Nervensystem. Aus der otischen Plakode entsteht neben dem Innenohr auch das Vestibularsystem (Gleichgewichtsorgan), sowie bei Fischen die Seitenlinie, die die Strömung des Wassers detektiert.

Um den 24. Tag nach Gestation stülpt sich die otische Plakode ein und bildet die otische Zyste. Diese ist ab der 5. Woche mit Flüssigkeit gefüllt und nicht mehr von außen sichtbar. Die otische Zyste entwickelt im Verlauf alle Teile des Innenohrs, die Cochlea sowie die Bestandteile des Gleichgewichtsorgans. Die menschlichen Hörsinneszellen verlassen zwischen Woche 10 und 12 nach Gestation den Zellzyklus und proliferieren anschließend nicht mehr (Pujol and Lavigne-Rebillard, 1995, Pujol et al., 1991, Locher et al., 2013). Zu dieser Zeit haben sich die inneren Haarzellen auf der ganzen Länge der Cochlea ausgebildet, während die äußeren Haarzellen erst mit zwei Wochen Verzögerung auftauchen (Pujol and Lavigne-Rebillard, 1985). Um die 11. bis 12. Woche nach Gestation beginnt die Synapogenese und somit die

Einsprossung afferenter Neurone und deren Verbindung mit den inneren Haarzellen, was bei den äußeren Haarzellen erst in Woche 20 bis 22 passiert (Pujol and Lavigne-Rebillard, 1995). Diese Neurone sind durch die Expression des Strukturproteins β -3-Tubulin charakterisiert. (Pujol and Lavigne-Rebillard, 1985). Das Corti'sche Organ erreicht im zweiten Trimester seine funktionelle Reife (Pujol and Lavigne-Rebillard, 1995, Locher et al., 2013). In der späten Embryonalphase besitzt das Corti'sche Organ dann seine maximale Zahl an sensorischen Haarzellen und neuronalen Spiralganglionzellen, die dann im Laufe des Lebens nur abnehmen kann, was zur Verminderung des Hörvermögens im Alter (Presbyakusis) führt (Wright et al., 1987).

1.3.2 Relevante beteiligte Signalwege und Gene

Während die molekularen Abläufe der Entstehung der Neuralleiste und des Neuralrohrs relativ gut bekannt sind, sind die Zusammenhänge der Entwicklung des NNE und der Voraussetzungen zur Entstehung des PPE sowie der otischen Plakode bisher weniger gut erforscht. Für die *in vitro* Erzeugung otischer Vorläuferzellen aus Stammzellen ist das Verständnis der Vorgänge der Embryonalentwicklung und der beteiligten Signalwege von großer Bedeutung.

Entstehung des nicht-neuronalen Ektoderm (NNE)

Nach der Entwicklung der drei Keimscheiben bildet sich durch hohe Konzentrationen des Proteins Bone Morphogenetic Protein (BMP) auf dem Ektoderm neben der Neuralleiste das nicht-neuronale Ektoderm (NNE), das unter anderem durch die erhöhte Expression der Gene TFAP2A und GATA3 charakterisiert ist (Kwon et al., 2010). Die Expression dieser Gene ist auch eine notwendige Voraussetzung zur späteren Entwicklung des PPE (Kwon et al., 2010).

Entstehung des präplakodalen Ektoderm (PPE)

Nach Abschluss der Gastrulation entwickeln sich Teile des NNE zum PPE, das sich wiederum je nach parakrinen Signalen des umgebenden Gewebes in Zellen der anterioren oder posterioren Plakode aufteilt (Schlosser, 2010).

Diejenigen Zellen, die im NNE schon PPE-spezifische Gene exprimieren (z.B. SIX1), könnten die Fähigkeit haben, später auch zu PPE zu differenzieren (Ealy et al., 2016).

BMP-Inhibitoren und verschiedene fibroblastische Wachstumsfaktoren (FGF) sorgen in der späten Gastrulation dafür, dass sich das Gewebe weiter zu PPE spezifiziert (Litsiou et al., 2005). Das PPE-Gewebe ist durch die Expression der Gene DLX3, EYA1 und SIX4 charakterisiert (Kwon et al., 2010). Diese Genfamilien zeigen eine komplexe Interaktion miteinander. So kann beispielsweise DLX5 direkt an den Enhancer von SIX1 binden, ein SIX1/EYA1/2 Komplex wiederum kann die Expression von DLX5 unterdrücken (Sato et al., 2010). Der Großteil dieser Interaktionen ist bis heute nicht vollständig verstanden, entscheidend für die Induktion des PPE scheint aber der Einfluss des BMP-Levels zu sein (Kwon et al., 2010).

Es wurde gezeigt, dass FGF3 und FGF10 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Innenohrs spielen. Mäuse mit Mutationen in diesen Genen können keine otische Plakode bilden, da die spezifischen Muster der Genexpression fehlen. Dies zeigt sich durch die fehlende Expression u.a. der Gene PAX2 und PAX8 (Wright and Mansour, 2003). FGF3 und FGF10 sind auch für die Expression des Gens WNT8a zuständig, dabei spielt die Aktivität des ERK/MAP-Kinase-Signalwegs eine entscheidende Rolle (Urness et al., 2010).

Im Hinblick auf die FGFs und deren Wirkung gibt es eine bestimmte Interspeziesvarianz. In Hühnern wurden FGF3 und FGF19, in der Maus FGF3 und FGF10, und im Zebrafisch FGF3 und FGF8 als für die Entwicklung des Innenohrs entscheidend nachgewiesen (Ladher et al., 2010).

Differenzierung des PPE und weitere Entwicklung

Mitglieder der WNT-Genfamilie bewirken anschließend die weitere Differenzierung von durch FGF induziertem PPE (Freter et al., 2008). Diese Effektoren, allen voran WNT8a, werden im Rhombenzephalon ausgeschüttet

(Ladher et al., 2010). PAX2 und PAX8 wurden in der Maus als Markergene der Ohrplakode nachgewiesen (Ohyama et al., 2006). Inaktivierung von β -Catenin, einem nachgeschalteten Element von WNT, führt im PPE der Maus zum Verlust der otischen Zellen (Ohyama et al., 2006). Wird β -Catenin hingegen stark aktiviert, dehnt sich das PPE in der Maus aus. In PAX2/PAX8 doppel-knock-out Mäusen entwickelt sich das Innenohr nur bis zur otischen Zyste, es entstehen keine sensorischen Zellen (Bouchard et al., 2010). Innere und äußere Haarzellen werden beim Menschen in der 10. Woche nach Gestation auch durch die Wirkung von FGF2 PAX2 positiv (Pechriggl et al., 2015, Ohyama et al., 2007).

Die Familie der SIX-Transkriptionsfaktoren ist zusammen mit Co-Faktoren, wie beispielsweise der Familie der EYA-Gene, hauptverantwortlich zur weiteren Spezifizierung des PPE, aber auch der anderen Plakoden (Zou et al., 2004). SIX-Gene scheinen im Wirbeltier upstream der PAX-Gene zu liegen und regulieren diese daher (Purcell et al., 2005). Die SIX-Gene sorgen zusätzlich dafür, das PPE räumlich von der benachbarten Neuralleiste abzugrenzen (Moody and LaMantia, 2015).

In Woche 12 entwickeln sich beim Menschen die ersten Myosin 7a und SOX2 positiven Haarzellen. Myosine sind Strukturproteine der Stereozilien der Haarsinneszellen. SOX2 wird im Verlauf bis zur 14. Woche in den Haarzellen wieder herunterreguliert und in den nicht-sensorischen Stützzellen exprimiert. Der Transkriptionsfaktor SOX2 ist sowohl notwendig als auch hinreichend für die Entwicklung der Stützzellen im Innenohr (Gu et al., 2016). SOX2 Mutationen im menschlichen Innenohr führen zu sensorineuralem Hörverlust (Dabdoub et al., 2008). Im Zebrafisch steuert Retinsäure (RA) die Transkription der Gene P27 und SOX2, welche für Regeneration von Haarzellen von Bedeutung sind (Rubini et al., 2015). Eine Deletion von P27 erhöht die Expression von GATA3 und ATOH1 in der Maus (Walters et al., 2017). In der 20. Woche bilden sich Stereozilien, die das histologische Korrelat der Schalltransduktion im Innenohr darstellen (Moore, 2011).

Viele der für die Entwicklung der otischen Vorläuferzellen wichtigen Gene sind während der Entwicklung nur vorübergehend exprimiert, werden dann wieder herunterreguliert und erscheinen erneut (Abbildung 2). Diese Eigenschaft macht die *in vitro* Stammzellkultur sehr aufwändig und komplex (Ealy et al., 2016, Lleras-Forero and Streit, 2012). Es ist deshalb möglich, dass otische Vorläuferzellen ihre Eigenschaften ändern und ein anderes Zellschicksal eingehen, sobald sich ihre Umgebung, wie etwa die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, ändert.

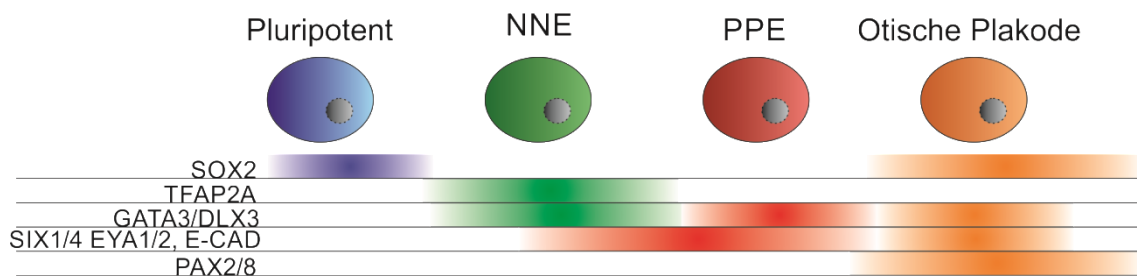


Abbildung 2: Auswahl entscheidender Gene entlang der Entwicklung otischer Vorläuferzellen bei Wirbeltieren (verändert nach Ealy et. al 2016).

Zu erwartende Genexpression während der Differenzierung der humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSZ) zu Zellen der otischen Plakode über die Stationen des nicht-neuronalen Ektoderm (NNE) und des präplakodalen Ektoderm (PPE). Die Expressionslevel vieler Gene schwanken während der Differenzierung der Zellen stark. So ist beispielsweise SOX2 im pluripotenten Stadium als auch in der otischen Plakode hochexprimiert.

1.4 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSZ)

Bis zur Entwicklung der Methode zur Herstellung von hiPSZ durch Takahashi und Yamanaka war die medizinische Forschung an Stammzellen auf embryonale Stammzellen beschränkt (Takahashi and Yamanaka, 2006). Die Verwendung menschlicher Embryonen zur Erzeugung embryonaler Stammzellen wirft enormes ethisches Konfliktpotential auf. Verwendet man stattdessen embryonale Stammzellen der Maus, können Forschungsergebnisse oft nicht vollständig auf den Menschen translatiert werden (Greaves et al., 2004).

Die Differenzierung einer Stammzelle hin zur somatischen Zelle erschien bisher als solche vorgegeben und unumkehrbar. Die Technik der hiPSZ ermöglicht es, menschliche adulte somatische Zellen künstlich zu reprogrammieren, um sie zurück auf pluripotentes Stammzellniveau zu bringen. Diese Zellen können dann durch bestimmte Behandlungen erneut in Gewebe aller drei Keimblätter differenziert werden (Avior et al., 2016). Dieser Ansatz bietet der biomedizinischen Forschung ein enormes Potential zum besseren Verständnis von Krankheiten, aber auch zur Entwicklung neuer, personalisierter regenerativer Therapieansätze.

1.4.1 Erzeugung von hiPSZ aus Fibroblasten

Zur Reprogrammierung nach Takahashi et al. werden die vier Gene C-MYC, KLF4, OCT4 und SOX2 retroviral in das Erbgut gesunder Spenderfibroblasten transfiziert (Takahashi et al., 2007). Dadurch wird die Transkription bestimmter Gene verändert und der Phänotyp der Ursprungszelle konvertiert, wodurch eine pluripotente Stammzelle entsteht. Allerdings muss bedacht werden, dass dieses Eingreifen in die DNA das Risiko für Mutationen und unkontrollierte Proliferation steigert, was eine große Hürde zur klinischen Anwendung darstellt. Zwar ist es möglich, die Information nur transient durch Proteine in die Zelle zu schleusen statt sie in die DNA zu integrieren (Zhou et al., 2009), allerdings ist die Pluripotenz dieser Zellen geringer ausgeprägt. Diese Methode wurde kontinuierlich weiterentwickelt. So zeigten beispielsweise Yu et al. im Jahr 2007, dass es möglich ist, mit den Genen Nanog und Lin-28 das Protoonkogen C-MYC zu ersetzen (Yu et al., 2007).

1.4.2 *In vitro* Differenzierung von hiPSZ und embryonalen Stammzellen zu otischen Vorläuferzellen

Überblick

Haarzellähnliche Zellen und sensorische Neurone wurden bisher erfolgreich aus mausembyonalen Stammzellen (mESZ) hergestellt (Li et al., 2003, Oshima et al., 2010). Durch intensive Forschung wird die otische Linie im Maussystem

immer besser verstanden, wodurch zelluläres Reprogramming ermöglicht wird (Costa and Henrique, 2015) und neue, spezifische Marker entdeckt werden (Hartman et al., 2015). Als Marker oder Markergene werden Gene bezeichnet, die *in vivo* in spezifischen Geweben oder Zelltypen nachgewiesen wurden und deshalb als Indikatoren für diese Gewebe *in vitro* eingesetzt werden.

Bis heute erscheint es aber extrem schwierig, diese Experimente auf menschlichen Zellen zu übertragen, auch aufgrund des Fehlens verlässlicher Markergene. Außerdem neigt menschliches PPE *in vitro* eher dazu, sich in Richtung der anterioren Plakode zu entwickeln (Dincer et al., 2013, Leung et al., 2013). Effiziente Protokolle zur Erzeugung von Zellen der humanen otischen Plakode existieren daher bis heute nicht.

Die meisten Protokolle zur Erzeugung von otischen Vorläuferzellen aus pluripotenten Stammzellen nutzen Zellaggregate, sogenannte Microspheres oder Organoide, um geeignete Mikroumwelten zu schaffen (Ronaghi et al., 2014, Oshima et al., 2010, Koehler et al., 2013, Li et al., 2003). Diese sind aber für die Analyse mittels Immunzytochemie und Hochdurchsatzzytometrie nicht praktikabel, weshalb in dieser Arbeit 2D-Monolayerkulturen eingesetzt wurden, auch wenn mit dieser Strategie bisher nur deutlich geringere Ausbeuten an otischen Zellen gewonnen wurden (Ealy et al., 2016, Ohnishi et al., 2015). Die Genexpression des PPE und der otischen Progenitorzellen bei *in vitro* 2D-Monolayer Experimenten ähnelt derer von Mausembryonen *in vivo* bis Tag 10.5. Danach bleibt die weitere Entwicklung im Experiment aber behindert (Ealy et al., 2016).

Erzeugung von NNE aus Stammzellen

Erzeugung von humanem NNE und das Ableiten von Zellen der anterioren Plakode (z.B. Linse, Trigemini-neurone) aus humanen embryonalen Stammzellen (hESZ) wurde bereits erfolgreich durchgeführt (Dincer et al., 2013, Leung et al., 2013). Die Herstellung von Zellen der posterioren Plakode, zu der die otische gehört, ist deutlich komplexer. Allerdings gibt es Hinweise auf die Erzeugung sensorischer Zellen aus hESZ durch die Manipulation des TGF- β ,

WNT- und FGF-Signalwegs. Diese Ansätze sind aber noch nicht robust und effizient genug (Chen et al., 2012, Ronaghi et al., 2014, Oshima et al., 2010).

Abbildung 3 gibt einen Überblick über das Vorgehen zur Differenzierung der Zellen: Die Differenzierung von pluripotenten Zellen zu NNE erfordert die Unterdrückung von mesodermalen und endodermalen Eigenschaften, was durch die Blockierung des TGF- β - und WNT-Signalwegs erfolgt (Ronaghi et al., 2014, Oshima et al., 2010). Der Einsatz von SB431542 als TGF- β Inhibitor zusammen mit FH535 als WNT-Inhibitor bei hESZ über 6 Tage konnte bei Ealy und Kollegen eine stabile Expression der NNE spezifischen Transkriptionsfaktoren TFAP2A, GATA2/3 und DLX3 erzeugen (Ealy et al., 2016). Die PPE Marker SIX1 sowie EYA1 waren nur in einzelnen Populationen exprimiert, was bedeutet, dass ein Teil der Zellen sich asynchron entwickelt. Auch nach längerer Behandlung der Zellen von bis zu 10 Tagen wurden die NNE Marker nicht stärker exprimiert, während mesodermale und endodermale Marker zunahm. Das Genexpressionsmuster von aus hiPSZ abgeleiteten otischen Zellen unterscheidet sich deutlich von dem aus hESZ abgeleiteten otischen Zellen (Ealy et al., 2016). Die von uns entwickelten und genutzten Behandlungen zur Erzeugung von NNE sind in Kapitel 2.1.4 näher beschrieben.

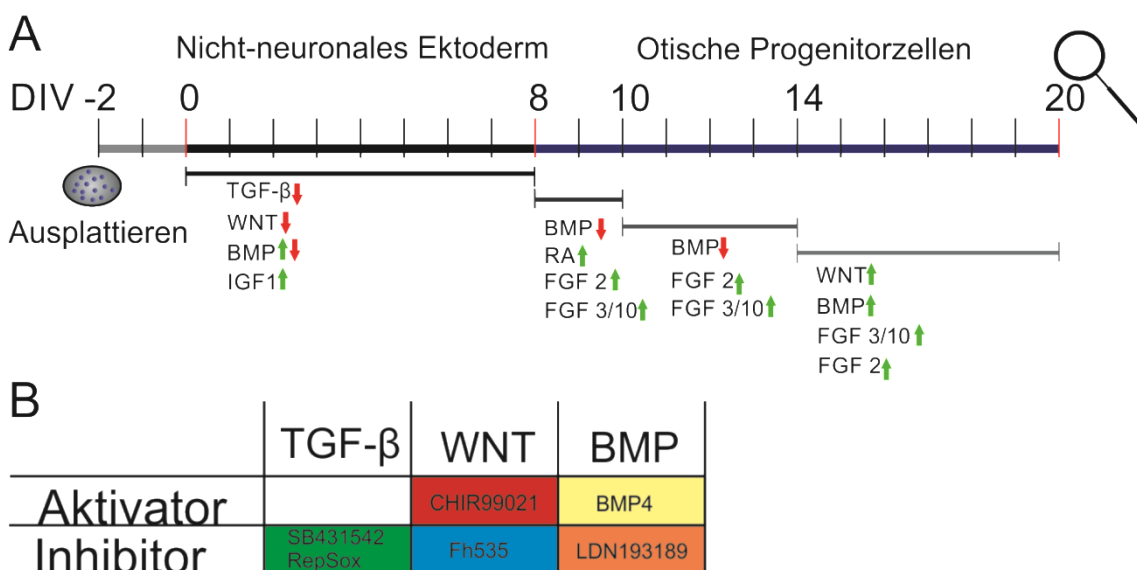


Abbildung 3: Übersicht über den Ablauf der Differenzierung der hiPSZ und verwendete Signalwegmodulatoren.

A: Zeitstrahl der Differenzierung der hiPSZ in mehreren Stufen vom Ausplattieren der Zellen (DIV-2) zu otischen Progenitorzellen (DIV18 bzw. DIV20). Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Kombinationen von Signalwegmodulatoren ab DIV0. Die Stufe des Nicht-neuronalen Ektoderm wurde an DIV8 erreicht, die otischen Progenitorzellen an DIV20. Pfeile zeigen Aktivierung (grün) bzw. Inhibition (rot) der jeweiligen Signalwege. B: Übersicht der verwendeten Substanzen (Signalwegmodulatoren). Jeweils Aktivatoren und Inhibitoren der Signalwege TGF- β , WNT und BMP. DIV: Day *in Vitro* (Tag *in vitro*).

Weitere Entwicklung zu PPE und otischen Zellen

Chen et al. konnten 2012 an hESZ zeigen, dass FGF3 und FGF10 entscheidend an der Bildung der Ohrplakode aus NNE beteiligt sind, indem sie die Marker PAX8 und PAX2 induzieren, daneben wurde auch SOX2 in den meisten Zellen koexprimiert (Chen et al., 2012). Eine Subpopulation zeigte gleichzeitig die otischen Marker NESTIN, SIX1 und GATA3. Einige dieser Zellen exprimierten außerdem MYOSIN 7a und ESPIN sowie ATOH1.

Um die FGF abhängige Hochregulierung von frühen otischen Markern zu verstärken, ist eine Behandlung des erzeugten NNE mit Retinsäure (RA) notwendig. Diese Entwicklung geht aber nur asynchron vonstatten (Ealy et al., 2016). Im Zebrafisch führt Retinsäure zur anterioren Expansion der posterioren Plakode (Hans and Westerfield, 2007). Einige Zellen exprimierten zusätzlich PAX6, was einen vermischten Phänotyp aus anteriorer und posteriorer Plakode darstellen könnte (Ealy et al., 2016). Zusätzlich wurde gezeigt, dass BMP, nachdem es zur NNE Induktion aktiviert wurde, für die Entwicklung zu PPE inhibiert werden muss (Kwon et al., 2010).

Otische Marker wie PAX8 wurden von Ealy et al. (2016) verstärkt nach 12 Tagen Behandlung beobachtet, allerdings bei hESZ deutlich stärker als bei hiPSZ. HiPSZ zeigten eine verspätete Erhöhung der Expression von PPE Markern, sowie eine schlechtere Koordination der Marker (Ealy et al., 2016). PAX2, JAG1, BMP7 und ISL1 wurden noch deutlich später exprimiert. Verlängerte Behandlung über 18 Tage hinaus brachte keine Vorteile (Ealy et al., 2016).

Während der gesamten Entwicklung sind die im Experiment erzeugten Zellen an Tag 12 den nativen Mausotozysten am ähnlichsten, davor und danach weniger (Ealy et al., 2016). Es ist unsicher, ob die Zellen, die Marker mehrerer Zelltypen exprimieren, auch *in vivo* während der Entwicklung vorkommen, oder artifizielle Zellen *in vitro* darstellen (Ealy et al., 2016).

Pera und Kollegen vermuten außerdem, dass die Aktivierung des IGF-Signalwegs das Ektoderm zusätzlich befähigt otisches Gewebe zu erzeugen (Pera et al., 2001).

Auf Grundlage des dargelegten Forschungsstandes haben wir weitere Behandlungen entwickelt, mit denen wir arbeiten. Diese sind in Kapitel 2.1.4 beschrieben.

1.5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, Modelle des menschlichen Innenohrs aus hiPSZ weiterzuentwickeln. Derzeitige Ansätze sind nicht ausreichend robust und nicht zuverlässig reproduzierbar, wodurch ein Screening mit hohem Durchsatz von großen Substanzbibliotheken nicht möglich ist. Durch systematische Untersuchung unterschiedlicher Behandlungen zur Differenzierung von hiPSZ zu otischen Vorläuferzellen soll die Ausbeute erhöht sowie die Charakterisierung der Zellen durch die Analyse der Expression von 192 Markergenen verbessert werden.

Im Speziellen soll überprüft werden ob I) durch gezielte Inhibition oder Aktivierung bestimmter Signalwege die Expression von Markergenen in verschiedenen Stadien der Entwicklung der differenzierten Zellen erhöht werden kann und II) die Behandlung mit FGF 3 und FGF 10 an Stelle von FGF2 die Differenzierung von otischen Zellen begünstigt.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkulturen von Mausembryonalen Fibroblasten (MEF) und hiPSZ

2.1.1 Handhabung und Splitten der MEF Zellen

Auftauen der MEF-Zellen

Am Tag vor Start des Experiments wurden gefrorene mitotisch inaktivierte mausembryonale Fibroblasten (CF-MEF IRR Zellen, MIT-GlobalSteam, Gaithersburg, Maryland, USA) in 37°C warmem MEF-Medium bestehend aus KODMEM Glutamax (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) mit 10% FBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) aufgetaut (s. Tab. 1). Anschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von 11.500 Zellen pro cm² auf 6-Well Platten (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) ausplattiert, um später hiPSZ darauf zu kultivieren. Die MEF-Zellen dienen als Substrat für die hiPSZ, da sie bestimmte Hormone und Wachstumsfaktoren sezernieren, welche sich positiv auf das Wachstum von hiPSZ auswirken.

