

Aus dem Department für Anatomie
Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie

**Etablierung eines adhärenenten Differenzierungsprotokolls von
humanen induziert pluripotenten Stammzellen zur
olfaktorischen Plakode**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Geisel, Anna Maria
2020**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Avci-Adali

Tag der Disputation: 13.01.2020

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungsverzeichnis.....	V
III.	Tabellenverzeichnis	VII
IV.	Formelverzeichnis	VII
V.	Abkürzungsverzeichnis	VIII
1	Einleitung	1
1.1	Der Geruchssinn	1
1.1.1	Makroskopie des Geruchssinns.....	1
1.1.2	Mikroskopischer Aufbau des olfaktorischen Epithels	2
1.2	Entwicklung des olfaktorischen Systems	3
1.2.1	Embryonale Entwicklung des Menschen	3
1.2.2	Entwicklung des Riechepithels	6
1.2.2.1	Entwicklung der präplakodalen Region	7
1.2.2.2	Entwicklung der olfaktorischen Plakode	10
1.2.2.3	Entwicklung des olfaktorischen Epithels	12
1.2.3	Rolle der <i>SIX</i> -Gene in der Entwicklung des Riechepithels	14
1.3	Humane induziert pluripotente Stammzellen.....	15
1.4	Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Material	19
2.1.1	Ethikvotum.....	19
2.1.2	Zelllinien	19

2.1.3	Gebrauchsfertige Reaktionslösungen.....	19
2.1.4	Chemikalien.....	20
2.1.5	Zusätze.....	21
2.1.6	Oligonukleotide.....	22
2.1.7	Antikörper.....	24
2.1.8	Geräte.....	25
2.1.9	Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.10	Software und Internetressourcen.....	28
2.1.11	Hersteller.....	28
2.1.12	Medien.....	30
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Stammzellen.....	31
2.2.1.1	Stammzellen auftauen.....	31
2.2.1.2	Stammzellen passagieren.....	31
2.2.1.3	Stammzellen einfrieren.....	32
2.2.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	32
2.2.2.1	Fixierung der Zellen für Immunfluoreszenz-Färbung.....	32
2.2.2.2	Färbevorgang.....	32
2.2.3	RNA-Analysen.....	33
2.2.3.1	Zellpellet-Gewinnung für RNA-Extraktion.....	34
2.2.3.2	RNA-Extraktion.....	34
2.2.3.3	qRT-PCR mit StepOnePlus real-time PCR System.....	34
2.2.3.4	Fluidigm mit Biomark™.....	35
2.2.4	Differenzierungsprotokolle.....	36

2.3	Statistik	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Charakterisierung hiPSZ	41
3.2	Analyse OPP	42
3.3	Analyse verschiedener Differenzierungsprotokolle	44
3.3.1	Vergleich OPP und APP1	44
3.3.1.1	PPR-Marker: OPP vs. APP1	45
3.3.1.2	Olfaktorische Plakoden-Marker: OPP vs. APP1	48
3.3.1.3	Zusammenfassung	50
3.3.2	Vergleich OPP, APP1 und APP2	51
3.3.2.1	PPR-Marker: OPP vs. APP1 vs. APP2	52
3.3.2.2	Olfaktorische Plakoden-Marker: OPP vs. APP1 vs. APP2	55
3.3.2.3	Zusammenfassung	57
3.3.3	Vergleich OPP, APP2 und OAPP2	59
3.3.3.1	PPR-Marker: OPP vs. APP2 vs. OAPP2	60
3.3.3.2	Olfaktorische Plakoden-Marker: OPP vs. APP2 vs. OAPP2	63
3.3.3.3	Zusammenfassung	65
3.3.4	Vergleich OAPP2 und OAPP3	67
3.3.4.1	PPR-Marker: OAPP2 vs. OAPP3	68
3.3.4.2	Plakoden-Marker: OAPP2 vs. OAPP3	70
3.3.4.3	<i>MSX1</i> als Neuralleisten-Marker: OAPP2 vs. OAPP3	73
3.3.4.4	Zusammenfassung	74
3.3.4.5	Immunfluoreszenzfärbung: OAPP2 vs. OAPP3	75
3.3.4.6	Zusammenfassung OAPP2 vs. OAPP3	80