MEF-Konditioniertes Medium

Um MEF-konditioniertes Medium herzustellen, wurde iPS-Medium (siehe Tabelle 1) 24 Stunden lang bei 37°C auf MEF-Zellen beschichteten 6-Well Platten (11.500 Zellen pro cm²) belassen. Nach 24 Stunden wurde das IPS-Medium gesammelt und durch Millex HA 0.45 µl Filter (Merck Milipore, Darmstadt, Deutschland) mikrofiltriert. Das MEF-konditionierte Medium enthielt dann einige Hormone und Wachstumsfaktoren, die von den MEF-Zellen sezerniert wurden. Dieser Faktorenmix hilft den hiPSZ, nach dem Splitten zu überleben und zu proliferieren sowie einen undifferenzierten Status aufrecht zu erhalten. MEF-Konditioniertes Medium wurde am Tag nach dem Splitten der hiPSZ auf Matrigel[®] (Corning Inc., Corning, New York, USA) beschichteten Platten für die Ernährung der hiPSZ benutzt, um die Überlebensrate zu erhöhen.

2.1.2 Handhabung und Splitten der hiPSZ

Humane induzierte pluripotente Stammzellen

Die hiPS-Zelllinien K9.7 und K7.1, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden durch lentivirale Transduktion der Gene SOX2, OCT4, KLF4 und C-MYC in gesunde menschliche Spenderfibroblasten erzeugt (Yamanaka reprogramming factors (Takahashi and Yamanaka, 2006)). Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Rejko Krüger aus dem Zentrum für Neurologie, Hertie-Institut für Hirnforschung in Tübingen zur Verfügung gestellt.

Auftauen und Handhabung der hiPSZ

Bei -80°C gefrorene hiPSZ wurden in 8 ml 37°C warmem IPS-Medium in einem 15 ml fassenden Reaktionsgefäß (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) aufgetaut und bei 300G für 5 Minuten zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen, um das in der Lösung enthaltene DMSO zu entfernen. Das Pellet wurde dann in frischem IPS-Medium resuspendiert. Zu dieser Lösung wurden 5 ng/ml bFGF (R&D Systems, Minneapolis, USA) und 10 µM Y-27632 (Selleckchem, Houston, Texas, USA; ROCK-Inhibitor zur Apoptoseunterdrückung) hinzugefügt und die Zellen dann auf MEF-beschichtete 6-Well Platten ausgebracht. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das IPS-Medium mit 5 ng/ml bFGF täglich gewechselt, um den Stammzellstatus der hiPSZ zu erhalten.

Passagieren der hiPSZ auf MEF-Zellen

Sobald der Zellrasen zu 80% konfluent war, wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:10, abhängig von den Anforderungen des Experiments, auf MEF-beschichtete 6-Well Platten gesplittet, um eine passende Zelldichte zu erhalten und die Zellen am Ausdifferenzieren zu hindern. Dazu wurden die Zellen mit 1 mg/ml Kollagenase/Dispase-Lösung (Roche, Basel, Schweiz; 0.1 U/ml Kollagenase und 0.8 U/ml Dispase) für 4-5 Minuten inkubiert, bis sie begannen, sich vom Boden abzulösen. Anschließend wurden die Zellen gesammelt, bei 300G für 5 Minuten zentrifugiert, das entstandene Pellet mit PBS (Phosphate

Buffered Saline, PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gewaschen und erneut bei 300 G für 5 Minuten zentrifugiert und in IPS-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann in IPS-Medium mit 5 ng/ml bFGF und 10 µM Y-27632 auf MEF-beschichtete 6-Well Platten ausgebracht. Das Medium auf den MEF-beschichteten Platten wurde eine Stunde vor dem Splitten durch IPS-Medium ersetzt. Am ersten Tag nach dem Splitten wurde das Medium nicht gewechselt, ab dem zweiten Tag wurde das Medium täglich durch frisches IPS-Medium mit 5 ng/ml bFGF ersetzt.

Tabelle 1: Zusammensetzung von iPS-Medium und MEF-Medium.

Reagenz	Hersteller	Vorratskonzentration	Endkonzentration
iPS-Medium			
KO DMEM 1X	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	100%	96%
KOSR	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	100%	2.4%
NEAA	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	10 mM	120 µM
β-ME	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	50 mM	60 µM
Penicillin/ Streptomycin	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	10.000 units/ml	100 units/ml
MEF-Medium			
DMEM Glutamax	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	100%	90%
FBS	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	100%	10%

2.1.3 Nachweis der Pluripotenz der hiPSZ

HiPSZ wurden mit Collagenase/Dispase und einer Dichte von 35.000 Zellen pro Well auf Matrigel® beschichtete 8-Slide Platten gesplittet, wie oben beschrieben. Anschließend wurden die Zellen in IPS-Medium, welches täglich gewechselt wurde, für einige Tage inkubiert, bis sich erste Kolonien gebildet hatten. Dann wurden sie mit 4% PFA (Paraformaldehyd, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) fixiert und gefärbt, wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Wir analysierten nukleäre (KLF4, NANOG, OCT3/4 und SOX2) sowie oberflächliche (SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81) Marker für Pluripotenz. Als Negativkontrolle

wurden die NNE-Marker SIX1, GATA3 und TFAP2A, die otischen Marker PAX8 und NESTIN sowie der Marker der anterioren Plakode, PAX6, gefärbt.

Für die Färbung von SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81 wurden zwei unterschiedliche Protokolle benutzt. Das Protokoll A folgte dem normalen Ablauf von Blocken, Permeabilisieren und Färben wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Bei Protokoll B wurden die Oberflächenmarker nach dem Fixieren und Blocken der Zellen, aber vor der Permeabilisation, inkubiert. Danach wurden die Zellen permeabilisiert, erneut geblockt und mit den nukleären Antikörpern inkubiert.

Ziel dieser Strategie ist es, dass die Oberflächenantikörper nur außen auf der Zelle binden und nicht ins Zellinnere gelangen und kreuzreagieren. Die Kammern der 8-Slides wurden dann abgenommen, die Zellen mit FluorSave (Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) fixiert und mit einem Deckglas bedeckt, das mit Nagellack abgedichtet wurde. Die gefärbten Zellen wurden mit dem ZEISS ApoTome.2 Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) analysiert und die Bilder mithilfe der Zeiss ZEN Software aufgenommen und aufbereitet. Alle mikroskopischen Bilder wurden mit der Graphiksoftware Corel Draw 2018 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) bearbeitet.

2.1.4 Differenzieren von hiPSZ zu otischen Vorläuferzellen

Beschichtung von Platten mit Matrigel[®]

Corning[®] growth factor reduced Matrigel[®] wurde in eiskaltem KO DMEM 1X (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) 1:20 verdünnt und in je der Hälfte der eigentlichen Menge Medium auf die Platten aufgebracht. Die Platten wurden bei 37°C für 1,5 Stunden inkubiert, sodass das Matrigel[®] auspolymerisieren konnte. Nach dem Abnehmen des Überstands wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen. Eine Stunde vor dem Splitten der hiPSZ

wurde dann die Hälfte des Endvolumens MEF-konditioniertes Medium auf die Platten pipettiert.

Splitten der hiPSZ auf Matrigel® mit Accutase

Die Platten mit den zu splittenden hiPSZ wurden mit 1 ml PBS pro Well gewaschen, um Medium und Zelltrümmer zu beseitigen. Dann wurden 700 µl Accutase (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) pro Well auf die Zellen aufgebracht und 3-5 Minuten bei 37°C inkubiert, um den Zellrasen aufzubrechen und die Zellen zu vereinzeln. Die Zellen wurden in IPS-Medium gesammelt, um die Enzymreaktion zu stoppen und anschließend bei 300G für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in MEF-konditioniertem Medium resuspendiert und 10 µl dieser Lösung mit 20 µl 0,4% Trypanblau (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) gefärbt, um lebende Zellen mit einer Zählkammer (Neubauerkammer) zählen zu können. Nachdem 5 ng/ml bFGF und 10 µM Y-27632 zum IPS-Medium mit den Zellen hinzugefügt wurde, wurden die Zellen auf Matrigel® beschichteten Platten mit 480.000 Zellen pro Well auf 6-Well Platten, 35.000 Zellen pro Well auf 8-Slide Platten (Corning Inc., Corning, New York, USA), 95.000 Zellen pro Well auf 24-Well Platten (Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) bzw. 15.000 Zellen pro Well auf 96-Well Platten (Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) ausgesät. Am ersten Tag nach dem Säen wurden die Zellen mit MEF-Konditioniertem Medium mit 5 ng/ml bFGF behandelt, am zweiten Tag startete die jeweilige Differenzierung.

Differenzierung der hiPSZ zu otischen Vorläuferzellen

Zwei Tage vor dem Start eines Experimentes wurden die Platten wie oben beschrieben mit Matrigel® beschichtet. Die hiPSZ wurden grundsätzlich in 5% KOSR (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) Medium mit Zusatz der jeweiligen Signalwegmodulatoren differenziert (Tabelle 2 und 3). Das jeweilige Differenzierungsmedium wurde jeden Tag frisch hergestellt, indem die jeweiligen Signalwegmodulatoren hinzu pipettiert wurden. Das Medium wurde während der Differenzierung je nach Experiment und Phase täglich, jeden zweiten oder jeden dritten Tag gewechselt. Die hiPSZ wurden in

unterschiedlichen Kombinationen von signalwegmodulierenden Substanzen (im Folgenden Konditionen bzw. Behandlungen genannt) für eine bestimmte Zeitdauer inkubiert, um zur jeweiligen Entwicklungsstufe zu gelangen.

Für diese Arbeit werden im Folgenden die 8 Tage differenzierten Zellen (DIV8) als nicht-neurales Ektoderm (NNE) bezeichnet, die 18 bzw. 20 Tage differenzierten Zellen (DIV18 bzw. DIV20) als otische Progenitorzellen (OPZ) und die Gesamtheit der differenzierten Zellen als otische Vorläuferzellen.

Differenzierung der hiPSZ zu NNE

Auf die acht Behandlungen der Zellen für die Experimente auf 96-Well Platten und die Fluidigm™-Analyse soll hier genauer eingegangen werden (Abbildung 4 A und B). Um NNE zu erzeugen wurden die Zellen insgesamt 8 Tage in Kultur gehalten (DIV8).

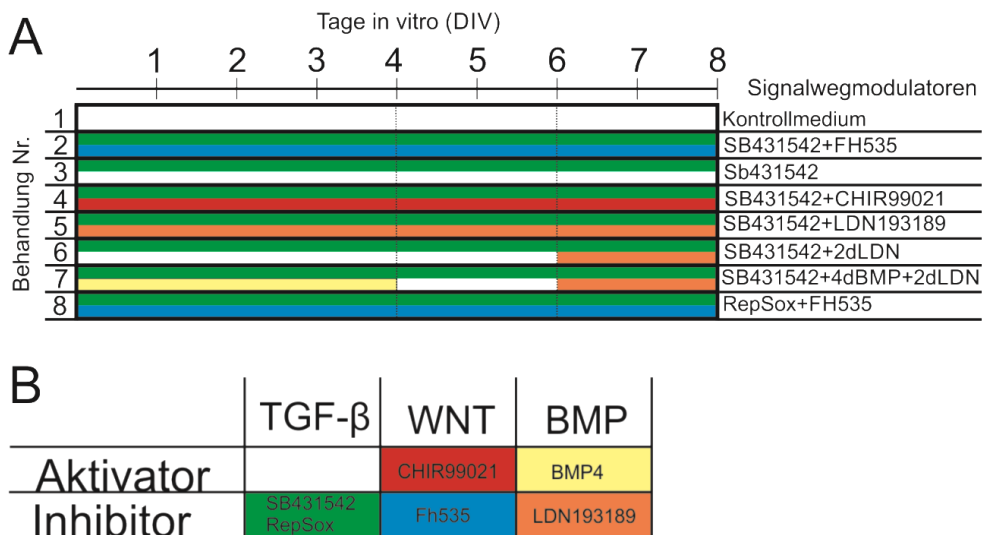


Abbildung 4: Aufschlüsselung der 8 Behandlungsansätze zur Differenzierung der Zellen in den ersten 8 Tagen zu NNE.

A: Links in der Abbildung die jeweilige Nummer der Behandlung. Zeitachse in Tagen *in vitro* (DIV). Rechts die jeweils zugesetzten Signalwegmodulatoren einer Behandlung. Die Farben kodieren jeweils die Dauer und Art der in den jeweiligen Behandlungen verwendeten Signalwegmodulatoren, die in B aufgeschlüsselt sind. 4dBMP: BMP4 in den ersten 4 Tagen der Behandlung (DIV0-4), 2dLDN: LDN193189 in den letzten beiden Tagen (DIV6-8). Lesebeispiel: Behandlung Nummer 6 besteht aus SB431542 während DIV 0-8 (grüner Streifen) und zusätzlich LDN193189 während DIV 6-8 (orangener Streifen). B: Aktivatoren und Inhibitoren der manipulierten Signalwege. Farbliche Kodierung wie in A. NNE: nicht-neurales Ektoderm.

Die Behandlung 1 stellt die Kontrollbedingung dar, hier wurden keine Signalwegmodulatoren verwendet. Alle anderen sieben Behandlungen enthalten für die gesamte Dauer von 8 Tagen einen Inhibitor des TGF- β -Signalwegs, SB431542 (Behandlungen 2-7) bzw. RepSox (Behandlung 8), um mesodermale und endodermale Eigenschaften in den Zellen zu unterdrücken. Behandlung 2 enthält zu diesem Zweck zusätzlich den WNT-Inhibitor FH535. Sie wird im Folgenden als Standard bezeichnet, da diese Behandlung am besten etabliert ist (Ronaghi et al., 2014, Oshima et al., 2010, Ealy et al., 2016). Bei Behandlung 3 wurde auf eine WNT-Inhibition verzichtet, um zu untersuchen, ob diese überhaupt notwendig ist. Bei Behandlung 4 wurde CHIR99021 zugesetzt, um die Auswirkungen einer WNT-Aktivierung auf die Genexpression der Zellen zu untersuchen. Behandlung 5 entspricht einer durchgehenden Inhibition des BMP-Signalwegs, was mit der Genexpression des neuronalen Ektoderms assoziiert ist. Behandlung 6 soll zeigen, ob die Inhibition des BMP-Signalwegs nur in den letzten beiden Tagen der Behandlung Veränderungen in der Genexpression nach sich zieht, bei Behandlung 7 kommt zusätzlich dazu eine Aktivierung des BMP-Signalwegs in den ersten 4 Tagen der Behandlung hinzu.

Kwon und Kollegen beschrieben in ihrem „BMP-attenuation model“ die Einflüsse der BMP-Aktivierung und -Inhibition zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung der Zellen zu PPE (Kwon et al., 2010). Diese wurden in den Behandlungen 5,6 und 7 nachempfunden und mit dem klassischen „morphogen model“ verglichen, wonach das Level von BMP graduell über die Entwicklung des Gewebes entscheidet. Behandlung 8 untersucht zuletzt den Einfluss des wesentlich stärker wirksamen TGF- β -Inhibitors RepSox im Vergleich zu SB431542.

Zur Inhibition des TGF- β -Signalwegs wurden die Stoffe SB431542 (10 μ M bzw. 20 μ M; Selleckchem, Houston, Texas, USA) und das potentere RepSox (12,5 μ M; Selleckchem, Houston, Texas, USA) benutzt. Der WNT Signalweg wurde mit FH535 (1 μ M bzw. 0,1 μ M; Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) inhibiert und mit CHIR99021 (1,5 μ M; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

aktiviert. Der BMP-Signalweg wurde mit BMP4 (20 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, USA) aktiviert und mit LDN193189 (1 μ M; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) inhibiert. IGF1 (R&D Systems, Minneapolis, USA) wurde in einigen Konditionen mit 10 ng/ml zugesetzt, um das Differenzierungspotential der Zellen zu erhöhen. Kontrolleexperimente wurden nur mit Differenzierungsmedium ohne Faktoren behandelt. Die Differenzierung zu NNE dauerte 8 Tage (DIV0-DIV7), das Medium wurde täglich gewechselt.

Differenzierung der hiPSZ zu otischen Progenitorzellen

Nach 8 Tagen Differenzierung (DIV8) startete die otische Differenzierung ausgehend von Zellen des NNE. Zellen aller 8 Ansätze wurden nun jeweils mit FGF2 oder FGF3 und FGF10 sowie weiteren Signalwegmodulatoren inkubiert (Abbildung 3, A). Ab diesem Zeitpunkt wurde das Medium jeden zweiten Tag gewechselt. Die ersten beiden Tage (DIV8 und 9) wurden die Zellen mit dem BMP Inhibitor LDN193181 (1 μ M), Retinsäure (10 μ M; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), und entweder FGF2 (12,5 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, USA) oder FGF3 und FGF10 (jeweils 50 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, USA) behandelt. Heparinsulfat (Stemcell Technologies, Vancouver, British Columbia, Kanada) wurde während der gesamten otischen Differenzierung mit 2 μ g/ml hinzugefügt, um die FGF-Moleküle zu stabilisieren.

Die nächsten vier Tage (DIV10-13) wurden die Zellen mit demselben Medium wie die beiden Tage zuvor behandelt, nur die Retinsäure wurde weggelassen.

Während der letzten 6 Tage der otischen Differenzierung (DIV14-20) wurden der BMP- und WNT-Signalweg mit BMP4 (20 ng/ml) bzw. CHIR99021 (3 μ M) aktiviert. Zusätzlich wurden die Zellen mit FGF2 bzw. FGF3 und 10 sowie Heparinsulfat behandelt. Die Zellen wurden nach 10 bzw. 12 Tagen otischer Differenzierung, respektive 18 bzw. 20 Tagen insgesamt, fixiert.

Tabelle 2: Komponenten des 5% KOSR Differenzierungsmediums.

Differenzierungsmedium			
Reagenz	Hersteller	Vorratskonzentration	Endkonzentration
KO DMEM F12	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	100%	85-95%
KOSR	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	100%	5-15%
NEAA	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	10 mM	100 µM
β-ME	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	50 mM	50 µM
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	50 mg/ml	50-100 µg/ml

Tabelle 3: Substanzen bzw. Signalwegmodulatoren für die Differenzierung der hiPSZ zu otischen Vorläuferzellen.

Reagenz	Hersteller	Vorratskonzentration	Endkonzentration
Rh bFGF	R&D Systems, Minneapolis, USA	5 µg/ml	5 ng/ml
Y-27632	Selleckchem, Houston, Texas, USA	10 mM	10 µM
SB431542	Selleckchem, Houston, Texas, USA	100 mM	10 µM
FH535	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	10 mM	1 µM
RepSox	Selleckchem, Houston, Texas, USA	100 mM	12,5 µM
LDN193189	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	5 mM	1 µM
CHIR99021	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	5 mM	1.5 µM
rhIGF	R&D Systems, Minneapolis, USA	100 µg/ml	10 ng/ml
Rh BMP4	R&D Systems, Minneapolis, USA	50 µg/ml	20 ng/ml
FGF 2	R&D Systems, Minneapolis, USA	50 µg/ml	50 ng/ml
FGF 3	R&D Systems, Minneapolis, USA	50 µg/ml	50 ng/ml
FGF10	R&D Systems, Minneapolis, USA	50 µg/ml	50 ng/ml
Retinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	25 mM	10 µM
Heparinsulfat	Stemcell Technologies, Vancouver, British Columbia, Kanada	2 mg/ml	1µg/ml

2.2 Immunzytochemische Färbung der differenzierten otischen Vorläuferzellen

2.2.1 Fixieren, Permeabilisieren und Blocken der differenzierten otischen Vorläuferzellen

Fixieren

Nachdem die differenzierten Zellen die gewünschte Phase erreicht hatten, wurden sie mit 4% PFA für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

Permeabilisation

Die Zellen wurden mit 0,5% Triton (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellmembran permeabel für die nachfolgenden Reagenzien und Antikörper zu machen.

Blocken

Anschließend wurden die Zellen in 1% Kälberserumalbumin (Bovine Serum Albumin, BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um freistehende Antigene zu blockieren und Kreuzreaktionen mit den Antikörpern zu verhindern.

Tabelle 4: Übersicht der Arbeitsabläufe: Fixieren, Permeabilisieren und Blocken der zu analysierenden Zellen.

Arbeitsschritt	Lösung	Zeit, Bedingungen
Fixieren	4 %PFA	15 min, RT
Waschen 3x	PBS	5 min, RT
Permeabilisieren	0.5 % Triton in PBS	15 min, RT
Blocken	1% BSA in PBS	30 min RT

Tabelle 5: Reagenzien für den Färbeprozess der zu analysierenden Zellen.

Reagenz	Hersteller	Stock Konzentration	End Konzentration
Histofix 4% (PFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	4%	4%
Triton 100X	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	100%	0,5%
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	100%	1:100
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	100%	1%

2.2.2 Vorbereitung und Anwendung der Primärantikörper

Nach dem Fixieren, Permeabilisieren und Blockieren wurden die Zellen mit den jeweiligen Primärantikörpern in PBS mit 1% BSA inkubiert (Konzentrationen siehe Tabelle 6 und 7). Dabei wurden 100 µl Lösung pro Well bei 24-Well Platten bzw. 35 µl pro Well bei 96-Well Platten verwendet. Die Platten wurden bei 4°C über Nacht inkubiert.

Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper für die NNE-Färbung.

Antikörper	Ursprung	Hersteller	Konzentration
TFAP2A	Maus	DSHB, Iowa City, Iowa, USA	1:10
SIX1	Hase	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	1:1000
GATA3	Ziege	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA	1:50

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper für die Färbung der verschiedenen differenzierten otischen Vorläuferzellen und der pluripotenten Zellen.

Antikörper	Ursprung	Hersteller	Konzentration
PAX6	Hase	Biologend, San Diego, CA, USA	1:100
PAX8	Ziege	Abcam, Cambridge, UK	1:200
P27	Maus	Neomarker/Invitrogen, Carlsbad, USA	1:200
PAX2	Hase	Biologend, San Diego, CA, USA	1:200
E-Cadherin	Ratte	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	1:2000
DLX3	Maus	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
EYA1	Hase	Abcam, Cambridge, UK	1:100
EYA2	Maus	Abnova, Teipei City, Taiwan	1:50
SOX2	Ziege	R&D Systems, Minneapolis,	1:500

		Minnesota, USA	
SIX1	Hase	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	1:1000
GATA3	Ziege	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA	1:50
SIX4	Maus	Abnova, Teipei City, Taiwan	1:500
SSEA4	Maus	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	1:1000
TRA-1-60	Maus	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	1:1000
TRA-1-81	Maus	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	1:1000
OCT3/4	Maus	Santa Cruz, Dallas, USA	1:200
KLF4	Hase	Abcam, Cambridge, UK	1:500
NANOG	Hase	Biozol, Eching, Deutschland	1:500

2.2.3 Vorbereitung und Anwendung von Sekundärantikörpern und Gegenfärbung

Nach dreifachem Waschen mit PBS wurden die Sekundärantikörper (Tabelle 8), gelöst 1:400 in 1% BSA in PBS, mit den Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Um alle Zellkerne darzustellen, wurden die Zellen anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln mit 30 nM DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) behandelt. Erneut wurden die Zellen dreifach gewaschen und mit Aluminiumfolie bedeckt, um gescannt werden zu können.

Tabelle 8: Sekundärantikörper für die immunzytochemische Färbung der zu analysierenden Zellen.

Antikörper	Ursprung	Hersteller	Endkonzentration
Donkey anti mouse 488	Esel	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	1:400
Donkey anti rabbit 488	Esel	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	1:400
Donkey anti rabbit 546	Esel	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	1:400
Donkey anti goat 594	Esel	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	1:400
Donkey anti rat 594	Esel	Life Technologies,	1:400

		Carlsbad, Kalifornien, USA	
Donkey anti mouse 647	Esel	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	1:400
Donkey anti goat 660	Esel	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	1:400

Tabelle 9: Vorgehen bei der immunzytochemischen Färbung der zu analysierenden Zellen.

Arbeitsschritt	Lösung	Zeit, Bedingungen
Primärantikörper	AK in 1% BSA	16 Stunden, 4°C, dunkel
Waschen 3x	PBS	5 min, RT
Sekundärantikörper	AK in 1% BSA	1 Stunde, RT, dunkel
Waschen 3x	PBS	5 min, RT
Gegenfärbung	DAPI in PBS	20 min, RT, dunkel
Waschen 3x	PBS	5 min, RT

2.3 Mikroskopie von immunzytochemisch gefärbten differenzierten otischen Vorläuferzellen

2.3.1 High Content Screening der immunzytochemisch gefärbten differenzierten otischen Vorläuferzellen

Die gefärbten Zellen wurden mit dem ImageXpress XLS high content screener (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, California, USA) und der Software MetaXpress (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, USA) gescannt und analysiert. Mit derselben Software wurden die Zellzählungen und Segmentierungsanalysen durchgeführt. Die Software erkennt dabei alle immunzytochemisch markierten Zellen und zählt diese abhängig von einem vorher festgelegten Schwellenintensitätswert aus. Zum Test auf signifikante Unterschiede in der Anzahl der erkannten markerpositiven Zellen wurde im Vergleich zweier Behandlungen der T-Test, bei mehreren Gruppen der Steeltest verwendet. Gerechnet wurde mit den Softwares SAS JMP14 (SAS Institut, Cary, North Carolina, USA) und Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp. Redmont, Washington, USA). Es wurde jeweils von zweiseitiger Verteilung und

ungleichen Varianzen ausgegangen, um eine konservative Rechnung zu erhalten. Die Fehlerwahrscheinlichkeit α einen Fehler erster Art zu begehen, wurde auf 5% ($\alpha = 0,05$) festgelegt. An einigen Stellen beschränkten wir uns auf deskriptive Statistik, dort waren die Experimente zu variabel und volatil für induktive Statistik.

2.3.2 Qualitative Mikroskopie der immunzytochemisch gefärbten differenzierten otischen Vorläuferzellen

Zur qualitativen Analyse der Zellen für die Bilder der Abbildung 5 wurde das Zeiss ApoTome.2 und die Software ZEN verwendet (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Um die passenden Expositionszeiten der Laser einzustellen, wurde eine Sekundärantikörperprobe durchgeführt, wobei keine Primärantikörper verwendet wurden. Die längste Expositionszeit, bei der noch kein Signal des Sekundärantikörpers detektierbar war, ergab die maximale Expositionszeit für die Analysen der späteren Experimente. Dadurch wurde verhindert, dass ein Hintergrundrauschen die Analyse störte. Die Bilder der Abbildungen 9, 10, 11 und 13 wurden mit dem ImageXpress XLS high content screener und der Software MetaXpress (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, USA) angefertigt.

2.4 RT-qPCR Analyse der differenzierten otischen Vorläuferzellen (Fluidigm™)

Die Fluidigm™-Untersuchung der Firma Biomark® ist ein multi-qPCR Assay. Dabei können simultan 192 Gene einer einzigen Probe untersucht werden. Untersucht wurden Gene, die während der Entwicklung der otischen Zellen von Relevanz sind, sowie Housekeeping-Gene und Gene anderer Gewebe zum Vergleich (Liste siehe Anhang).

Für die Gewinnung der Proben für die qPCR-Analyse wurden von uns erneut Differenzierungen der hiPSZ auf 24-Well und 6-Well Platten durchgeführt. Der Transport der aus der extrahierten RNA hergestellten cDNA nach Stanford

erfolgte trocken eisgekühlt per Luftpost, um die Stabilität der Proben zu gewährleisten. Die Bereitstellung der notwendigen Primer und der Gerätschaften sowie die apparative Durchführung der Fluidigm™-Untersuchung unserer Proben wurde freundlicherweise von Megan Ealy, Heller Lab, Stanford, USA übernommen.

2.4.1 Isolation von RNA aus differenzierten otischen Vorläuferzellen

Zur Gewinnung von RNA aus den differenzierten Zellen wurden die Platten mit PBS gewaschen und die Zellen mit 0,125% Trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) von den Platten gelöst und anschließend für 5 Minuten bei 300 G zentrifugiert. Die eigentliche RNA Isolation wurde mit dem Isolation Kit NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt (Tabelle 10). Wenn nötig, wurden die abgelösten Zellen in RNAlater® Lösung (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) bei -80°C gelagert, bis die RNA Isolation durchgeführt wurde.

Tabelle 10: Vorgehen zur Isolation von RNA aus differenzierten Zellen.

RNA Isolation	
Arbeitsschritt	Durchführung
1. Lyse der Zellen	350 µl RA1 Lösung + 3.5 µl β-ME
2. Filtrierung des Lysats	NucleoSpin Column, 1 min Zentrifugation mit 11.000 x G
3. RNA Bindungsbedingungen anpassen	350 µl 70% Ethanol hinzufügen
4. RNA binden	Lade Proben auf Säule, Zentrifugation für 30 s bei 11.000 x g
5. Silicamembran entsalzen	Hinzufügen von 350 µl MDB zur Säule, Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g
6. DNA zersetzen	95 µl DNase reaction mixture zur Säule hinzufügen, bei RT für 15 min bei 11.000 x g zentrifugieren
7. Waschen und Trocknen der Silicamembran	Erstes Waschen: 200 µl RAW2; für 30 s bei 11.000 x G zentrifugieren Zweites Waschen: 600 µl RA3, für 30 s bei 11.000 x G zentrifugieren Drittes Waschen: 250 µl RA3, für 2 min bei 11.000 x G zentrifugieren
8. Ausspülen der RNA	30-60 µl RNase freies Wasser hinzufügen, 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren

Alle Arbeitsschritte mit RNA wurden auf Eis durchgeführt, um den RNA-Abbau zu verhindern. Die Konzentration der extrahierten RNA wurde anschließend mit dem Qubit® RNA BR Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) gemessen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Quantifizierung der extrahierten RNA mit dem Qubit® RNA BR Assay Kit.

Quantifizierung der RNA	
Arbeitsschritt	Durchführung
1. Vorbereiten der Qubit® Lösung	Qubit® RNA BR Reagent 1:200 in Qubit® RNA BR Buffer lösen
2. Vorbereiten von Standard 1 und 2	Hinzufügen von jeweils 10 µl Standard 1 und 2 Lösung zu 190 µl Arbeitslösung
3. Vorbereiten der Probenlösung	Hinzufügen von je 2 µl RNA Probelösung zu 198 µl Arbeitslösung
4. Inkubieren	Inkubieren bei RT für 2 min
5. Fluormeter kalibrieren	Mit den Lösungen Standard 1 und 2
6. Proben auslesen	Mit Invitrogen Qubit Fluormeter (Turner BioSystems)

2.4.2 Reverse Transkription der extrahierten RNA zu cDNA

500 ng bis 1 µg RNA jeder Probe in 10 µl RNase freiem Wasser wurde für die cDNA Transkription mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) benutzt. Da die qPCR Analyse in Stanford (Kalifornien, USA) durchgeführt wurde, verschickten wir cDNA statt RNA, da cDNA deutlich stabiler ist.

Tabelle 12: Vorgehen bei der reversen Transkription von RNA zu cDNA.

Transkription von RNA zu cDNA		
Arbeitsschritt	Durchführung	
1. Vorbereiten von 2X Mastermix (pro Reaktion)	Komponente	Volumen (µl)
	10X RT Buffer	2
	25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
	MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1
	Nukleasefreies H ₂ O	4,2

	10X RT Random Primers	2			
	TOTAL	10			
2. Vorbereiten des Reaktionsmix	Hinzufügen von 10 µl des 2X Master mix zu 10 µl RNA sample				
3. Zentrifugation	Um die Komponenten am Boden abzusetzen				
4. Durchführung der Transkription		Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
	Temp. (°C)	25	37	85	4
	Zeit	10 min	120 min	5 min	dauerhaft

2.4.3 Analyse der Fluidigm™ Daten

Für jede Probe wurde die RT-qPCR zur Fehlerreduktion drei Mal durchgeführt (technische Replikate) und mit dem Mittelwert der drei Werte weitergearbeitet. Zur besseren Vergleichbarkeit und Weiterverarbeitung wurden die Ct-Werte wie folgt verwendet. Als Ct-Wert bezeichnet man die Anzahl an Replikationszyklen, die nötig ist, um die spezifische Fluoreszenz erstmals über eine bestimmte Schwelle (das Hintergrundrauschen) zu bringen, also die Nachweisgrenze. Die Werte wurden auf die am stabilsten exprimierten Gene HPRT, GAPDH, ACTB normalisiert, um die Proben untereinander vergleichbar zu machen. Zur Qualitätskontrolle wurden Werte ausgeschlossen, die mindestens eines der folgenden drei Kriterien erfüllten: I) keine Amplifizierung detektierbar, II) Ct-Werte ≤ 3 (extrem hohe Expression, die nicht als verlässlich angesehen werden kann) oder III) der Gipfel der Schmelzkurve liegt außerhalb des Temperaturbereichs, der bei der Validierung der Primer festgelegt wurde. Fehlende Werte wurden durch den Mittelwert des jeweiligen Gens der anderen Proben ersetzt, um eine Auswertung zu ermöglichen.

Darstellung der Daten mittels t-distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE)

Das t-SNE ist eine nichtlineare Dimensionsreduktionsmethode, mithilfe derer sich komplexe, vieldimensionale Datensätze besser visualisieren lassen. Dabei werden sich ähnelnde Werte eines Datensatzes schrittweise zusammengefasst und in einer Ebene nah aneinander dargestellt. So kann sukzessive auf zwei Dimensionen reduziert werden. In der Abbildung stehen sich ähnelnde Datensätze (bzw. Proben) näher aneinander als sich stark voneinander

unterscheidende. Die einzelnen Datenpunkte können dann anhand der zu Grunde liegenden Variablen, in diesem Fall der Genexpression und jeweilige Behandlung, aufgeschlüsselt werden.

2.5 Sonstige Materialien

Tabelle 13: Sonstige Materialien der Zellkultur und Analysemethoden.

Sonstige Materialien			
Lösung	Hersteller	Vorratskonzentration	Endkonzentration
PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	100%	
Trypanblau	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	0,4%	0,4%
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA		
Accutase	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	100%	100%
Collagenase/Dispase	Roche, Basel, Schweiz	100 mg/ml	1 mg/ml
Matrigel®	Corning Inc, Corning, New York, USA)		
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	0.25%	0.125%

Tabelle 14: Verwendete Platten in der Zellkultur.

Platten	
Platte	Hersteller
6-Well Cellstar	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
8-Slide	Corning Inc, Corning, New York, USA)
24-Well µ-Plate uncoated	Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
96-Well µ-Plate	Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland

Tabelle 15: Verwendete Pipetten, Spitzen und Reaktionsgefäße in der Zellkultur und Analyse.

Pipetten, Spitzen und Reaktionsgefäße	
Gerät	Hersteller
Eppendorf Explorer 50-1200 µl 8-Chanell	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research 1000,200,100,20,10,2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Discovery Comfort 20-200 8-Chanell	HTL Lab Solutions, Warschau, Polen
Spitzen aller Größen	Greiner bio-one, Frickenhausen,

	Deutschland
Gefäße 50ml, 15ml, 5ml, 2ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Gefäße 0,5 ml	Nerbe Plus GmbH, Winsen, Deutschland
Millex HA Filter 0.45 µl	Merck Milipore, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 16: Verwendete Laborgeräte in der Zellkultur und Analyse.

Laborgeräte		
Gerät	Hersteller	Software
Eco Save Comfort Bench	Envair eco, Haslingden, England	
New Brunswick Galaxy® 170 Series CO2 Incubator	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	
Megafuge 1.0R	Unity Lab/Thermo Fisher, Waltham Massachusetts, USA	
Zeiss Primovert	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	ZEN
Zeiss ApoTome.2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	ZEN
ImageXpress XLS Screener	Molecular Devices LLC, Sunnyvale, California, USA	Meta Xpress
Invitrogen Qubit Fluormeter	Promega, Turner BioSystems, Mannheim, Deutschland	

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Pluripotenz der hiPSZ

Voraussetzung für die Experimente ist die chromosomale Integrität der verwendeten Zellen. Diese wurde für beide verwendete Zelllinien durch das Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik, Universitäts-Klinik Tübingen, untersucht. Beide Zelllinien zeigten einen vollständigen, diploiden, weiblichen Chromosomensatz. Die Karyogramme sind im Anhang abgebildet.

Die Eigenschaft der Pluripotenz der verwendeten Zellen ist Voraussetzung für ihre Fähigkeit, zu otischen Vorläuferzellen zu differenzieren. Die Pluripotenz kann durch den Nachweis der Expression bestimmter Gene überprüft werden.

Färbung der Pluripotenzgene – Zelllinie K7.1

Die hiPS-Zelllinie K7.1 bei Passage 39 zeigte eine hohe Expression aller analysierten Pluripotenzgene. Die nukleären Marker KLF4, SOX2, OCT3/4 und NANOG waren in fast allen Zellen hoch exprimiert (Abbildung 5, A - B sowie A' - B').

Die Oberflächenmarker SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81 zeigten ein diffuseres Expressionsmuster, da sie auf der Zelloberfläche und nicht im Kern lokalisiert sind. Hier wurde das Färbeprotokoll A benutzt (siehe Kapitel 2.1.3 und Abbildung 5 C-E sowie C' - E').

Die Marker des NNE, TFAP2A, GATA3 und SIX1, spätere Marker der otischen Vorläuferzellen, PAX8 und Nestin, sowie PAX6 wurden in den hiPSZ vor Start der Differenzierung nicht detektiert (Abbildung 5 F-G sowie F' - G').

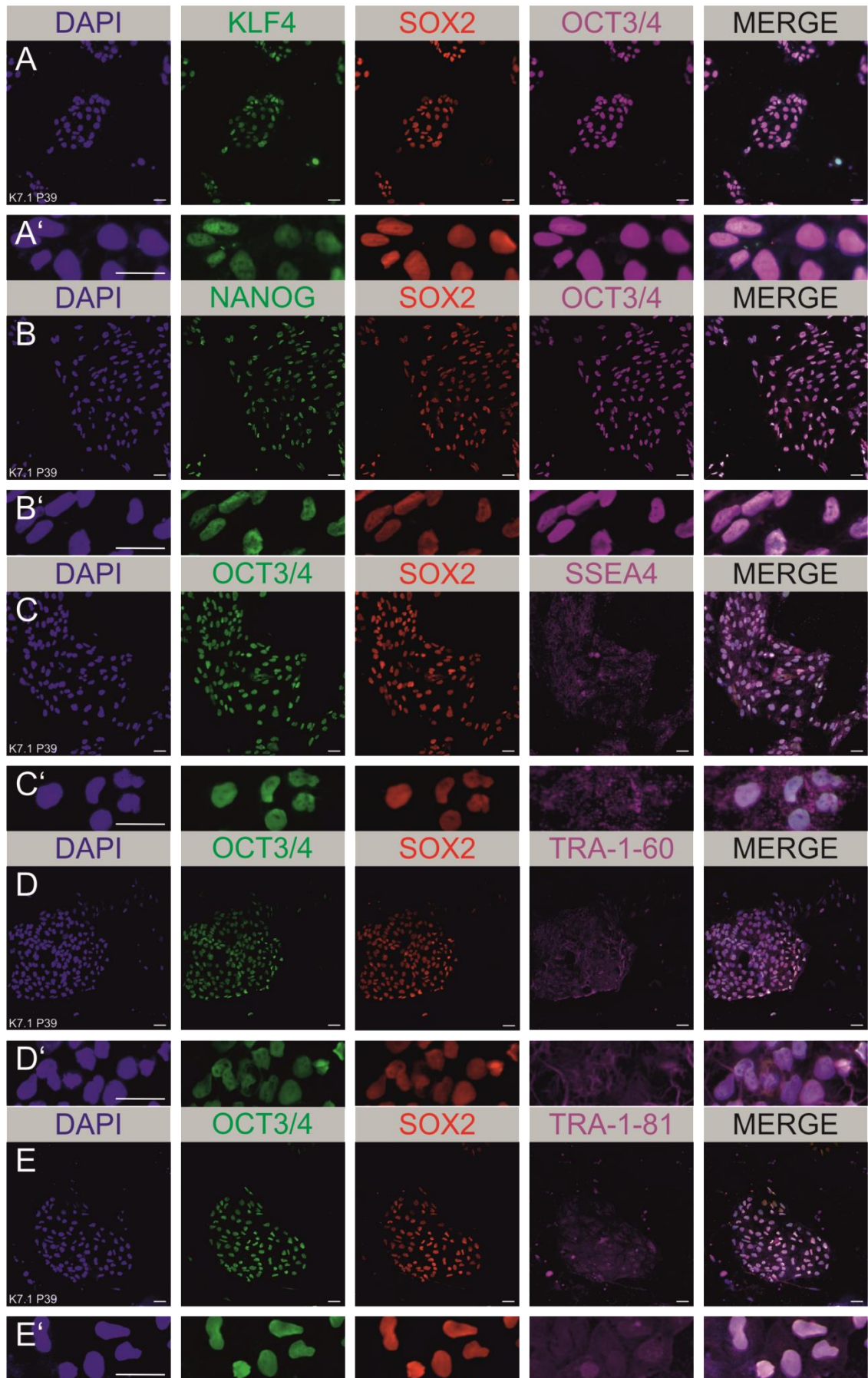




Abbildung 5: Immunfluoreszenzmikroskopie der Pluripotenzmarker und anderer otischer Marker in hiPS-Zellen.

Zelllinie K7.1 bei Passage 39. A-B: Starke und homogene Expression aller nukleären Markergene KLF4, SOX2, OCT3/4 und NANOG. C-E: Diffuse Expression der Oberflächenantigene SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81. F-G: Keine detektierbare Expression der Marker für NNE (TFAP2A, SIX1, GATA3) sowie spätere otische Marker (PAX6, PAX8 und NESTIN). Maßstabsleiste: 250 µm. A'-G': Vergrößerungsausschnitt. MERGE ist die Überlagerung der jeweiligen vier Kanäle einer Färbung.

Färbung der Pluripotenzmarker – Zelllinie K9.7

Dieselben Experimente wie für die Zelllinie K7.1 oben beschrieben wurden für die Zelllinie K9.7 durchgeführt. Dabei ergaben sich für die Zelllinie K9.7 ähnliche Expressionsmuster wie bei der Zelllinie K7.1 (Bilder nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass beide verwendeten Zelllinien zum Start der Experimente pluripotent waren. Zudem exprimierten die Stammzellen vor Start der Experimente noch keine Marker für NNE oder spätere otische Vorläuferzellen. Alle später detektierten Marker sind also durch die Behandlung der Zellen und die damit verbundene Differenzierung und Genexpression zu erklären.

Vergleich der beiden Protokolle für die Oberflächenmarker

Um zu verhindern, dass Oberflächenmarker in die Zelle gelangen und Kreuzreaktionen auslösen, wurde ein zweites Protokoll für die Färbung angewandt. In diesem Protokoll B (s. Kapitel 2.1.3) wurden die Oberflächenmarker SSEA4, TRA-1-61 und TRA-1-80 vor dem Permeabilisieren der zu untersuchenden Zellen inkubiert. Jedoch zeigte das Protokoll B keine erkennbaren Unterschiede der Präsentation der Oberflächenmarker (Bilder nicht gezeigt). Für diese Experimente wurden Zellen der Linie K9.7 verwendet.

3.2 Differenzierung der hiPSZ zu Zellen des nicht-neuronalen Ektoderm (NNE)

Um die Entwicklung des Innenohrs zu imitieren, müssen bestimmte Signalwege aktiviert bzw. inhibiert werden. Ein Ansatz für die Entstehung von NNE aus hiPSZ ist die Inhibition des TGF- β - sowie des WNT-Signalwegs (Ealy et al., 2016, Ronaghi et al., 2014, Oshima et al., 2010).

3.2.1 Fluoreszenzmikroskopie der Zellen des NNE auf 24-Well Platten

Für diese Vorexperimente wurden einige mehr als die in Kapitel 2.1.4 beschriebenen 8 Behandlungsansätze mit der Zelllinie K9.7 untersucht. Sie werden im Folgenden zusammen mit den Ergebnissen beschrieben.

Die Standarddifferenzierung erhöht Marker des NNE.

Die von uns genutzte Standarddifferenzierung für NNE, die von unserem Partner Heller Lab in Stanford etabliert wurde (Ealy et al., 2016), besteht aus TGF- β -Inhibition mit SB431542 (10 μ M) und WNT-Inhibition mit FH535 (1 μ M) über die gesamte Zeit von 8 Tagen. Sie wird in dieser Arbeit als „Standard“ bezeichnet. Durch diese Behandlung erhöhte sich die Zahl der GATA3 exprimierenden Zellen im Vergleich zu 5% KOSR-Medium der Kontrolle im Mittelwert signifikant von 58,9% der Zellen auf 91,7% (n=3, p=0,03, t-test) und für TFAP2A von 40,3% zu 93,7% (n=3, p=0,01, t-test). Bei SIX1 veränderte sich

der Mittelwert der Anzahl markerpositiver Zellen von 28,6% zu 29.7% (n=3, p=0,86, t-test) (Abbildung 6, A). Außerdem konnte im Vergleich zur Kontrolle eine annähernde Verdopplung der Zellzahl pro Well durch die Differenzierung festgestellt werden.

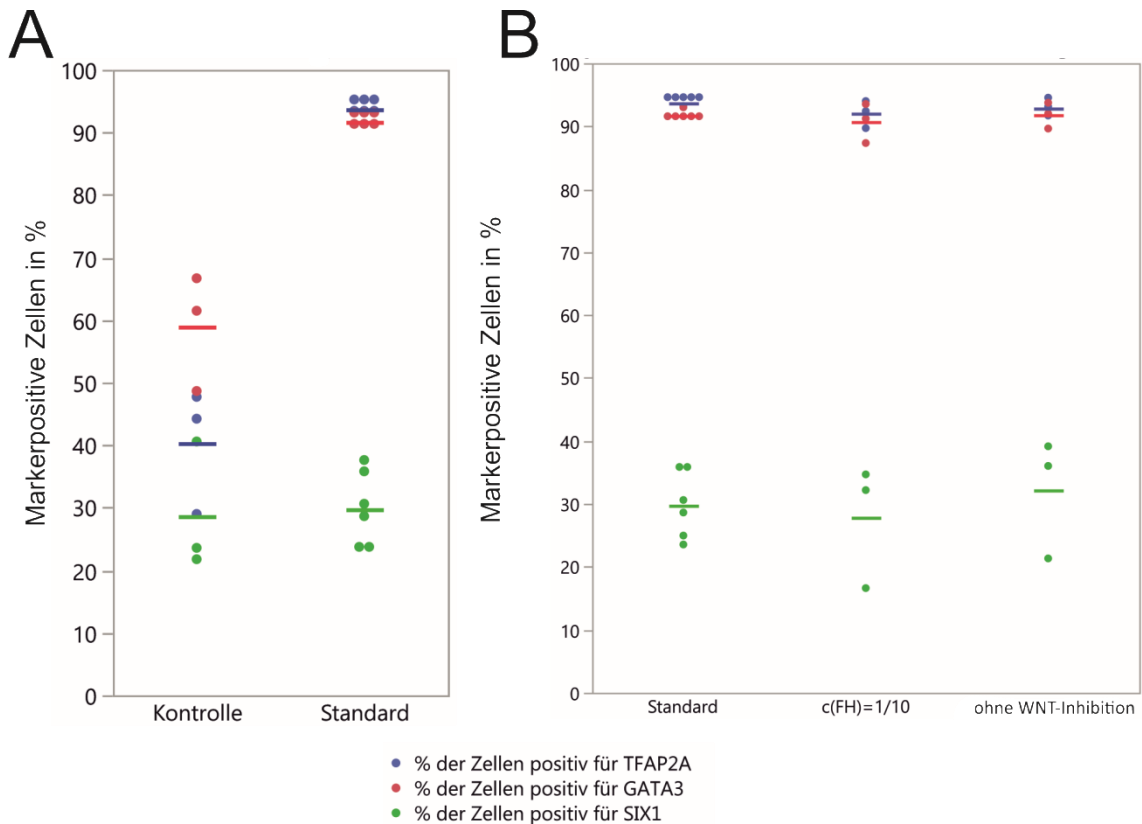


Abbildung 6: Expression der NNE-Marker in 8 Tage behandelten Zellen.