3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	81
4	Diskussion.....	82
4.1	Ausgangsprotokoll OPP	82
4.2	Protokollvariationen.....	83
4.3	Wohin führen die verwendeten Differenzierungsprotokolle?	84
4.3.1	Analyse auf RNA-Ebene	84
4.3.2	Analyse auf Protein-Ebene	85
4.3.3	Zusammenfassung	86
4.4	OAPP2 und OAPP3	86
4.5	Ausblick.....	89
4.5.1	Zeitnaher Ausblick	89
4.5.2	Ein Blick in die Zukunft	90
5	Zusammenfassung.....	92
6	Literaturverzeichnis	94
6.1	Bücher.....	94
6.2	Publikationen	94
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	102
8	Danksagung.....	103

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des olfaktorischen Epithels.	3
Abbildung 2: Entwicklung von der Morula zur Blastozyste	4
Abbildung 3: Entwicklung von der zweiblättrigen zur dreiblättrigen Keimscheibe....	5
Abbildung 4: Ektodermale Entwicklung	6
Abbildung 5: Menschliche Plakoden.....	7
Abbildung 6: Entwicklung des Ektoderms	8
Abbildung 7: Genexpression verschiedener Regionen.....	9
Abbildung 8: Beteiligung verschiedener Gewebe und Faktoren an der Entwicklung der PPR.....	10
Abbildung 9: Anteriore, olfaktorische und Linsen-Vorläuferzellen	12
Abbildung 10: Entwicklung der olfaktorischen Plakode zum olfaktorischen Epithel	14
Abbildung 11: Differenzierungsprotokolle und Zusätze	38
Abbildung 12: hiPSZ-Kolonie.....	41
Abbildung 13: Genexpression an Tag 8 der Differenzierung.....	42
Abbildung 14: Genexpression an Tag 10 der Differenzierung	43
Abbildung 15: Zusätze OPP und APP1 im Vergleich	44
Abbildung 16: <i>EYA1</i> -Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung	45
Abbildung 17: <i>EYA2</i> -Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung	46
Abbildung 18: <i>SIX1</i> -Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung	47
Abbildung 19: <i>EBF2</i> -Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung	48
Abbildung 20: <i>FOXP1</i> -Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung	49
Abbildung 21: Zusätze APP1 und APP2 im Vergleich	51

Abbildung 22: <i>EYA1</i> -Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung	52
Abbildung 23: <i>EYA2</i> -Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung	53
Abbildung 24: <i>SIX1</i> -Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung	54
Abbildung 25: <i>EBF2</i> -Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung	55
Abbildung 26: <i>FOXG1</i> -Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung	56
Abbildung 27: Zusätze OPP, APP2 und OAPP2 im Vergleich	58
Abbildung 28: <i>EYA1</i> -Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung	60
Abbildung 29: <i>EYA2</i> -Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung	61
Abbildung 30: <i>SIX1</i> -Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung	62
Abbildung 31: <i>EBF2</i> -Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung	63
Abbildung 32: <i>FOXG1</i> -Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung	64
Abbildung 33: Zusätze OAPP2 und OAPP3 im Vergleich	66
Abbildung 34: <i>EYA1</i> -Expression an Tag 11 der Differenzierung	68
Abbildung 35: <i>EYA2</i> -Expression an Tag 11 der Differenzierung	69
Abbildung 36: <i>SIX1</i> -Expression an Tag 11 der Differenzierung	70
Abbildung 37: <i>EBF2</i> -Expression an Tag 11 der Differenzierung	71
Abbildung 38: <i>FOXG1</i> -Expression an Tag 11 der Differenzierung	72
Abbildung 39: <i>MSX1</i> -Expression an Tag 11 der Differenzierung	73
Abbildung 40: <i>EYA2</i> -positive Zellen an Tag 3 der Differenzierung unter OAPP2..	75
Abbildung 41: <i>EYA2</i> -positive Zellen an Tag 9 der Differenzierung	76
Abbildung 42: <i>EYA2</i> -positive Zellen an Tag 11 der Differenzierung	76
Abbildung 43: <i>EBF2</i> -positive Zellen an Tag 3 der Differenzierung	77
Abbildung 44: <i>EBF2</i> -positive Zellen an Tag 9 der Differenzierung	77
Abbildung 45: <i>EYA1</i> - und <i>EBF2</i> -positive Zellen an Tag 11 der Differenzierung....	78
Abbildung 46: <i>SIX4</i> -positive Zellen an Tag 3 der Differenzierung	79
Abbildung 47: <i>SIX4</i> -positive Zellen an Tag 9 der Differenzierung	79
Abbildung 48: <i>SIX4</i> - und <i>SOX2</i> -positive Zellen an Tag 11 der Differenzierung	80

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien	19
Tabelle 2: Gebrauchsfertige Reaktionslösungen	19
Tabelle 3: Chemikalien	20
Tabelle 4: Zusätze	21
Tabelle 5: Oligonukleotide	22
Tabelle 6: Antikörper	24
Tabelle 7: Geräte	25
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 9: Software	28
Tabelle 10: Hersteller	28
Tabelle 11: Zusammensetzung aller verwendeten Medien	30
Tabelle 12: Grundvolumina für qRT-PCR-Mastermix	35
Tabelle 13: Zyklusschritte qRT-PCR	35
Tabelle 14: Differenzierungsprotokolle	36
Tabelle 15: Signifikanzen	40
Tabelle 16: Vergleich OPP und APP1	50
Tabelle 17: Vergleich OPP – APP1 – APP2	57
Tabelle 18: Vergleich OPP – APP2 – OAPP2	65
Tabelle 19: Vergleich OAPP2 – OAPP3	74

IV. Formelverzeichnis

Formel 1: Ermittlung Δ CT-Wert	39
Formel 2: Ermittlung STAB Δ CT-Wert	39
Formel 3: Ermittlung SEM Δ CT- Wert	39
Formel 4: Ermittlung $\Delta\Delta$ CT-Wert	40
Formel 5: Ermittlung SEM $\Delta\Delta$ CT-Wert	40

V. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AA	Antibiotic Antimycotic
AK	Antikörper
APP1/2	allgemeines Plakodenprotokoll 1/2
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CDL	Chemisch definiertes Lipidkonzentrat
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DLX3/5	Distal less Homeobox 3/5
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Adler-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbeccos Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
EBF2	früher B-Zell Faktor 2
E-CAD	E-Cadherin
EMX2	Empty Spiracles Homeobox 2
EYA1/2	Eyes absent homolog 1/2
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FOXP1	Forkhead-Box G 1
FTDA	FGF2/TGFβ/Dorsomorphin/Activin A
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM	GlutaMAX
GnRH	Gonadotropin freisetzendes Hormon
gt	goat

Abkürzungsverzeichnis

hESZ	humane embryonale Stammzellen
hiPSZ	humane induziert pluripotente Stammzellen
HKGS	Human Keratinocyte Growth Supplement
HMBS	humane Hydroxymethylbilan Synthase
HSA	Humanes Serum-Albumin
ITS	Insulin/Transferrin/Selenit
Kat. Nr.	Katalognummer
Klf4	Krüppel-like Faktor 4
KO-DMEM	Knockout-Dulbeccos Modifiziertes Adler Serum
KOSR	Knockout Serum Ersatz
LDN	niedrig dosiertes Naltrexon
MEF	embryonale Mäusefibroblasten
Meis1	myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog
ml	Milliliter
mRNA	Boten-RNA
ms	mouse
MSX1	Msh Homeobox 1
n _b	Anzahl biologischer Replikate
NDS	Normal Donkey Serum
NEAA	nicht-essenzielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
NGN	Noggin
nM	Nanomolar
n _t	Anzahl technischer Replikate
O ₂	Sauerstoff
OAPP2/3	Kombinationen aus OPP und APP2
Oct4	Oktamer bindender Transkriptionsfaktor 4
OMP	olfaktorisches Markerprotein

Abkürzungsverzeichnis

OPP	olfaktorisches Plakodenprotokoll
PAX 6/7	paired Box 6/7
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung
PBX 1/2/3	Pre-B-cell leukaemia transcription factor 1/2/3
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
pKOSR	purere Knockout Serum Ersatz
PPR	Präplakodale Region
qRT-PCR	quantitative Echtzeit PCR
RA	Retinsäure
rb	rabbit
REF	embryonale Rattenfibroblasten
REF-Nr.	Referenznummer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SB	SB431542
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
sh	sheep
SIX1/4	Sineoculis homeobox homolog 1/4
SOX2	geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TUBB3	β -3-Tubulin
Wnt	Signalprotein; Zusammensetzung aus Wg (wingless) und Int-1
ZNS	Zentrales Nervensystem
β -ME	β -Mercaptoethanol = 2-Mercaptoethanol
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Der Geruchssinn