A: Zellen, die in Kontrollmedium inkubiert wurden, zeigten keine zielgerichtete Hochregulation der NNE-Markergene TFAP2A, GATA3 und SIX1. Jeder Datenpunkt entspricht einem Experiment bzw. Well (biologische Replikate, n=3), Mittelwerte als Linien dargestellt. Die mit Standardbehandlung inkubierten Zellen (Experimente: n=6) zeigen eine signifikante Hochregulation der Marker TFAP2A (p=0,011, t-test) und GATA3 (p=0,026, t-test), während die Expression von SIX1 niedrig persistiert und sich nicht signifikant ändert (p=0,86, t-test). B: Reduktion der WNT-Inhibition durch FH535 auf 1/10 der Konzentration (n=3, p=0,79, Steelttest) bzw. kompletter Verzicht auf WNT-Inhibition bzw. FH535 (n=3, p=0,62, Steelttest) brachte keine signifikante Änderungen in Bezug auf die Anzahl markerpositiver Zellen pro Experiment im Vergleich zur Standarddifferenzierung (n=6).

Aktivierung des BMP Signalwegs mit der Substanz BMP4

Zusätzliche Aktivierung des BMP Signalwegs durch BMP4 (20 ng/ml) für die ersten vier Tage veränderte die Anzahl der GATA3, TFAP2A und SIX1 positiven Zellen im Mittelwert nicht signifikant im Vergleich zur Standarddifferenzierung (n=3; TFAP2A: p=0,52; GATA3: p=0,13; SIX1: p=0,78; t-test). Auch wenn die WNT-Inhibition weggelassen wurde und die Zellen ausschließlich mit SB431542 inkubiert wurden, konnte BMP4 die Zahl der markerpositiven Zellen im Mittelwert nicht erhöhen (n=3; TFAP2A: p=0,50; GATA3: p=0,13; SIX1: p=0,16; t-test). Dasselbe gilt für den Zusatz von IGF1 zur Standarddifferenzierung mit BMP4 (n=2; TFAP2A: p=0,44; GATA3: p=0,30; SIX1: p=0,43; t-test).

Wenn die Inhibition des TGF- β Signalwegs mit der Substanz RepSox (12,5 μ M) statt SB431542 und ohne WNT-Inhibition durchgeführt wurde, war im Vergleich keine signifikante Veränderung in der Zahl der markerpositiven Zellen zu sehen (n=3; TFAP2A: p= 0,74; GATA3: p=0,82; SIX1: p=0,37; t-test).

Zeitweise BMP-Inhibition mit der Substanz LDN193189

Die BMP-Inhibition mit LDN193189 wurde entweder während der letzten beiden Tage der Differenzierung (Last 2 days = L2D; DIV 6-7, Behandlung 6) oder in den letzten vier Tagen (Last 4 days = L4D; DIV4-7) durchgeführt. Bei beiden Ansätzen konnte im Vergleich zur Standarddifferenzierung kein signifikanter Unterschied in der Rate der TFAP2A, GATA3 und SIX1 positiven Zellen beobachtet werden. Ausnahme war eine signifikante Erniedrigung der Anzahl der GATA3 exprimierenden Zellen unter der viertägigen Behandlung mit LDN193189 (t-test, L2D: n=2; TFAP2A: p=0,41; GATA3: p=0,90; SIX1: p=0,17; L4D: n=3, TFAP2A: p=0,28; GATA3: p=0,04; SIX1: p=0,18).

Weitere BMP Modulation

In diesem Experiment wurde der BMP Signalweg während DIV0-3 mit BMP4 aktiviert und anschließend an DIV4-7 mit LDN193189 inhibiert (Behandlung 7). Im Vergleich zum Standard konnte die Behandlung 7 die Expression der Gene

TFAP2A, GATA3 und SIX1 nicht signifikant verändern (n=3, TFAP2A: p=0,16; GATA3: p=0,26; SIX1: p=0,71; t-test). Auch beim Weglassen der WNT-Inhibition und der Differenzierung durch TGF- β -Inhibition konnte zusätzliche BMP Modulation nur bei GATA3 eine signifikante Erniedrigung, sonst keine signifikanten Änderungen erzeugen (n=3; TFAP2A: p=0,21; GATA3: p=0,03; SIX1: p=0,10; t-test).

Aktivierung des IGF Signalwegs

Der IGF Signalweg wurde durch die Substanz IGF1 mit einer Konzentration von 10 ng/ml aktiviert. Im Vergleich zur Standarddifferenzierung konnte der Zusatz von IGF1 über die gesamte Zeitspanne der Differenzierung von acht Tagen die Ausprägung der Marker nicht signifikant beeinflussen (n=2; TFAP2A: p=0,54; GATA3: p=0,54; SIX1: p=0,81; t-test). Dasselbe gilt, wenn zusätzlich SB431542 durch RepSox ersetzt wurde, BMP Modulation wie oben beschrieben durchgeführt wurde, oder BMP nur für die ersten vier Tage aktiviert wurde (DIV0-4, Werte nicht gezeigt).

Ist WNT-Inhibition notwendig für die Differenzierung von NNE?

In dieser Arbeit wurde die Inhibition des WNT Signalwegs mit der Substanz FH535 durchgeführt. Überraschenderweise wurden keine statistisch signifikanten Änderungen im Anteil der markerpositiven Zellen beobachtet, wenn FH535 nicht eingesetzt wurde (Steelttest, n=3, p=0,62). Auch die Reduktion von FH535 von 1 μ M auf 0.1 μ M auf ein Zehntel der Konzentration brachte keine signifikante Änderung der Ergebnisse (Steelttest, n=3, p=0,79, Abbildung 6, B).

3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie der Zellen des NNE auf 96-Well Platten

Nachdem die Experimente mit allen Komponenten und Behandlungen auf 24-Well Platten durchgeführt wurden, sollten sie anschließend auf 96-Well Platten durchgeführt werden, um die Bedingungen für Assays mit hohem Durchsatz

erfüllen zu können. Wir entschieden uns für acht unterschiedliche Behandlungen, die wir in diesem Setting testen wollten. Nr. 1 ist die Kontrollkondition, die keine signalwegaktiven Substanzen beinhaltet. Die anderen sieben Behandlungen sind in Kapitel 2.1.4 und Abbildung 4 erläutert.

Wir testeten die Behandlungen nun zusätzlich an der Zelllinie einer weiteren Spenderin. Die Prozedur der Reprogrammierung der Fibroblasten zu den hiPSZ der Zelllinie K7.1 ist exakt dieselbe.

Proliferation während der Differenzierung

Beide Zelllinien zeigten nach 8 Tagen Differenzierung eine Gesamtzellzahl von etwa 50.000 pro Well unter Kontrollbedingungen (DAPI positive Zellen, 5% KOSR-Medium, jeweils n=3, Abbildung 7). Da 15.000 Zellen pro Well zum Start der Differenzierung ausgesät wurden, zeigten die Zellen offensichtlich eine Proliferation, auch wenn berücksichtigt wird, dass nicht alle der 15.000 ausgesäten Zellen den Vorgang des Splittens überlebten.

Bei den Standarddifferenzierungen der beiden Zelllinien konnte nur die Linie K9.7 im Vergleich zur Kontrolle ihre Zellzahl verdoppeln, während die Zellen der K7.1 Linie auch in der Standarddifferenzierung eine ähnliche Zellzahl wie die Kontrolle zeigte.

Unter Behandlung zeigten die Zellen der Linie K7.1 außerdem in allen Konditionen außer 5 und 8 eine starke Proliferation bis zur Verdopplung der Anzahl der Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Nur die Zellen dieser beiden Behandlungen, die mit RepSox statt SB431542 (Behandlung 8) bzw. durchgehend zusätzlich mit LDN193189 (Behandlung 5) inkubiert wurden, zeigten eine niedrigere Zellzahl.

Bei den K9.7 Zellen proliferierten die Zellen in allen Behandlungen deutlich, allerdings zeigten auch hier die Konditionen 5 und 8 eine etwas geringere Proliferation im Vergleich zu den anderen Behandlungen (Abbildung 7).

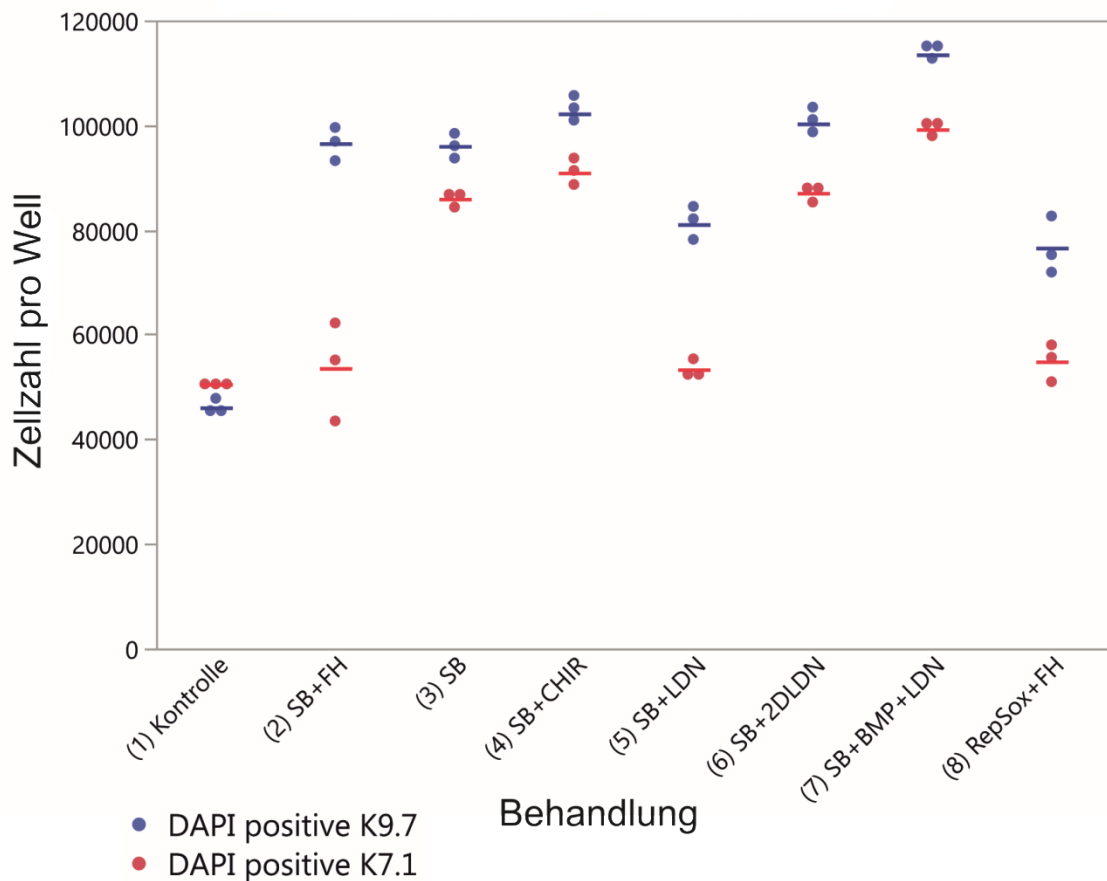


Abbildung 7: Einfluss der Behandlung auf die Zellzahl pro Well nach 8 Tagen Inkubation (NNE) in unterschiedlichen Medien.

Zelllinie K9.7 in blau, K7.1 in rot. Jeder Datenpunkt entspricht einem separaten Experiment, Mittelwerte als Linien dargestellt. Im Vergleich zur Kontrolle verdoppelte sich die Zellzahl in den Ansätzen 3, 4, 6 und 7. In den Behandlungen 2, 5 und 8 blieb die Proliferation der Zellen niedriger ausgeprägt. Alle Ansätze proliferierten ausgehend von 15.000 ausgesäten Zellen deutlich.

Expression der Markergene nach Differenzierung der K9.7 und K7.1 Zellen

Beide Zelllinien zeigten eine ähnliche Expression der NNE-Marker TFAP2A und GATA3 durch die Standarddifferenzierung (Abbildung 8 A und B).

Überraschenderweise zeigen die Ergebnisse der Kontrollgruppen deutliche Unterschiede: Während bei den K9.7 Zellen in der Kontrolle jeweils mehr als die Hälfte der Zellen TFAP2A (59%, n=3) und GATA3 (52%, n=3) positiv waren, waren diese Werte bei den K7.1 Zellen mit 21% (TFAP2A, n=3) und 7% (GATA3, n=3) deutlich niedriger. Dies könnte darauf hindeuten, dass das endogene TGF- β -Signaling in den Zellreihen unterschiedlich ausgeprägt war.

Der PPE-Marker SIX1 blieb in allen Ansätzen niedrig exprimiert. Die Standardbehandlung erzeugte eine nukleäre Expression der Markergene TFAP2A und GATA3, während SIX1 kaum exprimiert war.

Genexpression nach BMP-Inhibition mit LDN193189

Bei der dualen Inhibition des TGF- β - und BMP-Signalwegs war erstmals eine klare Expression des Markers SIX1 im Nukleus einer Subpopulation von Zellen erkennbar (Abbildung 9 B und C). Außerdem waren in diesen Subpopulationen die NNE-Marker TFAP2A (n=3, 20,7%) und GATA3 (n=3, 28,4%) reduziert, während sich die Anzahl der SIX1 positiven Zellen erhöhte (n=3, 36,2%, Daten in Abbildung 8, Behandlung 5). Nach diesen Ergebnissen färbten wir die Zellen zusätzlich mit dem neuronalen Marker TUJ1, der das neuronale Strukturprotein β -3-Tubulin bindet. In den Bildern (Abbildung 9) lassen sich zwei Zellpopulationen unterscheiden. In der einen wurde β -3-Tubulin (TUJ1) im Zytoplasma derjenigen Zellen, die SIX1 nukleär exprimieren, koexprimiert, während GATA3 in diesen Zellen nicht exprimiert war. In der anderen Population der TUJ1 negativen Zellen war auch SIX1 negativ, aber GATA3 positiv. Im Detail zeigten sich bei TUJ1 und SIX1 doppelpositiven Zellen deutliche Fortsätze, die an Neuriten erinnern (Abbildung 9, C). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Zellen durch die Behandlung mit LDN193189 in neuronale Richtung differenzieren. In unseren Experimenten war dann der Marker SIX1 exprimiert.

Andere Behandlungen mit Modulation der WNT- und BMP Signalwege

Wir testeten weitere Kombinationen von WNT-Aktivierung, WNT-Inhibition sowie BMP-Aktivierung und BMP-Inhibition (Behandlungen 2-8). Keine dieser Behandlungen konnte im Vergleich zur Standarddifferenzierung deutliche Unterschiede in den untersuchten Markern hervorrufen (Abbildung 8). Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse der Versuche auf 24-Well Platten und zeigen damit, dass sich das System auch auf 96-Well Platten anwenden lässt. Die frühe Differenzierung der Zellen zu NNE lässt eine relativ breite Variation der Aktivität der beteiligten Signalwege zu.

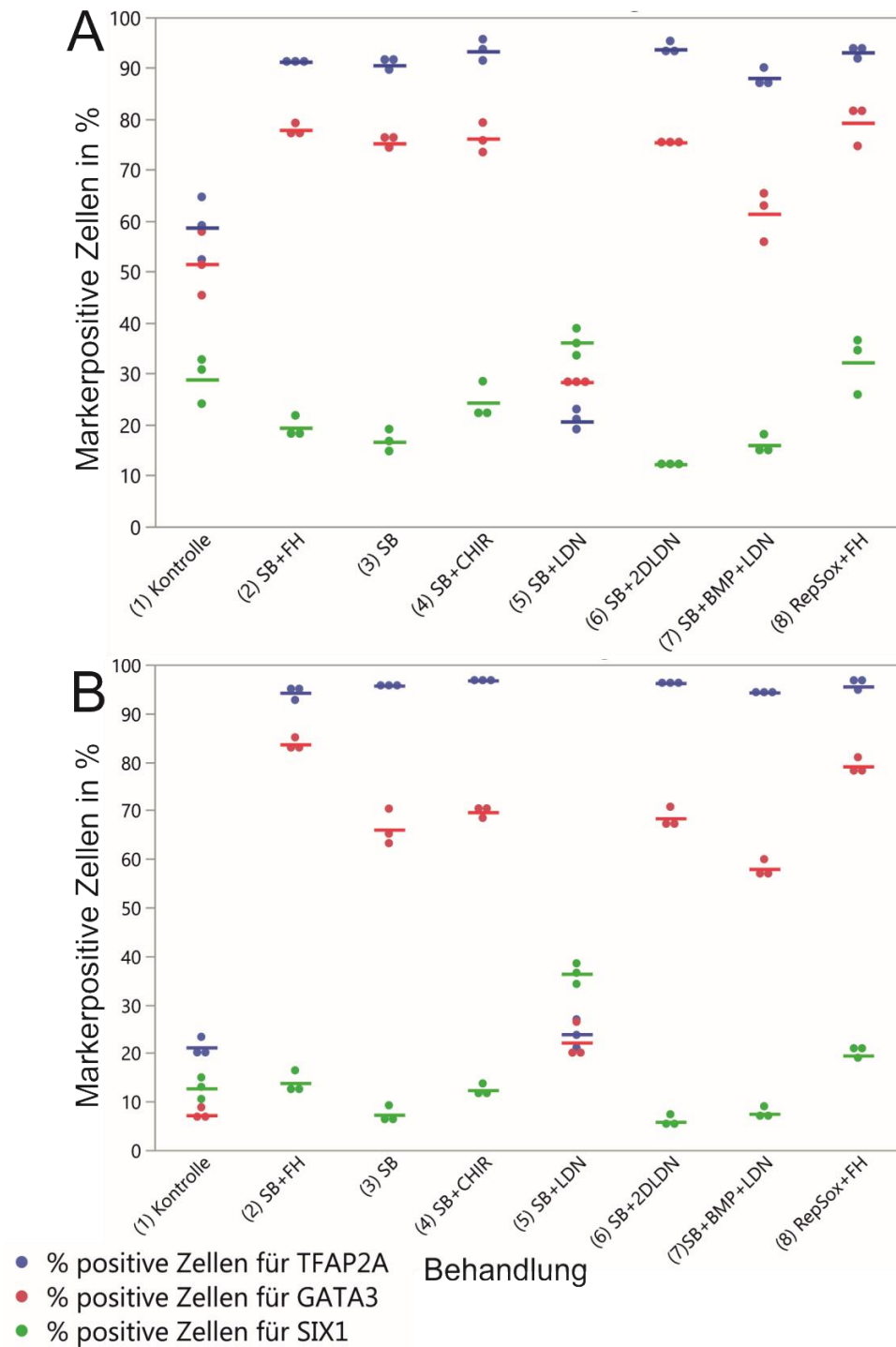


Abbildung 8: Anzahl der markerpositiven Zellen der Zelllinie K9.7 (A) und K7.1 (B) nach 8 Tagen Inkubation (NNE) in %.

A und B: Jeder Datenpunkt entspricht einem unabhängigen Experiment (n=3), Mittelwerte als Linien dargestellt. Deutliche Hochregulation der Marker TFAP2A und GATA3 in allen Ansätzen außer der Kontrolle sowie Behandlung 4. SIX1 bleibt in allen Behandlungen niedrig exprimiert. In der Kontrollkondition sind alle drei untersuchten Gene bei der Zelllinie K9.7 etwas höher exprimiert.

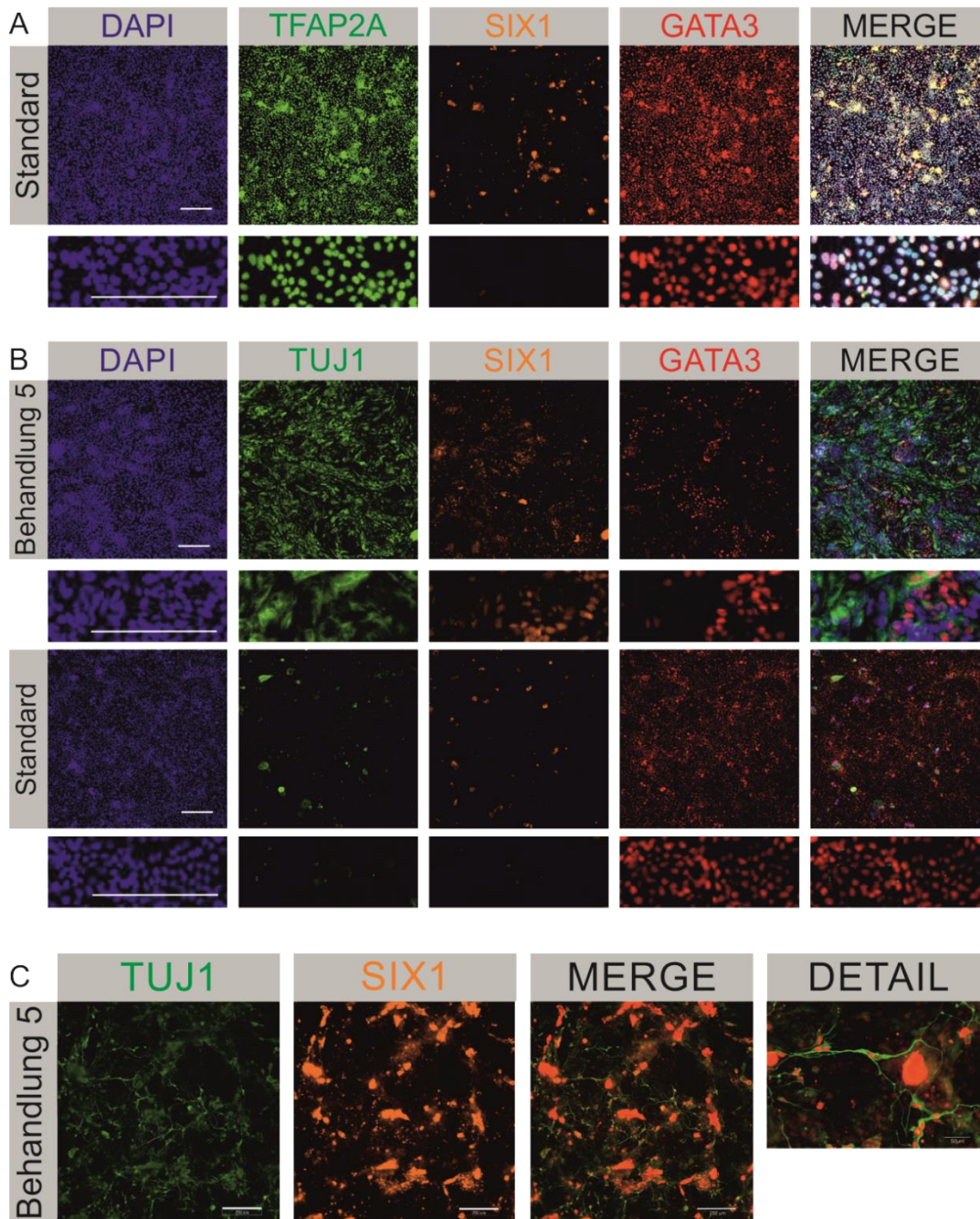


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopie von Zellen der Standardbehandlung und Behandlung 5 nach 8 Tagen Inkubation (NNE).

A: Die Marker TFAP2A sowie GATA3 sind nukleär exprimiert. SIX1 hingegen ist nicht exprimiert. B: Obere Zeile: Durchgehende Behandlung mit LDN193189 zusätzlich zu SB431542. Der neuronale Marker β -3-Tubulin (TUJ1) ist hochexprimiert, gleichzeitig erscheint SIX1 deutlicher nukleär exprimiert. GATA3 hingegen ist nur in Zellen positiv, die SIX1 und TUJ1 negativ sind. Untere Zeile: in der Standardbehandlung bleiben TUJ1 und SIX1 niedrig exprimiert, GATA3 ist hochexprimiert. C: In Behandlung 5 zeigten sich im Detail bei einigen Zellen Neuriten, die positiv für β -3-Tubulin/TUJ1 sind. In diesen Zellen ist SIX1 nukleär exprimiert. MERGE: Überlagerung aller 4 Wellenlängen zum Gesamtbild Maßstabsbalken: 250 μ m bzw. 50 μ m im Detailbild.

3.3 Differenzierung der hiPSZ zu otischen Progenitorzellen (OPZ)

Aus den Vorexperimenten zur Erzeugung von NNE wurden aus versuchstechnischen Gründen für die immunzytochemischen Färbungen in 96-Well Platten die vielversprechendsten 8, für die qPCR Analyse in 6-Well Platten 6 verschiedene Behandlungen ausgewählt, die als Basis für die weitere Differenzierung dienten. Ab Tag 8 wurde nun das NNE wie in Kapitel 2.1 beschrieben durch Modulation der BMP-, FGF-, und WNT-Signalwege behandelt, diese Phase der Behandlung von DIV9-DIV18 bzw. DIV20 wird als OPZ-Behandlung bezeichnet (OPZ: otische Progenitorzellen, Abbildung 3 A). Von den 8 unterschiedlichen Behandlungen der Ansätze für die Untersuchung mit der Immunzytochemie konnten die Zellen von 5 Behandlungen bis DIV18 kultiviert und anschließend analysiert werden, von den 6 Behandlungen der qPCR Analyse ebenso 5. Die Zellen der Kontrolle, die nur mit Medium inkubiert wurden, gingen wie auch in früheren Experimenten zwischen DIV10 und DIV12 in Apoptose. Die durchgehende Behandlung mit dem BMP-Inhibitor LDN193181 sowie die Verwendung des deutlich aktiveren TGF- β -Inhibitors RepSox anstelle von SB431542 überlebten die Zellen nach Tag 8 nur in den 6-Well Ansätzen.

Zwischen DIV13-16 konnte eine lichtmikroskopisch sichtbare Transformation der Morphologie der Zellen beobachtet werden. Die bisher pleomorphen Zellen entwickelten pentagonalen, epithelartigen Charakter (Abbildung 10). In der E-Cadherinfärbung (Abbildung 11, B) konnte dies auf Proteinebene nachvollzogen werden. Die Expression der qualitativ untersuchten Gene unterscheidet sich in der Lokalisation (nukleär bzw. zytoplasmatisch oder oberflächlich) sowie in der Intensität. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen sind in Abbildung 11 A-D und A'-D' dargestellt.

Einige Ansätze der Zellkulturen konnten nicht über die angestrebte Zeit in Kultur gehalten werden. Auch über die 20 Tage hinaus gingen die Zellen oft zugrunde, bevor sie immunzytochemisch untersucht werden konnten. Wir konnten dafür keine offensichtliche Erklärung wie beispielsweise eine Kontamination durch

Bakterien oder Pilze finden, die im Lichtmikroskop zu sehen gewesen wäre.
Auch ein Test auf intrazelluläre Mykoplasmen fiel negativ aus (Siehe Anhang).

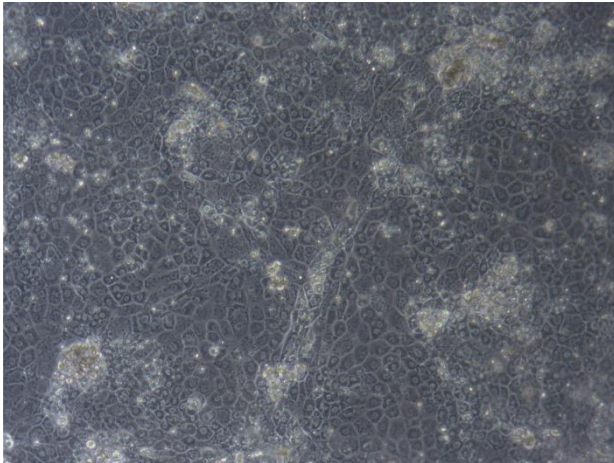


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahme des Zellrasens auf einer 6-well Platte an DIV16.

Die Zellen entwickeln im Zellverbund einen polygonalen, epithelartigen Charakter.
Vergrößerung: 10X.

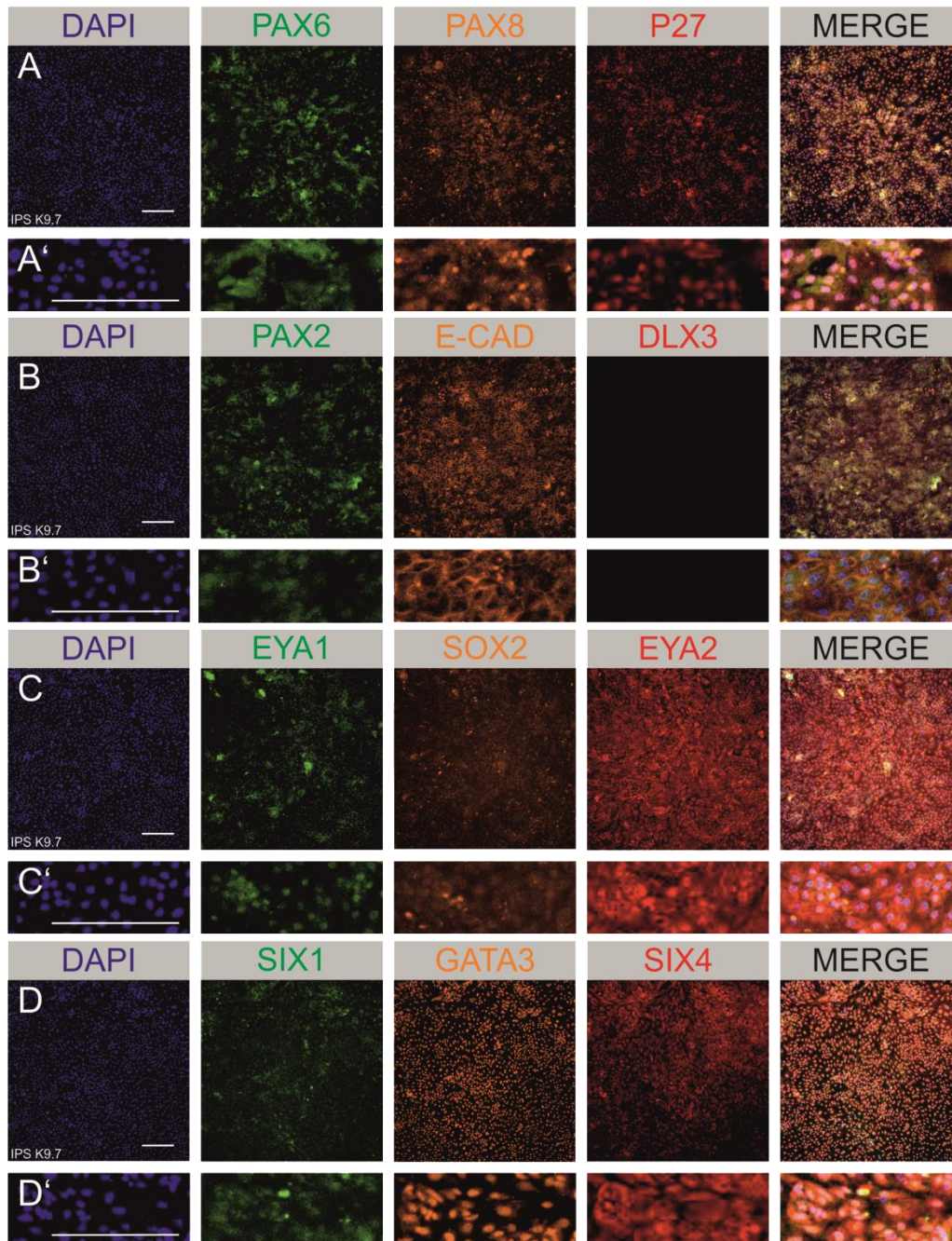


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Zellen der Linie K9.7 nach OPZ-Behandlung.

A-D: Zellen aus der Standard-NNE-Behandlung bis DIV8 und mit FGF2-Behandlung von DIV9-18: Dargestellt sind pro Reihe 3 untersuchte Markergene zusammen mit DAPI. Einige Gene wie beispielsweise GATA3 und P27 sind nukleär exprimiert, E-CAD wurde vor allem an der Zelloberfläche gefunden, die Expression von SIX4, SIX1, EYA1, EYA2, SOX2, PAX2, PAX6 und PAX8 stellt sich diffus dar, es findet sich keine Expression von DLX3. Die Expression der untersuchten Gene unterscheiden sich zwischen einzelnen Zellpopulationen. OPZ: otische Progenitorzellen. MERGE: Überlagerung aller 4 Wellenlängen zum Gesamtbild. DIV: Day *in vitro* (Behandlungstag). A'-D': Vergrößerung. Maßstabsbalken: 250 µm.

3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie der otischen Progenitorzellen nach 20 Tagen Behandlung auf 96-Well Platten

FGF2 im Vergleich mit FGF3 und FGF10

Um die Immunfärbung zu quantifizieren, wurde die Segmentierungsanalyse wie in Kapitel 2.3.1 durchgeführt. Die Ergebnisse der Immunfärbungen legen nahe, dass sich die mit FGF2 induzierten Zellen nach insgesamt 20 Tagen Behandlung bei den untersuchten Markern nicht wesentlich von den mit FGF3 und FGF10 induzierten Zellen unterscheiden (Abbildung 12 A-D und A'-D').

Einfluss der NNE-Behandlungen auf die Genexpression nach 20 Tagen

Innerhalb der verschiedenen Behandlungen der NNE-Induktion waren Unterschiede nach 20 Tagen Behandlung vor allem in der Expression der Marker PAX8 und SOX2 sichtbar (Abbildung 12 A und A' sowie C und C'). Die Expression beider Gene war in den Behandlungen mit CHIR99021 (Behandlung 4) sowie der Behandlung 7 geringer ausgeprägt. Diese Unterschiede traten aber unabhängig von der FGF-Behandlung (DIV9-20) auf und waren nur abhängig von der vorausgehenden NNE-Behandlung (DIV0-8).

Auch das Fehlen der WNT-Inhibition (Behandlung 3, „SB“) hatte wie in den Vorexperimenten zur Erzeugung des NNE keine deutliche Auswirkung auf die Expression der untersuchten Gene.

Der Marker SIX1 wurde bei den Behandlungen 2 und 3 am höchsten exprimiert, bei denen weder der BMP-Signalweg manipuliert, noch der WNT-Signalweg aktiviert wurde (Abbildung 12 D).

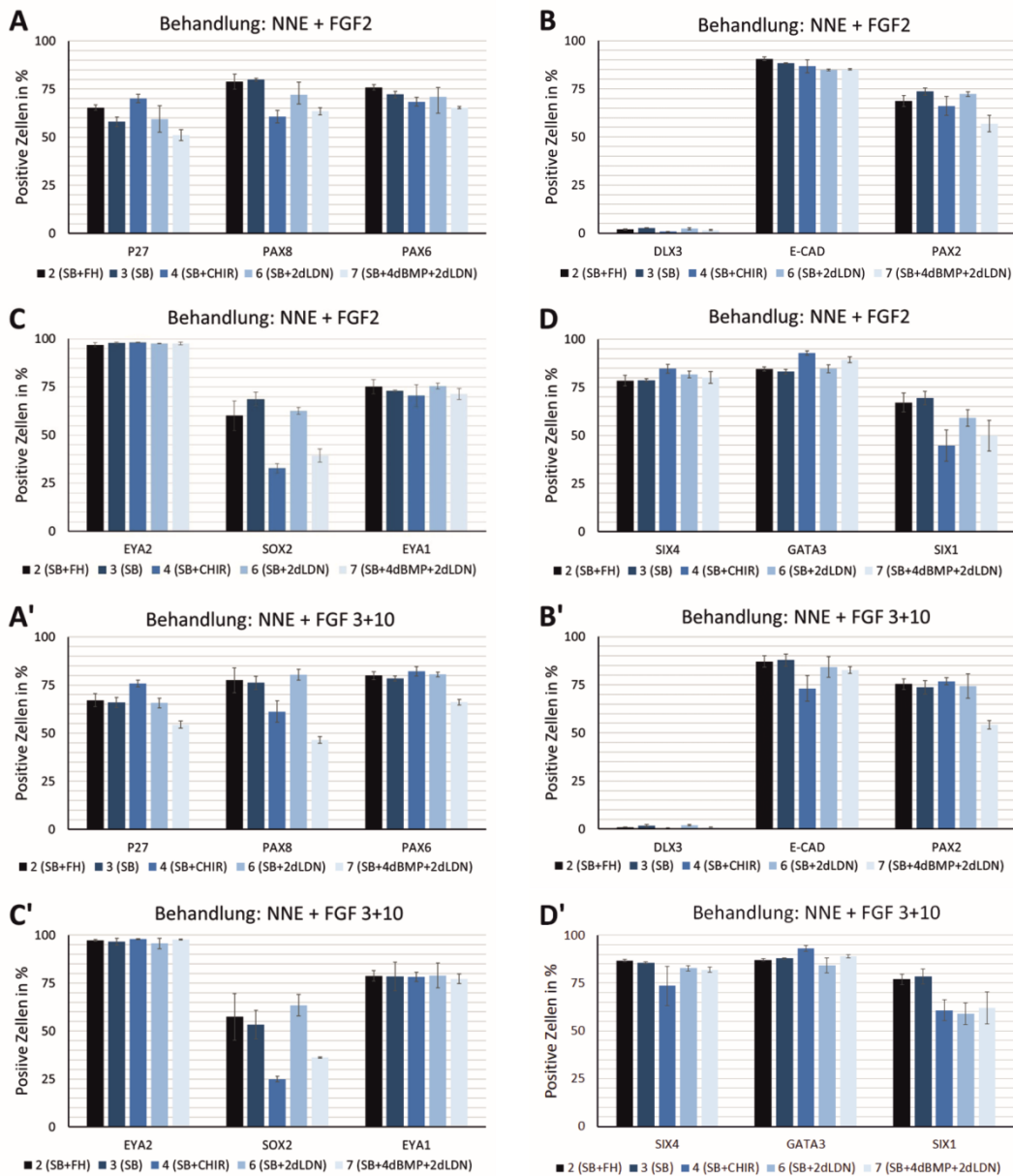


Abbildung 12: Quantitative Analyse der unterschiedlich differenzierten Zellen der Linie K9.7 nach insgesamt 20 Tagen Behandlung.

Dargestellt sind 5 unterschiedliche Behandlungen bis DIV8 (Balkenfarbe) und Behandlung mit u.A. FGF2 (A-D) bzw. FGF 3+10 (A'-D') von DIV9 bis DIV20. Auch in der quantitativen Analyse ist die Expression der untersuchten Gene zwischen der Gruppe der mit FGF2 behandelten Zellen und den mit FGF3 und 10 behandelten Zellen ähnlich. Die Expression von PAX8 und SOX2 ist bei Inkubation mit dem WNT-Aktivator CHIR99021 bzw. der BMP-Modulation erniedrigt (Behandlung 4 und 7). Es kann also von der Gleichwertigkeit der FGF-Behandlung (DIV9-20) ausgegangen werden, Unterschiede in der Genexpression entstehen vielmehr aufgrund der vorausgegangenen NNE-Behandlung. Gezeigt ist der Mittelwert aus je 3 unabhängigen Experimenten, +/- einer Standardabweichung. NNE: Nicht-neurales Ektoderm, DIV: Day *in vitro* (Behandlungstag).

In Bezug auf die Proliferation, also die Anzahl der DAPI positiven Zellen pro Well, zeigten sich vergleichbare Werte: Sowohl die mit FGF2 induzierten als auch die mit FGF3 und FGF10 induzierten Ansätze zeigten ähnliche Zellzahlen (Abbildung 13). Als Ausnahme entpuppten sich jeweils die Behandlungen, die in der NNE-Differenzierung (DIV0-8) mit dem WNT-Aktivator CHIR99021 induziert worden waren: Dort wurden im Durchschnitt fast doppelt so hohe Zellzahlen beobachtet. Ausgesät wurden je Well 15.000 Zellen, somit ist mit Berücksichtigung von Verlusten beim Ausbringen bei allen Ansätzen von einer deutlichen Proliferation auszugehen.

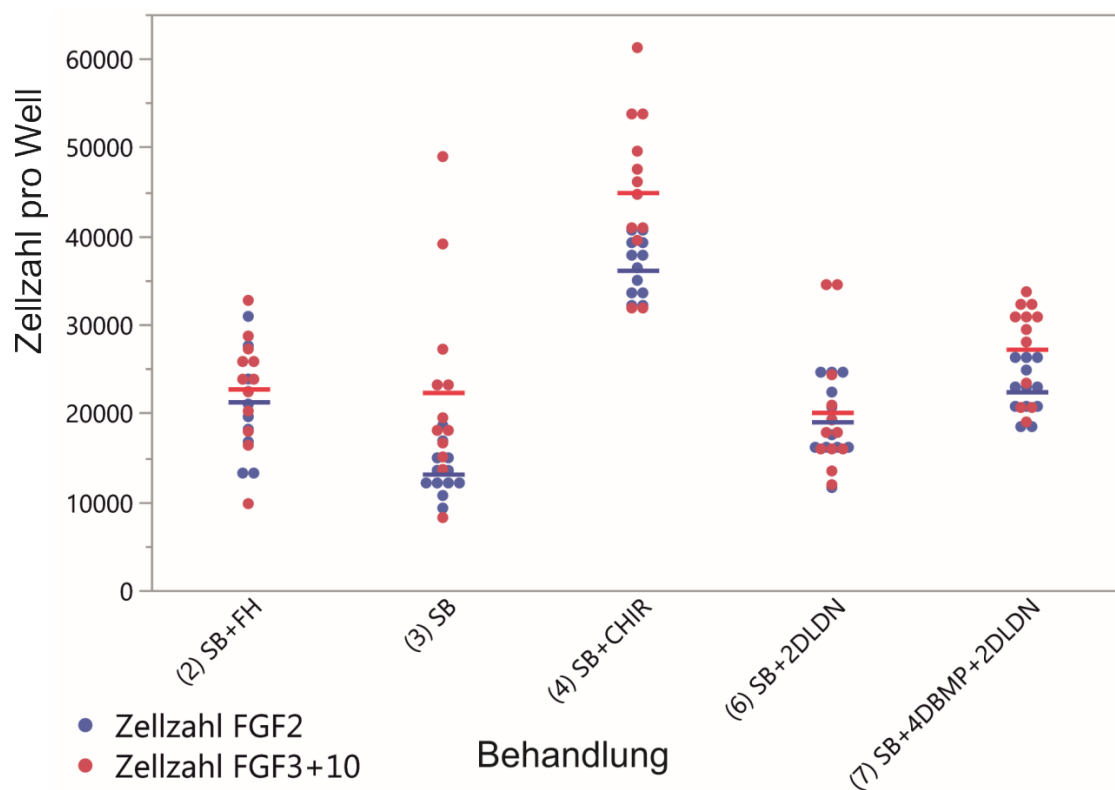


Abbildung 13: Anzahl DAPI positiver Zellen pro Well (96-Well Platten) nach insgesamt 20 Tagen Behandlung abhängig von der vorausgegangenen NNE-Behandlung.

Die Experimente mit den unterschiedlichen FGF-Behandlungen (Farbe der Datenpunkte) zeigen ähnliche Zellzahlen. Jeder Datenpunkt entspricht einem Experiment (biologische Replikate), Mittelwert als Linie dargestellt. Bei WNT-Aktivierung durch CHIR99021 (Behandlung 4, SB+CHIR) proliferierten die Zellen deutlich stärker. Die Streuung der Zellzahlen der einzelnen Wells ist bei der Behandlung mit FGF3 und FGF10 größer.

Interessanterweise waren es auch genau diese mit CHIR99021 induzierten Ansätze, die eine niedrigere Expression von PAX8 und SOX2 zeigten als die anderen Ansätze (vgl. Abbildung 12 A und A', sowie C und C'). Die höhere Proliferationsrate scheint also einen direkten Einfluss auf die Expression dieser Gene zu haben.

3.4 Untersuchungen der Genexpression der otischen Vorläuferzellen mittels multi-qPCR (Fluidigm™)

Ziel der Untersuchungen mittels Fluidigm™ ist eine Einordnung und ein Vergleich der Zellpopulationen untereinander. So können Ähnlichkeiten und Unterschiede der Zellen aufgezeigt werden, die durch Zelllinie, Inkubationszeit und Behandlung entstanden sind. In t-SNE Abbildungen stehen die sich in der Expression der Gene ähnelnde Proben näher aneinander als die sich stärker unterscheidenden Proben (siehe Kapitel 2.4.3).

3.4.1 Vergleich der Zelllinien und Inkubationszeit

Die Muster der Genexpression der Zellen der beiden unterschiedlichen Zelllinien K9.7 und K7.1 verhalten sich ähnlich, die Proben verteilen sich für die jeweilige Inkubationszeit im t-SNE diffus und bilden keine Cluster (Abbildung 14). Dies bestätigt die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchung. Die Zellen unterschieden sich vielmehr durch die Dauer der Behandlung. Die Zellen, die 8 Tage inkubiert wurden (DIV8) clustern gemeinsam, deutlich abgesondert davon gruppieren sich die 18 Tage lang differenzierten Zellen. Einige Gene scheinen für die Entstehung dieser Cluster eine besonders große Rolle zu spielen. Die Gene, die dafür die größte Rolle spielen, sind in Tabelle 17 und 18 aufgeführt (jeweils $p < 0,00026$, nach Bonferroni-Korrektur).

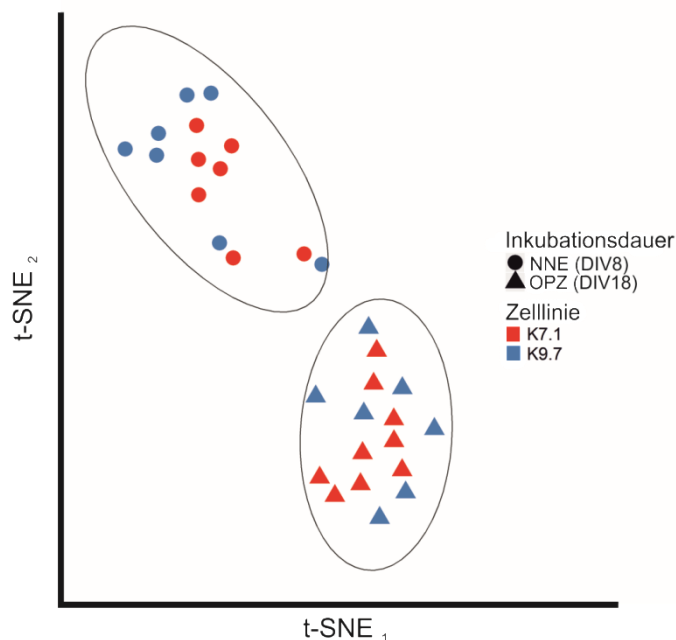


Abbildung 14: t-SNE Darstellung der Proben in der Fluidigm™ Genanalyse in Abhängigkeit der Zellreihe.