Mit der Fähigkeit, über eine Billion Gerüche voneinander unterscheiden zu können, stellt der menschliche Geruchssinn ein fein ausgeklügeltes und komplexes System dar (Bushdid et al., 2014). Die Erkennung verschiedenster Aromen spielt nicht nur eine wichtige Rolle beim Erkennen von Gefahren, sondern hat auch einen erheblichen Einfluss auf die Ernährung, Sexualität und Stimmung. Neuere Studien vermuten außerdem eine Beteiligung des Riechsinnens an weiteren physiologischen Prozessen wie beispielsweise dem Paarungsverhalten, dem Erkennen der Familie, der Detektion von Pheromonen, der Mutter-Kind-Bindung, Nahrungsvorlieben, der Physiologie des zentralen Nervensystems und der Lebenserwartung (Pinto, 2011).

1.1.1 Makroskopie des Geruchssinns

Die folgenden Ausführungen basieren im Wesentlichen auf *Gray's Anatomie für Studenten*. Die Nase beherbergt das für die Wahrnehmung von Gerüchen verantwortliche Riechepithel. Sie besteht aus zwei Nasenhaupthöhlen, welche in frontaler Ansicht einen keilförmigen Querschnitt mit Basis Richtung Mundhöhle haben und in die Tiefe des Schädels verlängert sind. Durch das Nasenseptum werden die Nasenhaupthöhlen voneinander getrennt. Nach kaudal werden die Nasenhaupthöhlen durch den harten Gaumen von der Mundhöhle abgegrenzt, die kraniale Begrenzung bilden Bestandteile des Siebbeins (Os ethmoidale), Stirnbeins (Os frontale) und Keilbeins (Os sphenoidale). Die laterale Nasenwand weist jeweils drei übereinander gelegene knöcherne Vorsprünge auf, welche als Nasenmuscheln (Conchae nasales) bezeichnet werden. Ventral wird die Nase vom knorpeligen Nasenskelett begrenzt. Die so von Knochen und Knorpel umgebenen Räume der Nasenhaupthöhlen sind mit Epithel ausgekleidet und können in drei Regionen unterteilt werden: Vestibulum nasi (Naseneingang), Regio respiratoria und Regio olfactoria. Letztere ist von olfaktorischem Epithel mit den darin enthaltenen Riechsinneszellen bedeckt. Als flächenmäßig kleinste der drei Regionen ist sie unterhalb der Siebbeinplatte (Lamina cribrosa) des Os ethmoidale am Dach der Nasenhaupthöhlen zu finden. (*Gray's*

Anatomie für Studenten. S. 1000 – 1003. Drake, Vogl, Mitchell. Elsevier GmbH, München 2007). Die nur wenige Quadratzentimeter umfassende Riechschleimhaut verteilt sich auf die obere Nasenmuschel, die kranial davon gelegene laterale Nasenwand, den ihr gegenüber liegenden Teil des Nasenseptums und die Schleimhautregion des Nasendaches (*Anatomie*. Band 2. S. 747 – 748. Benninghoff, Drenckhahn. Elsevier GmbH, München 2004). Im Folgenden wird der Aufbau des Riechepithels näher beschrieben. Der Inhalt lehnt sich an das *Taschenlehrbuch der Histologie* an.

1.1.2 Mikroskopischer Aufbau des olfaktorischen Epithels

Eine schematische Darstellung des olfaktorischen Epithels zeigt Abbildung 1. Die Riechschleimhaut besteht aus einem hohen mehrreihigen Epithel und der Lamina propria. Basalzellen stellen undifferenzierte Stammzellen dar und können sowohl Rezeptorneurone als auch Stützzellen bilden. Olfaktorische Rezeptorneurone sind primäre Sinneszellen, die mit ihren Axonen direkt ins zentrale Nervensystem (ZNS) ziehen. Apikal sind sie zu einem zilienträgenden Kolben verdickt und ragen in den auf dem Epithel gelegenen Riechschleim, welcher von den Bowman-Drüsen produziert wird. Die im Riechschleim vorzufindenden Odoranten können auf den Zilien an membranständige Rezeptoren binden und über Signalkaskaden eine Depolarisation der Membran herbeiführen. Olfaktorische Gliazellen bündeln die Axone der sensorischen Neurone, sobald diese in die Lamina propria eintreten. Als Fila olfactoria treten die etwa 20 Bündel durch die Lamina cribrosa hindurch und ziehen zum Bulbus olfactorius (*Taschenlehrbuch Histologie*. S. 583 - 584. Lüllmann-Rauch. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2012). Die olfaktorischen Rezeptorneurone können zeitlebens aus den Basalzellen gebildet werden, sodass an ihnen neuronale Regeneration erforscht wird. Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, dass die nach Differenzierung aus Basalzellen aussprossenden Axon-Fortsätze zum olfaktorischen Bulbus ziehen und eine Verknüpfung mit dem ZNS herstellen (Costanzo, 1991).