Messpunkte, die nahe aneinander liegen, sind sich in ihrer Genexpression ähnlicher als solche, die weiter auseinander liegen. Cluster bilden sich hier in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Kreise vs. Dreiecke). Die Zelllinie hat keine Auswirkung auf die Cluster und somit die Genexpression der Zellen (Farbe der Messpunkte, Zellreihen K7.1 bzw. K9.7). NNE: nicht-neuronales Ektoderm, OPZ: otische Progenitorzellen, DIV: Day *in vitro* (Behandlungstag), t-SNE: t-distributed stochastic neighbor embedding.

Tabelle 17: Gene, die in 8 Tage induzierten Zellen (NNE) signifikant höher exprimiert sind als in 18 Tagen induzierten Zellen (OPZ), sowie die Spezifität dieser Gene.

Gen	Spezifität	Gen	Spezifität
NANOG	Pluripotenz	MYO3A	Haarzelle
POU5F1	Pluripotenz	MYO7A	Haarzelle
DLX5	NNE/PPE	POU3F4	Haarzelle
DLX6	NNE/PPE	USH1C	Haarzelle
EYA1	NNE/PPE	HEY2	Stützzelle
EYA2	NNE/PPE	PLP1	Stützzelle
FOXI3	NNE/PPE	S100A1	Stützzelle
MSX1	NNE/PPE	COL11A2	Cochlea
TFAP2C	NNE/PPE	MCM2	Zellzyklus
BRIP1	Otisch	FZD3	WNT
OC90	Otisch	FZD4	WNT

OTX2	Otisch	FZD5	WNT
PAX2	Otisch	FGFR1	FGF
SOX10	Otisch	FGFR2	FGF
CDH2	Neuronal	FGFR4	FGF
EMX2	Neuronal	SPRY2	FGF
FOXD3	Neuronal	ACVR2A	BMP/TGF
HOXB1	Neuronal	BMP4	BMP/TGF
ISL1	Neuronal	LMX1B	BMP/TGF
NTF3	Neuronal	AXIN1	Notch
ATOH1	Haarzelle	DLL1	Notch
CALB1	Haarzelle	GLI3	Hedgehog
CALB2	Haarzelle	HPRT	Referenz
C1QL1	Haarzelle		

Tabelle 18: Gene, die in 18 Tage induzierten Zellen (OPZ) signifikant höher exprimiert sind als in 8 Tage induzierten Zellen (NNE), sowie die Spezifität dieser Gene.

Gen	Spezifität	Gen	Spezifität
KLF4	Pluripotenz	GJB2	Stützzelle
FOXJ3	NNE/PPE	GJB3	Stützzelle
GATA3	NNE/PPE	HES1	Stützzelle
TFAP2A	NNE/PPE	HES2	Stützzelle
TLE3	NNE/PPE	HES5	Stützzelle
SIX4	NNE/PPE	AQP1	Cochlea
FBXO2	Otisch	EYA4	Cochlea
SOX9	Otisch	OTOS	Cochlea
BDNF	Neuronal	DKK1	WNT
EN2	Neuronal	FZD1	WNT
HOXA1	Neuronal	FZD2	WNT
JAK1	Neuronal	FZD8	WNT
KCNQ4	Neuronal	WNT2B	WNT
PRPH2	Neuronal	WNT6	WNT
TUBB3	Neuronal	WNT7A	WNT
EPCAM	Epithelial	ACVR1B	BMP/TGF
PCP2	Zellpolarität	BAMBI	BMP/TGF
CDKN1A	Zellzyklus	ID2	BMP/TGF
CDKN2A	Zellzyklus	ID3	BMP/TGF
CDKN2D	Zellzyklus	ID4	BMP/TGF
CCND1	Zellzyklus	NOG	BMP/TGF
ESPN	Haarzelle	NOTCH1	Notch
JAG2	Haarzelle	NOTCH2	Notch

LBH	Haarzelle	NOTCH3	Notch
OCM	Haarzelle	HES7	Notch
TMC1	Haarzelle	GLI2	Hedgehog
TMC2	Haarzelle	GLI4	Hedgehog
EGRF	Stützzelle	SHH	Hedgehog
GJB1	Stützzelle	ACTB	Referenz

3.4.2 Unterschiede in der Genexpression der Zellen durch NNE-Behandlung

Übersicht

In der nach NNE-Behandlung aufgeschlüsselten Darstellung lassen sich verschiedene kleine Cluster beobachten (Abbildung 15): zum einen die beiden Kontrollen der DIV8-Zellen (rote Punkte, eingekreist), die sich deutlich von den anderen großen Gruppen abheben. Außerdem clusterten die Zellen, die zusätzlich zur TGF- β -Inhibition durch SB431542 mit dem BMP-Inhibitor LDN193189 behandelt wurden. Dabei stehen die Zellen, die die vollen 8 Tage mit LDN193189 behandelt wurden (graue Punkte, eingekreist) deutlich separiert von den anderen DIV8-Zellen. In der Gruppe der 18 Tage induzierten Zellen (Dreiecke) stehen außerdem diejenigen Proben, die zusätzlich zur TGF- β -Inhibition in den letzten 2 Tage mit LDN193189 behandelt wurden (lilafarbene Dreiecke, eingekreist), gruppiert.

Ansonsten zeigt sich eine eher diffuse Verteilung der Proben, was darauf hindeutet, dass die Behandlung der ersten 8 Tage (NNE-Behandlung) vor allem von der TGF- β -Inhibition abhängig ist, weniger von der sonstigen Manipulation der untersuchten Signalwege. Dies gilt sowohl für die Genexpression der Zellen nach acht Tagen als auch für die nach 18 Tagen.

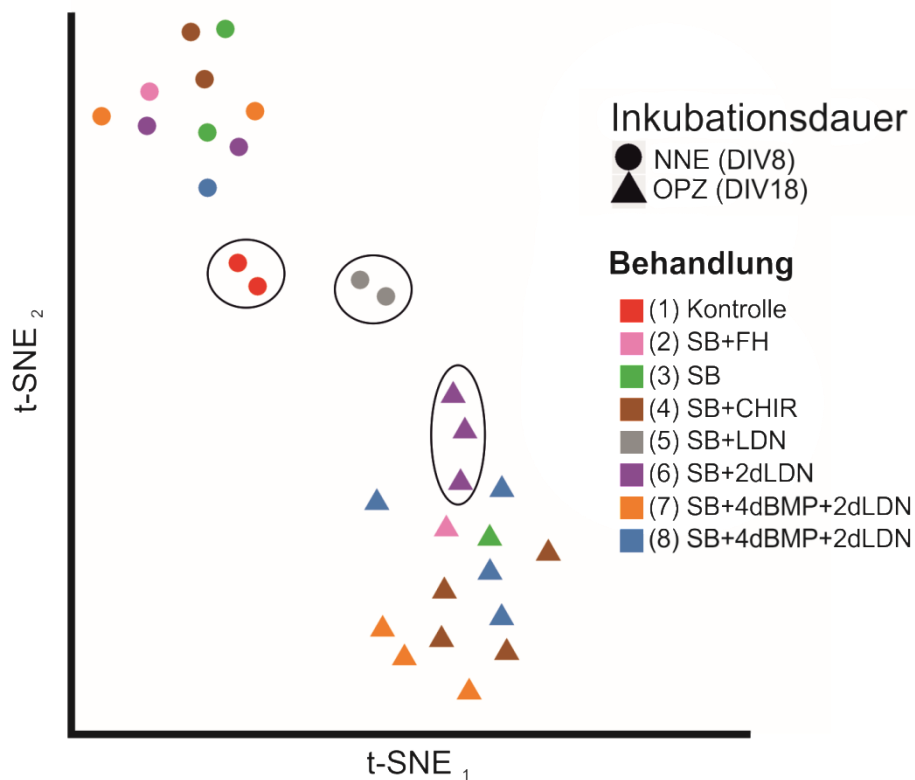


Abbildung 15: t-SNE Darstellung der Proben in der Fluidigm Genanalyse, aufgeschlüsselt nach NNE-Behandlung.

Proben, die nahe aneinander liegen, sind sich in ihrer Genexpression ähnlicher als solche, die weiter auseinander liegen. Cluster bilden sich abhängig von der NNE-Behandlung (Farben). Dabei sondern sich die Proben der Kontrolle (rot) und der durchgehenden Behandlung mit LDN193189 (grau) deutlich von den restlichen DIV8-Zellen ab. Zellen, die die letzten zwei Tage mit LDN193189 behandelt wurden (lila) gruppieren sich unter den DIV18-Zellen jeweils enger. NNE: nicht-neurales Ektoderm, OPZ: otische Progenitorzellen, DIV: Day *in vitro* (Behandlungstag).

Sonderstellung OPZ der NNE-Behandlung 6

Die Proben der Behandlung 6 nehmen unter den OPZ eine Sonderstellung ein (s.o.). Tabelle 19 und 20 zeigen die Gene, die für den Unterschied dieser Behandlung im Vergleich zu allen anderen OPZ die größte Bedeutung haben (t-test, $p < 0,00026$ nach Bonferonikorrektur).

Table 19: Gene, die bei DIV18-Zellen der NNE-Behandlung 6 signifikant höher exprimiert sind als im Durchschnitt der DIV18 OP-Zellen, sowie die Spezifität dieser Gene.

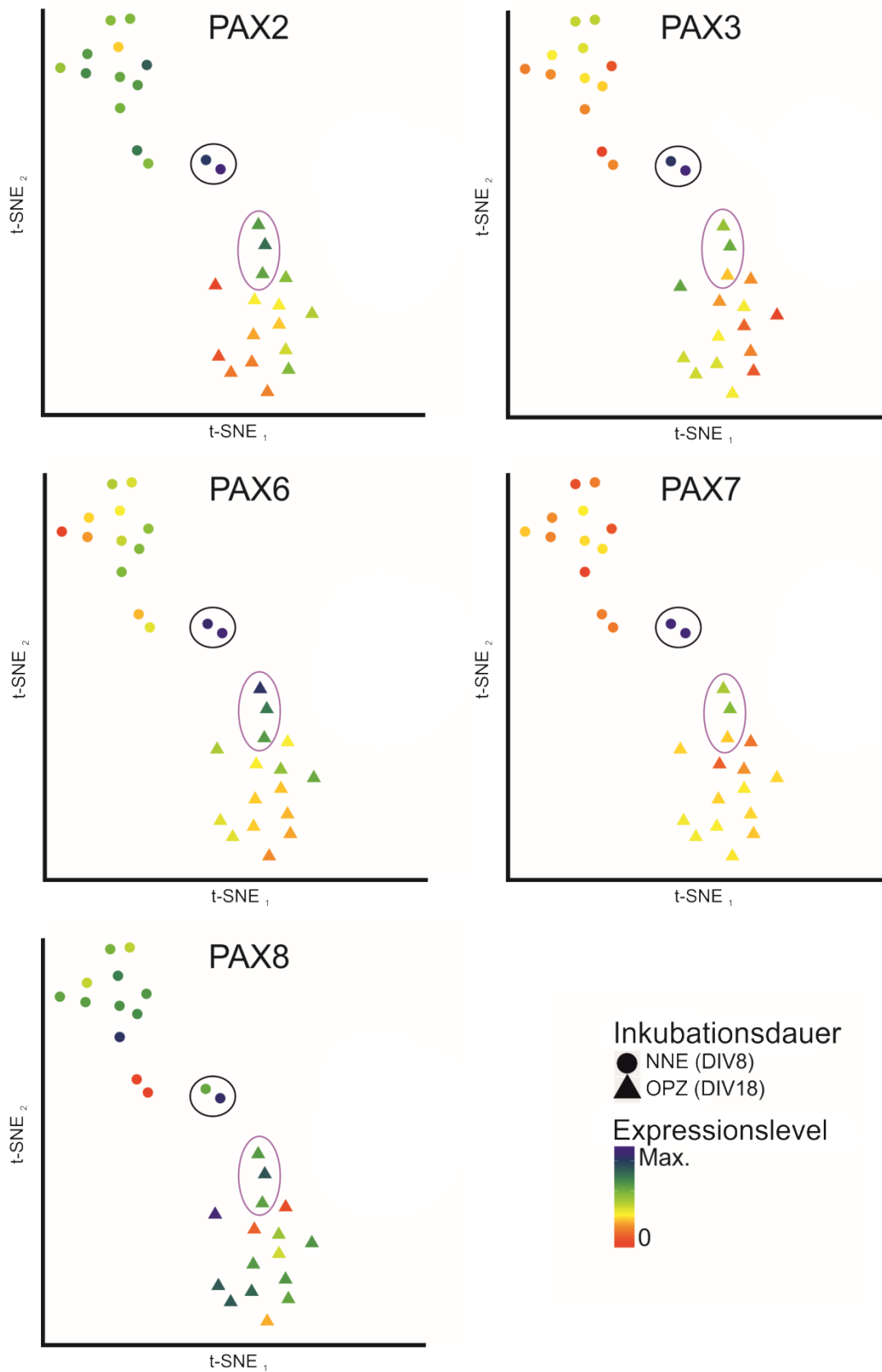
Gen	Spezifität	Gen	Spezifität
DACH1	NNE/PPE	CLRN1	Haarzelle
EYA2	NNE/PPE	PLP1	Stützzelle
MSX1	NNE/PPE	SOX2	Stützzelle
SIX1	NNE/PPE	EYA4	Cochlea
OTX1	Otisch	BMP4	BMP/TGF
PAX2	Otisch	LMX1B	BMP/TGF
EMX2	Neuronal	FGF8	FGF
HOXB1	Neuronal	FGF9	FGF
NEUROG2	Neuronal	FGF19	FGF
ZIC1	Neuronal	SHH	Hedgehog
ZIC2	Neuronal	SMO	Hedgehog
PAX6	Anteriore Plakode		

Table 20: Gene, die im Durchschnitt der DIV18 OP-Zellen signifikant höher exprimiert sind als bei DIV18-Zellen der NNE-Behandlung 6, sowie die Spezifität dieser Gene.

Gen	Spezifität	Gen	Spezifität
DLX3	NNE/PPE	LBH	Haarzelle
DLX6	NNE/PPE	EGFR	Stützzelle
GATA2	NNE/PPE	SLC1A3	Stützzelle
MSX2	Neuronal	FZD6	WNT

Untersuchung wichtiger otischer Gene

Einige, für die otische Entwicklung wichtige Gene, sind in Abbildung 16 separat in t-SNE-Plots aufgetragen, um die Auswirkung der unterschiedlichen Behandlungen sowie der Behandlungszeit vergleichen zu können.



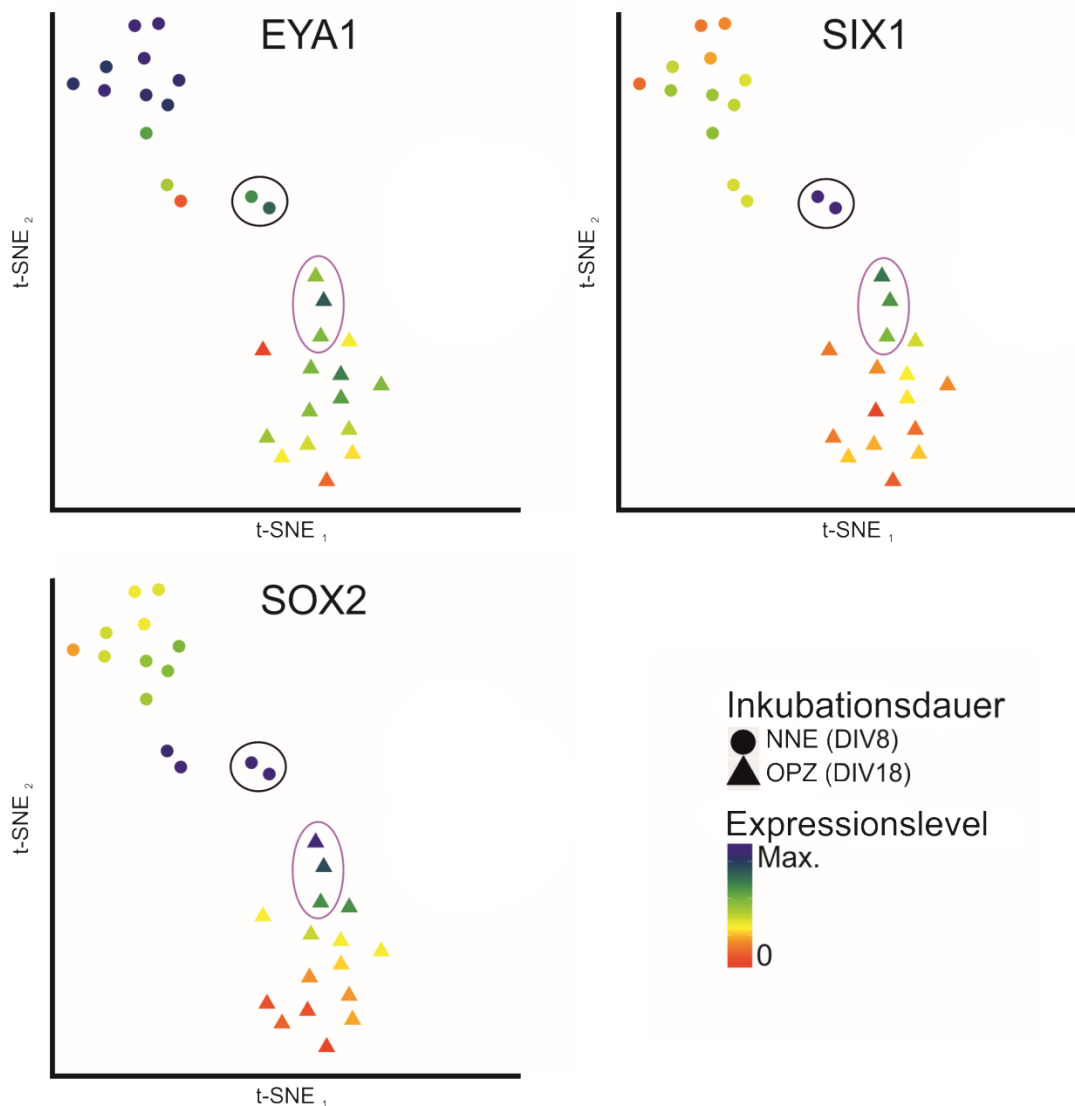


Abbildung 16: t-SNE Darstellung der Proben der Fluidigm™ Genanalyse, aufgeschlüsselt nach der Expression ausgesuchter otischer Gene.

EYA, SIX, PAX und SOX-Genfamilien. Hohe Expression der jeweiligen Gene blau dargestellt, niedrige Expression rot. Die Formen (Punkte vs. Dreiecke) kodieren für die Behandlungsdauer (Punkte 8 Tage, Dreiecke 18 Tage). Die jeweils zugehörige NNE-Behandlung kann an Abbildung 15 abgelesen werden. Die Zellen, die mit LDN193189 behandelt wurden (schwarz umrandet), zeigen eine hohe Expression aller untersuchten PAX-Gene, sowie von SOX2 und SIX1. Die DIV18-OPZ, die nur in den letzten beiden Tagen zusätzlich mit LDN193189 behandelt wurden (violett umrandet) zeigen im Vergleich mit den anderen DIV18-Zellen die höchsten Expressionslevel der untersuchten Gene. NNE: nicht-neurales Ektoderm, OPZ: otische Progenitorzellen. NNE: Nicht-neurales Ektoderm, OPZ: otische Progenitorzellen, Max.: Maximale Expression, t-SNE: t-distributed stochastic neighbor embedding.

Die Gruppe der PAX-Gene zeigte eine höhere Expression in den durchgehend mit LDN193189-behandelten Proben (schwarz eingekreist, blaue Datenpunkte), sowohl die für die otische Entwicklung wichtigen Gene PAX2 und PAX8 aber auch PAX3, PAX6 und PAX7. Die Proben der DIV18-OPZ der NNE-Behandlung 6 sind violett eingekreist, so kann deren Expressionslevels der PAX-Gene nachvollzogen werden.

SOX2, das sowohl bei pluripotenten, als auch bei otischen Zellen im Verlauf immer wieder eine Rolle spielt, wurde vor allem bei den Kontrollen, sowie den durchgehend mit LDN193189-behandelten NNE-Zellen (Behandlung 5, schwarz eingekreist) als auch den DIV18-OPZ der NNE-Behandlung 6 hoch exprimiert (violett eingekreist).

3.4.3 NNE und OPZ im Vergleich

Im direkten Vergleich der Populationen der NNE-Proben und der OPZ-Proben konnten einige interessante Entdeckungen gemacht werden. So war EYA1 bei den NNE-Zellen deutlich höher exprimiert als bei den OPZ. SIX1 hingegen wurde verstärkt bei den beiden Proben gefunden, die durchgehen mit dem BMP-Inhibitor LDN193189 behandelt wurden (Abbildung 16, schwarz umkreist), was sich mit den Ergebnissen aus den Experimenten mit Immunfärbung deckt. Von den DIV18-OP-Zellen zeigten die Zellen der NNE-Behandlung 6 die höchste SIX1-Expression (violett eingekreist).

3.4.4 Unterschiede durch OPZ-Behandlung

In der Behandlung der Zellen in den Tagen 9-18 gibt es zwei unterschiedliche Gruppen: diejenigen, die mit FGF2 behandelt wurden, und die Zellen, die mit FGF3 und FGF10 inkubiert wurden (Abbildung 17). In der Genexpression ähneln sich die Zellen beider Gruppen. Die Verteilung ist diffus, es entsteht keine deutliche Gruppierung. Die NNE-Proben (Grün) wurden zur besseren Vergleichbarkeit und Dekodierbarkeit der Schaubilder in der Abbildung belassen, obwohl sie keine OPZ-Behandlung erfahren haben.

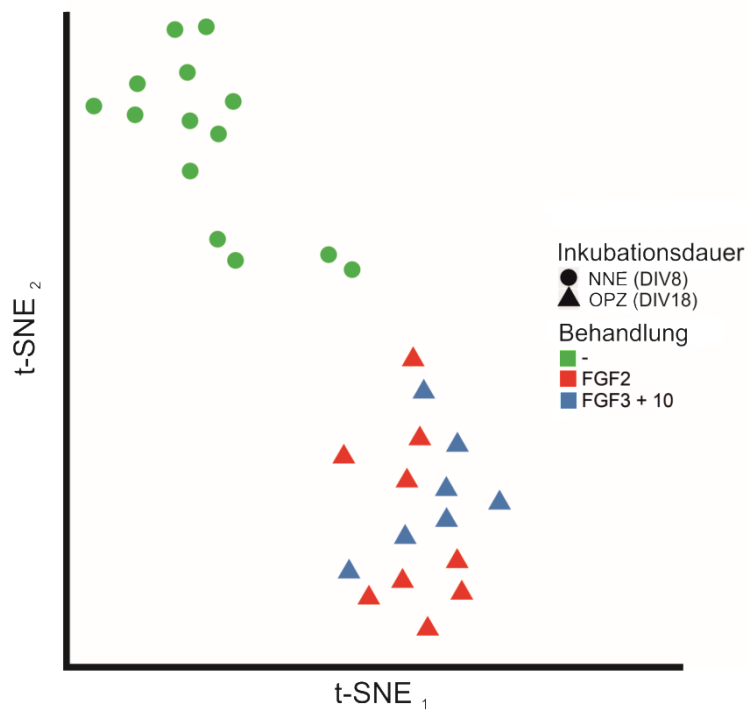


Abbildung 17: t-SNE Darstellung der Proben der Fluidigm™ Genanalyse, aufgeschlüsselt nach OPZ-Behandlung.

Mit FGF2 behandelte Zellen (rot) unterscheiden sich nicht deutlich von den mit FGF3+10 behandelten Zellen (blau). Es bilden sich keine Cluster, die Proben stehen diffus verteilt. Die grün gefärbten Proben waren nur 8 Tage in Behandlung und erhielten deshalb keine FGF-Behandlung, sind der Übersichtlichkeit halber aber mit aufgetragen. NNE: nicht-neuronales Ektoderm, OPZ: otische Progenitorzellen, t-SNE: t-distributed stochastic neighbor embedding.