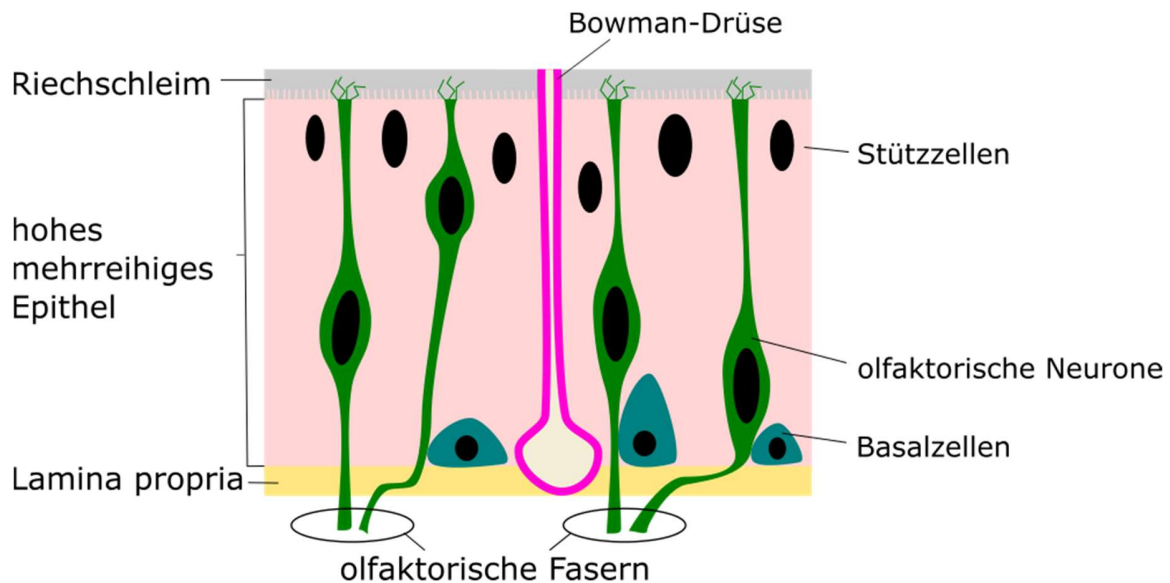


Abbildung 1: Schematische Darstellung des olfaktorischen Epithels.

Zu den Zellen des olfaktorischen Epithels gehören die olfaktorischen Neurone, die Stützzellen und die Basalzellen als undifferenzierte Stammzellen. Die Axone mehrerer olfaktorischer Neurone werden gebündelt und ziehen als olfaktorische Fasern zum Bulbus olfactorius im Gehirn. Basale Stammzellen sind für die Regeneration des olfaktorischen Epithels zuständig. Die in der Lamina propria lokalisierten Bowman-Drüsen (*Glandulae olfactoriae*) sezernieren den Riechschleim.

1.2 Entwicklung des olfaktorischen Systems

1.2.1 Embryonale Entwicklung des Menschen

Die folgenden Ausführungen basieren auf dem Lehrbuch *Duale Reihe Anatomie*. Die Entwicklung eines Menschen *in utero* dauert 38 Wochen und kann in drei Stadien unterteilt werden: Frühentwicklung (1. - 3. Woche), Embryonalperiode (4. - 8. Woche) und Fetalperiode (9. - 38. Woche). Während Frühentwicklung und Embryonalperiode vor allem durch morphologische Veränderungen geprägt sind und am Ende der Embryonalperiode alle Organsysteme angelegt sind, finden in der Fetalperiode hauptsächlich funktionelle Differenzierungen der Organe und eine Gewichtszunahme durch erhöhte Zellproliferation statt.