4. Diskussion

Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSZ) (Takahashi et al., 2007, Yu et al., 2007) sind ein praktisch unlimitierter Pool an humanen Stammzellen, die sich zu Vorläuferzellen und differenzierten Zellen nahezu aller Organsysteme entwickeln lassen. Die Erforschung von Krankheiten und die Entwicklung von Behandlungskonzepten sowie Medikamenten an einem robusten zellulären Model rücken in greifbare Nähe. Die Bandbreite der Methoden und Möglichkeiten zum Einsatz der hiPSZ in der Erforschung des Innenohrs wächst stetig (Hartman et al., 2015, Kwon et al., 2010).

Nichtsdestotrotz bleiben der Umgang mit hiPSZ und die Entwicklung dieser zu Modellen der Sinnessysteme ein sehr komplexes und schwer greifbares Feld, die Ausbeute der Haarzellen ist bis dato im Prozent- bzw. Promillebereich und damit sehr niedrig (Ohnishi et al., 2015, Ealy et al., 2016). Die limitierenden Faktoren für die Herstellung ausgereifter Sinnesepithelien *in vitro* sind noch nicht vollständig identifiziert und verstanden. Haarzellähnliche Zellen und sensorische Zellen mit Stereozilien wurden bisher vor allem in komplexen 3D-Organoiden und aus primären embryonalen Stammzellen erzeugt (Koehler et al., 2013).

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Zusammenhänge der verschiedenen Signalwege in der Entwicklung otischer Vorläuferzellen aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSZ) in 2-dimensionaler Monolayerzellkultur. Dabei wurde die Herangehensweise gewählt, die Embryonalentwicklung von Wirbeltieren durch Beeinflussung bestimmter Signalwege *in vitro* zu imitieren. So können die Stammzellen in die gewünschte Richtung differenziert werden (Ealy et al., 2016).

Die Erzeugung von Zellen der anterioren Plakoden aus humanen embryonalen Stammzellen (hESC) wurde bereits erfolgreich durchgeführt (Chen et al., 2012, Leung et al., 2013), wohingegen die Erzeugung der posterioren Plakoden, und somit der otischen Plakode, schwieriger zu bewerkstelligen ist (Ealy et al., 2016). Die meisten Experimente wurden auch hier mit hESC und der

Manipulation der Signalwege TGF- β , WNT und FGF durchgeführt, die Effektivität und Ausbeute an Haarsinneszellen ist gering (Ronaghi et al., 2014, Ohnishi et al., 2015, Oshima et al., 2010). Das Hauptproblem bleibt die fluktuierende Genexpression in den differenzierten Zellen, sowie die komplexe Interaktionen der zugehörigen Signalkaskaden.

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 Besonderheiten der Fluidigm™ Analyse

Für die Fluidigm™-Analyse verwendeten wir gepoolte RNA von Zellen aus je einem Well. Wie in Kapitel 4.3.1 dargelegt entwickeln sich die Zellen aber zum Teil asynchron. Die durch die Analyse beschriebene Genexpression beschreibt also nicht die Expressionslevel einer bestimmten Zelle, sondern den Durchschnitt einer Population. Das bringt den Vorteil, dass die Varianz der Expressionslevel unter den Zellen herausgemittelt wird, sodass das Bild durch einzelne Ausreißer weniger verzerrt wird. Allerdings wird so auch eine fiktive Durchschnittszelle erzeugt, deren Genotyp nicht zwingend einen natürlich vorkommenden Zelltyp widerspiegelt.

Die Darstellung mittels t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE), einer nichtlinearen Dimensionsreduktionsmethode, bietet speziell für die Fluidigm™-Analyse und die Untersuchung der Genexpressionslevel, in Abhängigkeit von unterschiedlichen Behandlungen, viele Vorteile. So lässt sich die Menge an Daten, die aus 30 RNA-Proben und jeweils 192 untersuchten Genexpressionslevel entsteht, logisch ordnen und die relevanten Aussagen herausarbeiten. Hier mit exakten Zahlenwerten zu arbeiten kann die Analyse unübersichtlich machen.

Im direkten Vergleich der Ergebnisbewertung von Immunzytochemie und RT-qPCR (Fluidigm™) muss folgender Aspekt beachtet werden. Die Immunzytochemie stellt das Proteom dar, also die tatsächlich produzierten Proteine, während die PCR das Transkriptom, also nur den Auftragsschein zur Produktion der Proteine, abbildet. Während der Transkription der DNA zur

mRNA und deren Translation zum Protein gibt es in der Zelle vielfältige Möglichkeiten, die Produktionsinformation zu vervielfältigen, zu verändern oder zu reduzieren. Dies beeinträchtigt meist aber nur die Vergleichbarkeit der verschiedenen Gene innerhalb einer Zelle, weniger die eines Gens zwischen verschiedenen Zellen. Es können also durchaus Ergebnisse der einen Methode mit der anderen Methode verglichen und gegebenenfalls bestätigt werden, allerdings muss beachtet werden, dass eine methodenspezifische Varianz vorkommen kann. Das Proteom der otischen Vorläuferzellen ist bisher im Vergleich zum Transkriptom weniger erforscht (Hartman et al., 2015, Waldhaus et al., 2015).

4.1.2 Notwendigkeit eines Mikromillieus für die Entwicklung der Zellen

Viele Vorgänge der Embryonalentwicklung basieren auf Signalen, die die jeweiligen Zellen und Gewebe parakrin von ihren Nachbarn erhalten. Dieses Mikromillieu steuert die Organogenese wesentlich. So zeigten beispielsweise Kil und Kollegen, dass transplantiertes paraxiales Mesoderm im Huhn eine ektope Ohrplakode erzeugen kann (Kil et al., 2005). Im Labor lässt sich dieses Umfeld in 2D-Monolayerkultur nur schwer imitieren: Zwar können Signalwege, die für die jeweilige Entwicklungsphase bedeutend sind, wie in dieser Arbeit geschehen, manipuliert werden. Allerdings ist es schwierig, die natürliche Umwelt mit allen Wachstumsfaktoren und Signalen adäquat nachzubilden. Besser funktioniert das in sogenannten Organoiden, einer Art 3D-Zellkultur (Koehler et al., 2013, Liu et al., 2016). Dieser Ansatz eignet sich allerdings nicht für die von uns angestrebten Hochdurchsatzuntersuchungen, da keine verlässliche immunzytochemische Quantifizierung möglich ist.

4.2 Erzeugung von nicht-neuronalem Ektoderm

4.2.1 Expressionsmuster der untersuchten Gene in den differenzierten Zellen

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zeigten die behandelten Zellen nach 8 Tagen Differenzierung eine stabile Expression der für NNE beschriebenen Markergene GATA3 (91,7% der Zellen, n=3) und TFAP2A (93,7 % der Zellen, n=3), diese war abhängig von der Inhibition des TGF- β -Signalwegs durch SB431542.

Ealy und Kollegen konnten aus hESZ in 6 Tagen mit TGF- β -Inhibition und WNT-Inhibition eine stabile Expression der NNE spezifischen Transkriptionsfaktoren erreichen (GATA3:82.8%, n=5; TFAP2A: 69,7, n=7; SIX1: 49,4%, n=3 (Ealy et al., 2016)). Die PPE-Markergene SIX1 sowie EYA1 waren dort nur in einzelnen Subpopulationen exprimiert, was bedeutet, dass ein Teil der Zellen sich asynchron entwickelt. Auch nach längerer Behandlung der Zellen von bis zu 10 Tagen wurden die NNE Markergene nicht stärker exprimiert, während mesodermale und endodermale Marker zunahmen. Aus hiPSZ abgeleitete otische Zellen wiesen eine asynchronere und weniger ausgeprägte Expression dieser Marker vor als solche, die aus hESZ abgeleitet wurden (Ealy et al., 2016). Selbst innerhalb der hiPSZ verhalten sich unterschiedliche Zelllinien oft deutlich abweichend, was für jede Zelllinie gesonderte Bedingungen notwendig macht (Ortmann and Vallier, 2017). So zeigten sich auch in unseren Experimenten unterschiedliche Proliferationsraten und Expressionslevel von Genen in den unterschiedlichen Zellreihen, die identisch behandelt wurden (siehe Kapitel 3.2).

Die zusätzliche WNT-Inhibition mit FH535 brachte in unseren Experimenten keine weiteren Vorteile. Auch die Manipulation der BMP- und IGF-Signalwege änderte die untersuchten Expressionsmuster nicht signifikant. Es lässt sich also schließen, dass für die Zellen in der Entwicklung zum NNE die TGF- β -Inhibition hinreichend und notwendig ist. Die anderen als wichtig für die otische Entwicklung beschriebenen Signalwege (Hartman et al., 2015) lassen eine

breitere Variabilität zu. Die Genexpressionsmuster der Zellen der entsprechenden Behandlungen verhielt sich vergleichbar zur denen der Standardbehandlung. Diese Ergebnisse ließen sich bei der Übertragung der Experimente von 24-Well Platten auf 96-Well Platten erneut beobachten. Die Arbeit mit 96-Well Platten reduziert benötigte Zeit und Material, und ist dadurch geeigneter zum weiteren Verbessern der Methode. Außerdem ermöglicht dieser Ansatz, große Substanzbibliotheken von ototoxischen und potentiell otoprotektiven Medikamenten zu testen. Auch die Reduktion auf die ausschließliche TGF- β -Inhibition zur Erzeugung von NNE erhöht die Reproduzierbarkeit und spart gleichzeitig Zeit und Ressourcen.

4.2.2 SIX1 als Marker in der Entwicklung otischer Vorläuferzellen

Eine besondere Rolle bei unseren Untersuchungen spielte der Transkriptionsfaktor SIX1. Durch die Behandlung der Zellen mit dem BMP-Inhibitor LDN193189 über die gesamte Dauer der ersten 8 Tage, zusätzlich zur TGF- β -Inhibition, wurde SIX1 in bis zu 36% der Zellen exprimiert. Dieser Wert war deutlich höher als in allen anderen Ansätzen. Gleichzeitig waren die NNE-Marker GATA3 und TFAP2A deutlich herunterreguliert (GATA3: 25%, TFAP2A: 22%; n=6). Bei der genaueren Betrachtung fiel auf, dass Zellen, die SIX1 nukleär exprimierten, axonartige Fortsätze bildeten. Diese Zellen koexprimierten auch den neuronalen Marker β -3-Tubulin. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass (1) eine starke BMP-Inhibition am Beginn der Haarzellentwicklung aus hiPSZ die Zellen in eine neuronale Richtung führt, und (2) diese neuronale Entwicklungsbahn durch den Marker SIX1 charakterisiert ist.

Somit kann die Expression von SIX1 in Zellen des vermuteten NNE zwar Ausdruck einer sich asynchron in der Entwicklung zum PPE schon weiter befindlichen Subpopulation sein (Ealy et al., 2016). Es sollte allerdings aber auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass diese Subpopulation im NNE eine fehlgeleitete Population von Zellen darstellt, die in neuronale Richtung differenziert.

SIX1 scheint seine Rolle bei der Entwicklung der Sinnesepithelien erst später zu finden. Ahmed und Kollegen wiesen nach, dass SIX1 in Interaktion mit EYA1 und SOX2 wesentlich an der Aktivierung des Gens ATOH1, und somit der Haarzellendifferenzierung beteiligt ist (Ahmed et al., 2012).

Außerdem zeigte sich in unseren Fluidigm™-Analysen, dass genau in diesen mit LDN193189 behandelten Zellen die Expression von BMP4 stark hochreguliert ist. Das legt den Schluss nahe, dass die Zellen aufgrund des fehlenden BMP-Signals von extern im Sinne einer autoregulatorischen Rückkopplung BMP4 selbst verstärkt produzieren.

4.3 Erzeugung von späteren otischen Vorläuferzellen

Nachdem die Zellen eine stabile Expression der NNE-Marker aufwiesen, wurden die verschiedenen Ansätze je mit FGF2 oder FGF3 und FGF10 sowie mit weiteren, in Abbildung 4 dargestellten Substanzen behandelt.

Die Zellen der Kontrollansätze, die nur in 5% KOSR-Medium inkubiert wurden, gingen in allen Experimenten zwischen Tag 10 und 12 zugrunde. Es scheinen also grundsätzlich Wachstumsfaktoren notwendig zu sein, allein um diese Zellen in vitalem Zustand zu halten. Auch die Ansätze, die in den ersten 8 Tagen mit LDN193189 und SB431542 behandelt wurden, konnten nicht bis Tag 18 in Kultur gehalten werden. Vermutlich waren diese SIX1 exprimierenden Zellen auf eine Bahn geraten, für die die anschließenden Signalwegmanipulationen keine physiologische Umgebung darstellte, und daher nicht überlebensfähig. Schließlich konnten auch die mit RepSox anstelle von SB431542 behandelten Zellen die 18 Tage in Kultur nicht überleben. Da RepSox je nach Zelltyp 5-20-mal effektiver wirkt als SB431542, könnte die TGF- β -Inhibition deutlich zu stark ausgefallen sein und die Zelle so verändert haben, dass eine weitere Entwicklung nicht möglich war.

4.3.1 Betrachtung der benötigten Zeitspanne zur Differenzierung der otischen Vorläuferzellen

Bisher herrscht noch viel Unsicherheit über die benötigte Zeitspanne für die Differenzierung der otischen Vorläuferzellen. Bei Ealy und Kollegen war die Ähnlichkeit der differenzierten hiPS-Zellen denen von nativen otischen Mauszellen an Tag 12 der Differenzierung am ähnlichsten (Ealy et al., 2016). Zu späteren Zeitpunkten waren viele der otischen Gene schon wieder niedriger exprimiert. Andererseits würde die Expression der Gene PAX2, JAG1, BMP7 und ISL1 noch mehr Zeit brauchen (Ealy et al., 2016), verlängerte Behandlung über 18 Tage hinaus brachte jedoch im Experiment keine Vorteile. Die Zellen neigen vielmehr dazu, sich in Richtung anteriorer Plakode zu entwickeln, charakterisiert durch die Expression von PAX6, das auch in unseren Experimenten nach 18 und 20 Tagen *in vitro* exprimiert wurde. Da die Zellen aber auch die Gene EYA1 und 2 sowie SIX1 exprimieren, könnte es sich bei den Zellen an Tag 18 und 20 auch um eine nicht natürlich vorkommende Zwischenform handeln. Eine weitere mögliche Erklärung für die gleichzeitige Detektion der Gene könnte das Vorhandensein verschiedener Subpopulationen sein, die sich in Einzelzellanalyse nachweisen lässt (Ealy et al., 2016).

4.3.2 Expressionsmuster und Charakteristika der differenzierten otischen Vorläuferzellen

Zwischen Tag 13 und 16 bildeten die Zellen ein für Epithelien typisches polygonales Muster aus. Dies kann als Hinweis darauf gesehen werden, dass sich die Einzelzellen des NNE langsam zu einer Einheit, dem Sinnesepithel, entwickeln. Unterstützt wird diese Annahme durch den Nachweis von transmuralem E-Cadherin in der immunzytochemischen Untersuchung. Dieses Protein stellt in Epithelien das strukturelle Korrelat für Zell-Zell Kontakte und somit der Zellpolarität- und Morphogenese dar.

Leichte Unterschiede in den Expressionsmustern der Zellen traten nach 20 Tagen Inkubation in Abhängigkeit der vorangegangenen NNE-Behandlung auf,

weniger aufgrund der benutzten FGFs. Die Behandlung mit FGF2 ist also als gleichwertig zu der Behandlung mit FGF3 und FGF10 anzusehen. Die unterschiedlichen FGFs zeichnen sich durch eine konservierte, sehr ähnliche Aminosäuresequenz aus, und scheinen hier unspezifisch wirken zu können. Die untersuchten Gene zeigen untereinander eine weitreichende Interaktion, so kann beispielsweise eine Überexpression von SIX1 und EYA2 das Gen SIX4 hochregulieren (Christophorou et al., 2009). Diese Interaktionen könnten dafür sorgen, dass etwaige fehlende Signale kompensiert werden und so durch Rückkopplungsmechanismen der Zelle selbst (autokrin) oder im Zellverbund (parakrin) zur Stabilisierung der Genexpression beigetragen wird.

Die Behandlung durch BMP-Modulation (Behandlung 7) erzeugte bei den differenzierten Zellen bei vielen der untersuchten, für die Entwicklung der Haarsinneszellen wichtigen Gene niedrigere Expressionslevel (Abbildung 12). Am stärksten war dieser Effekt bei den Genen SOX2 und PAX8 zu sehen. Die Behandlung basierte auf einem von Kwon und Kollegen entwickelten Modell, mit dem für die otische Entwicklung wichtige Gene durch frühe Aktivierung und anschließende Hemmung von BMP im Zebrafisch hochexprimiert werden konnten (Kwon et al., 2010). Auf die hier untersuchten hiPSZ ließ sich dieser Ansatz so nicht übertragen.

4.3.3 Einflüsse einer WNT-Aktivierung und Inhibition auf die Genexpression der otischen Vorläuferzellen

In Kapitel 3.2.1 wurde gezeigt, dass die Inhibition des WNT-Signalwegs zur stabilen Expression der NNE-Marker nicht notwendig sein könnte. Darüber hinaus lässt sich mit Blick auf die Daten in Abbildung 12 feststellen, dass die Ansätze, bei denen zur Entwicklung des NNE auf WNT-Inhibition verzichtet wurde, auch nach 20 Tagen Differenzierung mit FGF2 bzw. FGF3 und 10 eine vergleichbare Expression der späteren otischen Marker stattfindet. Die Differenzierungsmethode kann also um einen Faktor, die WNT-Inhibition, reduziert werden, was sie deutlich vereinfacht.

Die zusätzliche Aktivierung des WNT-Signalwegs mit der Substanz CHIR99021 hingegen bewirkte in allen Ansätzen eine höhere Proliferationsrate (Abbildung 3.13) und gleichzeitig eine niedrigere Expression der Gene PAX8 und SOX2 sowie E-Cadherin und SIX1. Aktivierung des WNT-Signalwegs könnte also dazu führen, dass die Zellen proliferieren, und, anstatt weiter in Richtung otischer Plakode zu differenzieren, auf einer früheren Entwicklungsphase stehen bleiben. Auch bei Ealy und Kollegen hat die Behandlung der Zellen mit CHIR99021 nicht zur Expression von PAX2 und PAX8 geführt (Ealy et al., 2016). Stattdessen wurde verstärkt PAX6, ein Marker der anterioren Plakode, exprimiert, was bei unseren Versuchen nicht der Fall war.

4.3.4 Einflüsse einer kurzzeitigen BMP-Inhibition auf die Genexpression der otischen Vorläuferzellen

Die Zellen der Behandlung 6, die in den letzten beiden Tagen der NNE-Behandlung mit LDN193189 inkubiert wurden, zeigten sowohl in der Analyse des Proteoms mittels Immunfluoreszenz als auch der Analyse des Transkriptoms mit Fluidigm™ die höchste Expression von SOX2, sowie einiger der PAX-Gene und anderer, für die otische Entwicklung wichtiger Gene (Abbildungen 12 und 16). Im direkten Vergleich mit den restlichen DIV18-OPZ fällt in der Fluidigm™-Analyse außerdem die signifikant erhöhte Expression der PPE/OPZ-Markergene SIX1, EYA2 und EYA4 auf. Hingegen sind die eher früher in der Entwicklung zu findenden Gene DLX3, DLX6 und GATA2 signifikant herunterreguliert (Tabelle 17 und 18). Dies deutet darauf hin, dass diese Zellen der Behandlung 6 nach 18 Tagen in Kultur den vielversprechendsten Genotyp unter unseren Experimenten aufweisen. Möglicherweise stellt die Inkubation der Zellen mit LDN193189 in den letzten beiden Tagen der NNE-Behandlung eine Art Bremse dar, die den Zellen hilft, in der richtigen Bahn auf dem Weg zur posterioren Plakode zu bleiben. In der t-SNE Analyse nach 18 Tagen Differenzierung stehen diese Proben (Abbildung 15 und 16, violett eingekreist) etwas separat von den anderen otischen Progenitorzellen. Sie orientieren sich eher in Richtung der in den Abbildungen schwarz eingekreisten Zellen, die die höchsten Expressionslevel der PAX-

Gene, sowie von SIX1 und SOX2 zeigen. Dies ist ein Hinweis auf die Überlegenheit dieser Behandlung. Sie sollte in weiteren Experimenten wiederholt und verfeinert werden.

4.4 Ausblick

Die sehr junge Methode der hiPSZ ergänzt den Werkzeugkasten der Stammzellforschung maßgeblich. Übergeordnete Ziele, wie die Reduktion der Zahl der benötigten Versuchstiere sowie die Herstellung künstlicher Gewebe *in vitro* helfen die ethischen Konflikte in der Versuchstierforschung zu vermindern. Außerdem bekommt die Entwicklung neuer Therapien in allen Fachgebieten der Medizin dadurch einen weiteren Schub.

Nichtsdestotrotz stellen der Umgang mit diesen Zellen und die Entwicklung verschiedener Gewebe eine Herausforderung dar. Die Zellen verhalten sich nicht exakt wie ihre natürlich vorkommenden Pendanten (Ealy et al., 2016), die erzielten Ergebnisse lassen sich zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht mit denen von hESZ gleichsetzen.

Speziell für die Entwicklung otischer Gewebe lässt sich festhalten, dass die Differenzierung zu frühen Entwicklungsstufen, wie dem NNE, zufriedenstellend funktioniert, während sich die Entwicklung der Zellen zur Stufe der Ohrplakode oder Haarsinneszellen weiterhin schwierig gestaltet. Jedoch muss die Charakterisierung von Markergenen und Zellen in allen Entwicklungsstufen weiter Gegenstand zukünftiger Forschung sein, um die Ausbeute zu erhöhen und die Differenzierungsprotokolle robuster zu machen. Ergebnisse der Forschung mit hiPSZ in anderen Fachrichtungen, z.B. mit Kardiomyozyten (Miyagawa and Sawa, 2018) beim Einsatz nach Herzinfarkten, zeigen, dass die Technik durchaus das Potential hat, neue Therapien zu entwickeln und die Biomedizin signifikant nach vorn zu bringen. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass die Entwicklung neurosensorischer Strukturen ungleich komplexer ist als die anderer neuronaler oder somatischer Gewebe. Nichtsdestotrotz machen die Ergebnisse der letzten Jahre Mut, und lassen auch auf dem Gebiet der Sinnessysteme bald weitere Durchbrüche erwarten.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sollte in weiteren Experimenten vor allem der Einfluss der kurzzeitigen BMP-Inhibition während der NNE-Behandlung und deren Auswirkung auf die weitere Entwicklung der otischen Progenitorzellen untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Der Verlust des Hörvermögens stellt für Betroffene eine starke Einschränkung ihrer Lebensqualität dar, der Patientenkreis ist groß und wächst auch aufgrund der demographischen Entwicklung stetig. Bisher stehen keine kausalen Therapien für den Hörverlust zur Verfügung, dessen Ursachen meist in der strukturellen Schädigung im Innenohr liegen. Um neue Therapien zu entwickeln und ototoxische Stoffe zu identifizieren sowie protektive Faktoren zu finden, müssen neue Modelle des Innenohrs entwickelt werden. Die zurzeit verfügbaren Modelle sind zu aufwändig, bedeuten einen hohen Verbrauch an Versuchstieren und sind oft nicht-menschlichen Ursprungs. Diese Mankos könnten durch die Entwicklung eines *in vitro* Modells aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSZ) überwunden werden, die einen praktisch unlimitierten Pool an menschlichen Stammzellen zur Entwicklung von Sinneszellen darstellen. Die bis dato verfügbaren Modelle dieser Genese sind aber noch nicht robust genug und die Ausbeute an Sinneszellen ist zu gering. Diese Arbeit soll die Charakterisierung der Vorgänge in der Entwicklung von mechanosensitiven Haarsinneszellen aus hiPSZ vorantreiben sowie geeignete Methoden zu deren Erzeugung erforschen und verbessern.

Dazu wurden hiPSZ durch Manipulation bestimmter Signalwege in 2D-Monolayerkultur zu Zellen des nicht-neuronalen Ektoderm (NNE) und weiterer otischer Vorläuferzellen differenziert. Die erzeugten Zellen wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht und die Genexpression durch RT-qPCR bestimmt.

Die Methode zur Erzeugung von NNE ließ sich verlässlich von 24-Well Ansätzen auf 96-Well Ansätze übertragen, was einen erhöhten Durchsatz für potentiell zu testende Substanzen ermöglicht. Durch Differenzierung der hiPSZ zu NNE allein mittels TGF- β -Inhibition mit der Substanz SB431542 konnte die Methode vereinfacht werden. Des Weiteren erwies sich die Behandlung mit FGF2 zu derer durch FGF3 und FGF10 als gleichwertig. Die Expression weiterer Markergene blieb dadurch weitestgehend unberührt. Die

vorausgegangene NNE-Behandlung der Zellen hatte unter anderem Auswirkungen auf die Expression der Gene der PAX, SIX und SOX-Familie, die für die Entwicklung otischer Gewebe von großer Bedeutung sind.

Die Arbeit stellt ein weiteres Puzzleteil zum besseren Verständnis der Vorgänge in der Entwicklung früher otischer Vorläuferzellen aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen dar. Einige Ergebnisse aus Versuchen anderer Arbeitsgruppen mit embryonalen Stammzellen, Zellen der Maus oder der 3-D Kultur mit Microspheres konnten nicht ebenbürtig mit hiPSZ bestätigt werden. Nichtsdestotrotz bleibt die 2D-Monolayerkultur aus hiPSZ ein wichtiger Ansatz, denn nur dieses Vorgehen erlaubt eine anwendungsnahe Hochdurchsatzuntersuchung an Zellen menschlichen Ursprungs. Weitere Forschung in diesem Feld sollte den Fokus auf die Verbesserung des Mikromilieus vor allem in der Entwicklungsphase nach dem nicht-neuronalen Ektoderm legen.

6. Literaturverzeichnis

- AHMED, M., WONG, E. Y., SUN, J., XU, J., WANG, F. & XU, P. X. 2012. Eya1-Six1 interaction is sufficient to induce hair cell fate in the cochlea by activating Atoh1 expression in cooperation with Sox2. *Dev Cell*, 22, 377-90.
- AVIOR, Y., SAGI, I. & BENVENISTY, N. 2016. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17, 170-82.
- BOUCHARD, M., DE CAPRONA, D., BUSSLINGER, M., XU, P. & FRITZSCH, B. 2010. Pax2 and Pax8 cooperate in mouse inner ear morphogenesis and innervation. *BMC Dev Biol*, 10, 89.
- CHEN, W., JONGKAMONWIWAT, N., ABBAS, L., ESHTAN, S. J., JOHNSON, S. L., KUHN, S., MILO, M., THURLOW, J. K., ANDREWS, P. W., MARCOTTI, W., MOORE, H. D. & RIVOLTA, M. N. 2012. Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. *Nature*, 490, 278-82.
- CHRISTOPHOROU, N. A., BAILEY, A. P., HANSON, S. & STREIT, A. 2009. Activation of Six1 target genes is required for sensory placode formation. *Dev Biol*, 336, 327-36.
- COSTA, A. & HENRIQUE, D. 2015. Transcriptome profiling of induced hair cells (iHCs) generated by combined expression of Gfi1, Pou4f3 and Atoh1 during embryonic stem cell differentiation. *Genom Data*, 6, 77-80.
- COTANCHE, D. A. 1987. Regeneration of hair cell stereociliary bundles in the chick cochlea following severe acoustic trauma. *Hear Res*, 30, 181-95.
- DABDOUB, A., PULIGILLA, C., JONES, J. M., FRITZSCH, B., CHEAH, K. S., PEVNY, L. H. & KELLEY, M. W. 2008. Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 18396-401.
- DINCER, Z., PIAO, J., NIU, L., GANAT, Y., KRIKS, S., ZIMMER, B., SHI, S. H., TABAR, V. & STUDER, L. 2013. Specification of functional cranial placode derivatives from human pluripotent stem cells. *Cell Rep*, 5, 1387-402.
- EALY, M., ELLWANGER, D. C., KOSARIC, N., STAPPER, A. P. & HELLER, S. 2016. Single-cell analysis delineates a trajectory toward the human early otic lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 8508-13.
- ESTERBERG, R., COFFIN, A. B., OU, H., SIMON, J. A., RAIBLE, D. W. & RUBEL, E. W. 2013. Fish in a Dish: Drug Discovery for Hearing Habilitation. *Drug Discov Today Dis Models*, 10.
- FORGE, A., LI, L., CORWIN, J. T. & NEVILL, G. 1993. Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science*, 259, 1616-9.
- FRETER, S., MUTA, Y., MAK, S. S., RINKWITZ, S. & LADHER, R. K. 2008. Progressive restriction of otic fate: the role of FGF and Wnt in resolving inner ear potential. *Development*, 135, 3415-24.
- GREAVES, P., WILLIAMS, A. & EVE, M. 2004. First dose of potential new medicines to humans: how animals help. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 226-36.
- GU, R., BROWN, R. M., 2ND, HSU, C. W., CAI, T., CROWDER, A. L., PIAZZA, V. G., VADAKKAN, T. J., DICKINSON, M. E. & GROVES, A. K. 2016. Lineage tracing of Sox2-expressing progenitor cells in the mouse inner ear reveals a broad contribution to non-sensory tissues and insights into the origin of the organ of Corti. *Dev Biol*, 414, 72-84.
- HANS, S. & WESTERFIELD, M. 2007. Changes in retinoic acid signaling alter otic patterning. *Development*, 134, 2449-58.
- HARTMAN, B. H., DURRUTHY-DURRUTHY, R., LASKE, R. D., LOSORELLI, S. & HELLER, S. 2015. Identification and characterization of mouse otic sensory lineage genes. *Front Cell Neurosci*, 9, 79.
- HUTH, M. E., RICCI, A. J. & CHENG, A. G. 2011. Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. *Int J Otolaryngol*, 2011, 937861.

- KIL, S. H., STREIT, A., BROWN, S. T., AGRAWAL, N., COLLAZO, A., ZILE, M. H. & GROVES, A. K. 2005. Distinct roles for hindbrain and paraxial mesoderm in the induction and patterning of the inner ear revealed by a study of vitamin-A-deficient quail. *Dev Biol*, 285, 252-71.
- KOEHLER, K. R., MIKOSZ, A. M., MOLOSH, A. I., PATEL, D. & HASHINO, E. 2013. Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature*, 500, 217-21.
- KWON, H. J., BHAT, N., SWEET, E. M., CORNELL, R. A. & RILEY, B. B. 2010. Identification of early requirements for preplacodal ectoderm and sensory organ development. *PLoS Genet*, 6, e1001133.
- LADHER, R. K., O'NEILL, P. & BEGBIE, J. 2010. From shared lineage to distinct functions: the development of the inner ear and epibranchial placodes. *Development*, 137, 1777-85.
- LAURELL, G. & BAGGER-SJOBACK, D. 1991. Dose-dependent inner ear changes after i.v. administration of cisplatin. *J Otolaryngol*, 20, 158-67.
- LEUNG, A. W., KENT MOREST, D. & LI, J. Y. 2013. Differential BMP signaling controls formation and differentiation of multipotent preplacodal ectoderm progenitors from human embryonic stem cells. *Dev Biol*, 379, 208-20.
- LI, H., ROBLIN, G., LIU, H. & HELLER, S. 2003. Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13495-500.
- LITSIOU, A., HANSON, S. & STREIT, A. 2005. A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. *Development*, 132, 4051-62.
- LIU, X. P., KOEHLER, K. R., MIKOSZ, A. M., HASHINO, E. & HOLT, J. R. 2016. Functional development of mechanosensitive hair cells in stem cell-derived organoids parallels native vestibular hair cells. *Nat Commun*, 7, 11508.
- LLERAS-FORERO, L. & STREIT, A. 2012. Development of the sensory nervous system in the vertebrate head: the importance of being on time. *Curr Opin Genet Dev*, 22, 315-22.
- LOCHER, H., FRIJNS, J. H., VAN IPEREN, L., DE GROOT, J. C., HUISMAN, M. A. & CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M. 2013. Neurosensory development and cell fate determination in the human cochlea. *Neural Dev*, 8, 20.
- MIYAGAWA, S. & SAWA, Y. 2018. Building a new strategy for treating heart failure using Induced Pluripotent Stem Cells. *J Cardiol*, 72, 445-448.
- MOODY, S. A. & LAMANTIA, A. S. 2015. Transcriptional regulation of cranial sensory placode development. *Curr Top Dev Biol*, 111, 301-50.
- MOORE, K. 2011. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 9th Edition, 389 ff, 441-442.
- NADOL, J. B., JR. 1993. Hearing loss. *N Engl J Med*, 329, 1092-102.
- NICOLSON, T. 2005. The genetics of hearing and balance in zebrafish. *Annu Rev Genet*, 39, 9-22.
- OHNISHI, H., SKERLEVA, D., KITAJIRI, S., SAKAMOTO, T., YAMAMOTO, N., ITO, J. & NAKAGAWA, T. 2015. Limited hair cell induction from human induced pluripotent stem cells using a simple stepwise method. *Neurosci Lett*, 599, 49-54.
- OHYAMA, T., GROVES, A. K. & MARTIN, K. 2007. The first steps towards hearing: mechanisms of otic placode induction. *Int J Dev Biol*, 51, 463-72.
- OHYAMA, T., MOHAMED, O. A., TAKETO, M. M., DUFORT, D. & GROVES, A. K. 2006. Wnt signals mediate a fate decision between otic placode and epidermis. *Development*, 133, 865-75.
- ORTMANN, D. & VALLIER, L. 2017. Variability of human pluripotent stem cell lines. *Curr Opin Genet Dev*, 46, 179-185.

- OSHIMA, K., SHIN, K., DIENSTHUBER, M., PENG, A. W., RICCI, A. J. & HELLER, S. 2010. Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell*, 141, 704-16.
- PECHRIGGL, E. J., BITSCHKE, M., GLUECKERT, R., RASK-ANDERSEN, H., BLUMER, M. J., SCHROTT-FISCHER, A. & FRITSCH, H. 2015. Development of the innervation of the human inner ear. *Dev Neurobiol*, 75, 683-702.
- PERA, E. M., WESSELY, O., LI, S. Y. & DE ROBERTIS, E. M. 2001. Neural and head induction by insulin-like growth factor signals. *Dev Cell*, 1, 655-65.
- PUJOL, R. & LAVIGNE-REBILLARD, M. 1985. Early stages of innervation and sensory cell differentiation in the human fetal organ of Corti. *Acta Otolaryngol Suppl*, 423, 43-50.
- PUJOL, R. & LAVIGNE-REBILLARD, M. 1995. Sensory and neural structures in the developing human cochlea. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 32 Suppl, S177-82.
- PUJOL, R., LAVIGNE-REBILLARD, M. & UZIEL, A. 1991. Development of the human cochlea. *Acta Otolaryngol Suppl*, 482, 7-12; discussion 13.
- PURCELL, P., OLIVER, G., MARDON, G., DONNER, A. L. & MAAS, R. L. 2005. Pax6-dependence of Six3, Eya1 and Dach1 expression during lens and nasal placode induction. *Gene Expr Patterns*, 6, 110-8.
- RIVOLTA, M. N. & HOLLEY, M. C. 2002. Cell lines in inner ear research. *J Neurobiol*, 53, 306-18.
- ROBERSON, D. W. & RUBEL, E. W. 1994. Cell division in the gerbil cochlea after acoustic trauma. *Am J Otol*, 15, 28-34.
- RONAGHI, M., NASR, M., EALY, M., DURRUTHY-DURRUTHY, R., WALDHAUS, J., DIAZ, G. H., JOUBERT, L. M., OSHIMA, K. & HELLER, S. 2014. Inner ear hair cell-like cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 23, 1275-84.
- RUBBINI, D., ROBERT-MORENO, A., HOIJMAN, E. & ALSINA, B. 2015. Retinoic Acid Signaling Mediates Hair Cell Regeneration by Repressing p27kip and sox2 in Supporting Cells. *J Neurosci*, 35, 15752-66.
- SATO, S., IKEDA, K., SHIOI, G., OCHI, H., OGINO, H., YAJIMA, H. & KAWAKAMI, K. 2010. Conserved expression of mouse Six1 in the pre-placodal region (PPR) and identification of an enhancer for the rostral PPR. *Dev Biol*, 344, 158-71.
- SCHLOSSER, G. 2010. Making senses development of vertebrate cranial placodes. *Int Rev Cell Mol Biol*, 283, 129-234.
- SHIELD, B. 2006. Evaluation of the social and economic costs of hearing impairment. A report for Hear-It AISBL.
- TAKAHASHI, K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K. & YAMANAKA, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-72.
- TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.
- TROPITZSCH, A., ARNOLD, H., BASSIOUNI, M., MULLER, A., ECKHARD, A., MULLER, M. & LOWENHEIM, H. 2014. Assessing cisplatin-induced ototoxicity and otoprotection in whole organ culture of the mouse inner ear in simulated microgravity. *Toxicol Lett*, 227, 203-12.
- URNESS, L. D., PAXTON, C. N., WANG, X., SCHOENWOLF, G. C. & MANSOUR, S. L. 2010. FGF signaling regulates otic placode induction and refinement by controlling both ectodermal target genes and hindbrain Wnt8a. *Dev Biol*, 340, 595-604.
- VON GABLENZ, P., HOFFMANN, E. & HOLUBE, I. 2017. Prävalenz von Schwerhörigkeit in Nord- und Süddeutschland. *HNO*, 65, 663-670.
- VON GABLENZ, P. & HOLUBE, I. 2015. Prävalenz von Schwerhörigkeit im Nordwesten Deutschlands. *HNO*, 63, 195-214.

- WALDHAUS, J., DURRUTHY-DURRUTHY, R. & HELLER, S. 2015. Quantitative High-Resolution Cellular Map of the Organ of Corti. *Cell Rep*, 11, 1385-99.
- WALTERS, B. J., COAK, E., DEARMAN, J., BAILEY, G., YAMASHITA, T., KUO, B. & ZUO, J. 2017. In Vivo Interplay between p27Kip1, GATA3, ATOH1, and POU4F3 Converts Non-sensory Cells to Hair Cells in Adult Mice. *Cell Rep*, 19, 307-320.
- WHITFIELD, T. T. 2002. Zebrafish as a model for hearing and deafness. *J Neurobiol*, 53, 157-71.
- WHO 2017. Global Costs of Unaddressed Hearing Loss and Cost-Effectiveness of Intervention. Geneva: World Health Organization, 2017. *Geneva: World Health Organization*
- WRIGHT, A., DAVIS, A., BREDBERG, G., ULEHLOVA, L. & SPENCER, H. 1987. Hair cell distributions in the normal human cochlea. *Acta Otolaryngol Suppl*, 444, 1-48.
- WRIGHT, T. J. & MANSOUR, S. L. 2003. Fgf3 and Fgf10 are required for mouse otic placode induction. *Development*, 130, 3379-90.
- YU, J., VODYANIK, M. A., SMUGA-OTTO, K., ANTOSIEWICZ-BOURGET, J., FRANE, J. L., TIAN, S., NIE, J., JONSDOTTIR, G. A., RUOTTI, V., STEWART, R., SLUKVIN, II & THOMSON, J. A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917-20.
- ZHOU, H., WU, S., JOO, J. Y., ZHU, S., HAN, D. W., LIN, T., TRAUGER, S., BIEN, G., YAO, S., ZHU, Y., SIUZDAK, G., SCHOLER, H. R., DUAN, L. & DING, S. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 4, 381-4.
- ZOU, D., SILVIUS, D., FRITZSCH, B. & XU, P. X. 2004. Eya1 and Six1 are essential for early steps of sensory neurogenesis in mammalian cranial placodes. *Development*, 131, 5561-72.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde in der Universitäts-HNO-Klinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Hubert Löwenheim durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Hasan Avci, wissenschaftlicher Mitarbeiter der HNO-Klinik Tübingen.

Sämtliche Versuche der Zellkultur und immunzytologische Untersuchung wurden von mir eigenständig durchgeführt, nach Einarbeitung durch die Labormitarbeiterinnen- und mitarbeiter Mirjam Fröschl, Aurélie Dos Santos, Dr. Karina Gültig, Andrea Müller, sowie Dr. Hasan Avci und PD Dr. Marcus Müller.

Die Bereitstellung der hiPSZ erfolgte durch Prof. Rejko Krüger, Zentrum für Neurologie, Hertie-Institut für Hirnforschung in Tübingen. Die Karyotypisierung der Zellen erfolgte durch das Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik, Universitäts-Klinik Tübingen.

Die apparative Fluidigm™ - Analyse wurde von Dr. Megan Ealy, Heller Lab, Stanford, durchgeführt. Die Proben hierfür wurden von mir hergestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von PD Dr. Marcus Müller und Dr. Hasan Avci durch mich. Die Erstellung der t-SNE-Abbildungen der Fluidigm™ -Daten erfolgte durch Kristina Luermann (HNO-Klinik Tübingen).

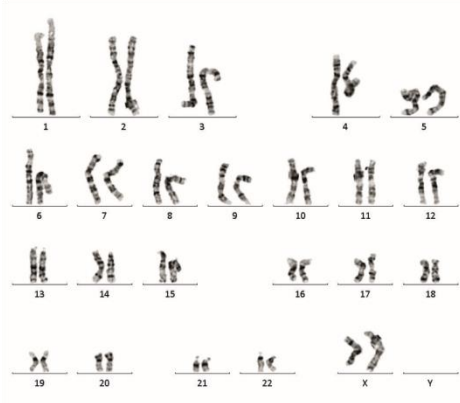
Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

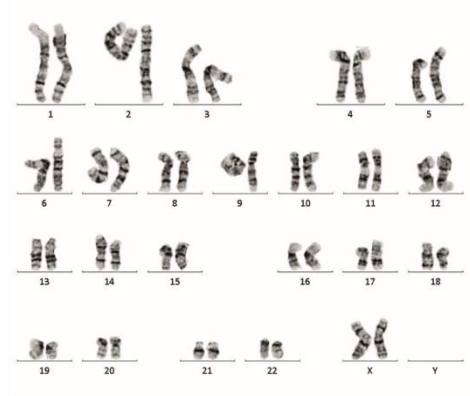
Jörg Schmid

8. Anhang

A

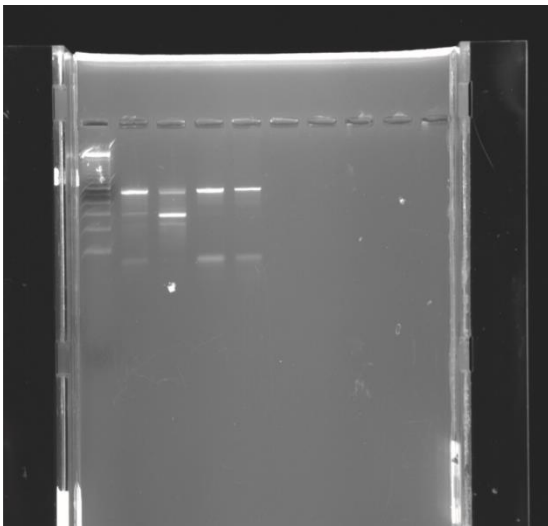


B



Anhang 1: Karyogramme Zelllinie K9.7 (A) und K7.1(B):

Es handelt sich um zwei weibliche diploide Chromosomensätze. Es sind keine strukturellen oder numerischen Aberrationen zu erkennen.



Anhang 2: Negativnachweis für Mykoplasmen:

Zum Ausschluss einer Infektion der Zellkultur mit intrazellulären Mykoplasmen wurde eine PCR auf Mykoplasmenantigen durchgeführt. Diese ist negativ ausgefallen.

Hair cell	SLC7A14	LGR5	JAK1	BMP/TGFB
ATOH1	STRC	POU3F3	KCNQ4	BMP2
JAG2	CLRN1	PROX1	LHX2	BMP4
MYO15A	TMC1	S100A1	NES	LMX1A
MYO6	TMC2	SLC1A3	NGFR	LMX1B
MYO7A	TMC4	HES1	NTF3	ACVR1B
POU4F3	USH1C	HES5	PRPH2	AVCR2A
AQP4	Cochlea	HEY1	TUBB3	NOTCH
CALB1	EYA4	HEY2	Planar cell polarity	DLL1
CALB2	AQP1	JAG1	PCP2	HES2
POU3F4	COL11A2	KCNJ10	Cell cycle	HES7
PVALB	OTOS	PLP1	CCND1	NOTCH1
C1QL1	Supporting cell	ETV5	CDKN1A	NOTCH2
CHRNA10	SOX2	CALD1	CDKN1B	NOTCH3
CHRNA9	FGFR3	CALM1	CDKN2A	NOTCH4
ESPN	GJB2	EGFR	CDKN2D	RBPJ
LBH	GJB3	Neuron	MCM2	WNT
MYO3A	GJB6	BDNF	Signaling	AXIN2
OCM	GJB1	CNTF	FGF	Reference
OTOF	GJA1	EN2	FGFR1	ACTB
SLC17A8	GJC3	GDNF	FGFR2	UBC
SLC26A5	JAG1	GFAP	FGFR4	

Pluripotent	Otic	Neural	ID2	WNT
NANOG	PAX2	FOXD3	ID3	DKK1
POU5F1	PAX8	FOXJ3	ID4	FZD1
KLF4	GBX2	MSX2	BAMBI	FZD2
MYC	HMX3	PAX7	FGF	FZD3
NNE/PPE	SOX10	ZIC1	EV4	FZD4
DLX3	SOX9	ZIC2	FGF3	FZD5
DLX5	TBX2	HOXA1	FGF8	FZD6
DLX6	FBXO2	HOXB1	FGF9	FZD7
GATA2	LFNG	CDH2	FGF10	FZD8
GATA3	BRIP1	ISL1	FGF19	FZD9
TFAP2A	DUSP6	NEUROD1	SPRY1	WNT1
TFAP2C	EMX2	NEUROG1	SPRY2	WNT2B
TLE3	OTX1	NEUROG2	Hedgehog	WNT3
MSX1	OTX2	NEUROG3	GLI1	WNT3A
EYA1	OC90	Trophectoderm	GLI2	WNT6
EYA2	Epithelial	CDX2	GLI3	WNT7A
SIX1	EPCAM	Signaling	GLI4	WNT8A
SIX4	CDH1	BMP/TGFB	PTCH1	Reference
DACH1	Anterior placode	BMP7	PTCH2	GAPDH
FOXI1	PAX3	NOG	SHH	HPRT
FOXI3	PAX6	ID1	SMO	

Anhang 3: Liste aller Gene, die bei der Fluidigm™-Analyse untersucht wurden.

Auf 2 Chips wurden die RNA von jeweils 96 Genen amplifiziert und detektiert. Die Gene wurden von dem durchführenden Labor in verschiedene Kategorien eingeteilt.

9. Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hubert Löwenheim für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe tätig zu sein und das in mich gesetzte Vertrauen, hier selbstständig forschen zu können.

Ich danke meinem Betreuer Dr. Hasan Avci für die enge Zusammenarbeit und die Unterstützung meiner Doktorarbeit sowie die Konzeption dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich PD Dr. Marcus Müller meinen Dank aussprechen, für technischen und wissenschaftlichen Rat sowie für die kritischen Anmerkungen zu meiner Dissertationsschrift.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, im Besonderen meinen Labormamas Karina und Andrea, Stefan, Kristina, Mirjam und Aurélie möchte ich zutiefst für ihre Hilfe danken.

Meine Familie hat mich vieles gelehrt, was bei dieser Arbeit von Nutzen war: einen kritischen Geist, den Tatendrang – danke, dass ihr mir so vieles ermöglicht.

Katrin, vielen Dank für alles.