Die befruchtete Eizelle (Zygote) wandert durch den Eileiter zur Gebärmutter und erreicht durch kontinuierliche Zellteilungen nach drei Tagen ein 16-Zell-Stadium, dessen Zellen als Blastomere bezeichnet werden. Diese Zellansammlung wird auch als

Morula bezeichnet. In diesem Stadium befindet sich der frühe Embryo in der Gebärmutterhöhle (Cavum uteri). Die inneren Blastomeren differenzieren sich von den äußeren Blastomeren und leiten das Stadium der Blastozyste ein. Die Blastozyste besteht aus dem äußeren Trophoblasten und dem inneren Embryoblasten, welcher in der Blastozystenhöhle (Blastocoel) liegt. Die Blastozyste nistet sich zu diesem Zeitpunkt in die Gebärmutterschleimhaut ein (*Duale Reihe Anatomie*. S. 73 – 83. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2010). Aus den Zellen des Trophoblasten entwickelt sich im Laufe der Schwangerschaft der embryonale Teil der Plazenta. Die Zellen des Embryoblasten werden auch als embryonale Stammzellen bezeichnet und besitzen das Potential, einen kompletten Organismus zu formen (Sukoyan et al., 1993). Die Entwicklung vom Stadium der Morula aus wird in Abbildung 2 dargestellt.

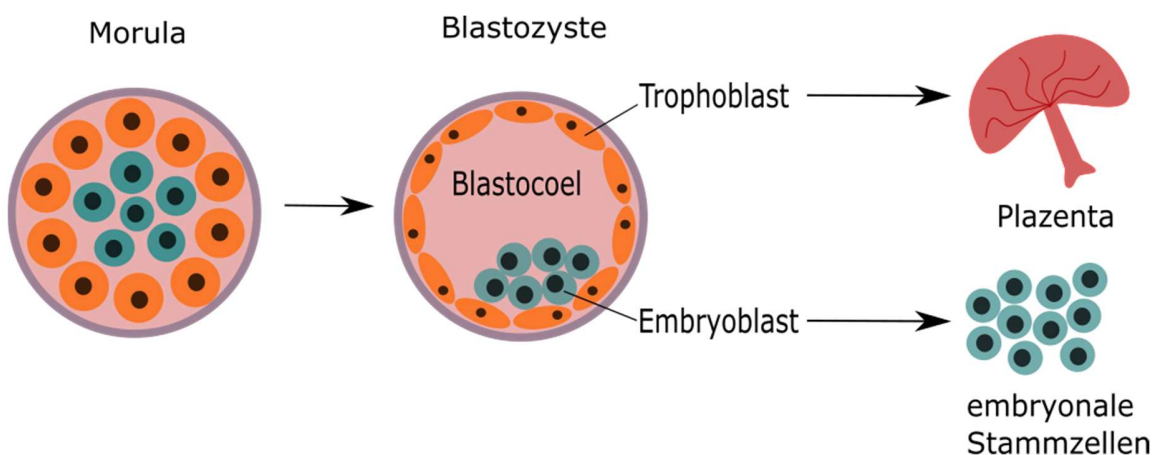


Abbildung 2: Entwicklung von der Morula zur Blastozyste

Die Abbildung zeigt die Entwicklung von der Morula im 16-Zell-Stadium zur Blastozyste. Vom Stadium der Blastozyste entwickeln sich die Zellen des Trophoblasten im Laufe der Schwangerschaft weiter zum embryonalen Teil der Plazenta. Die Zellen des Embryoblasten als embryonale Stammzellen haben die Fähigkeit, einen kompletten Organismus zu formen.

In der 2. Entwicklungswoche differenzieren die Zellen des Embryoblasten zur zwei-blättrigen Keimscheibe mit Epi- und Hypoblast. Die Zellen des Epiblasten wandern im Zuge der Gastrulation (ab der 3. Entwicklungswoche) entlang des Primitivstreifens in Richtung Hypoblast ein und bilden die drei Keimblätter Mesoderm, Entoderm

und Ektoderm (Abbildung 3). Als Primitivstreifen wird „eine bandartige Zellverdichtung in Längsachse des Epiblasten“ bezeichnet (*Duale Reihe Anatomie*. S. 80. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2010).

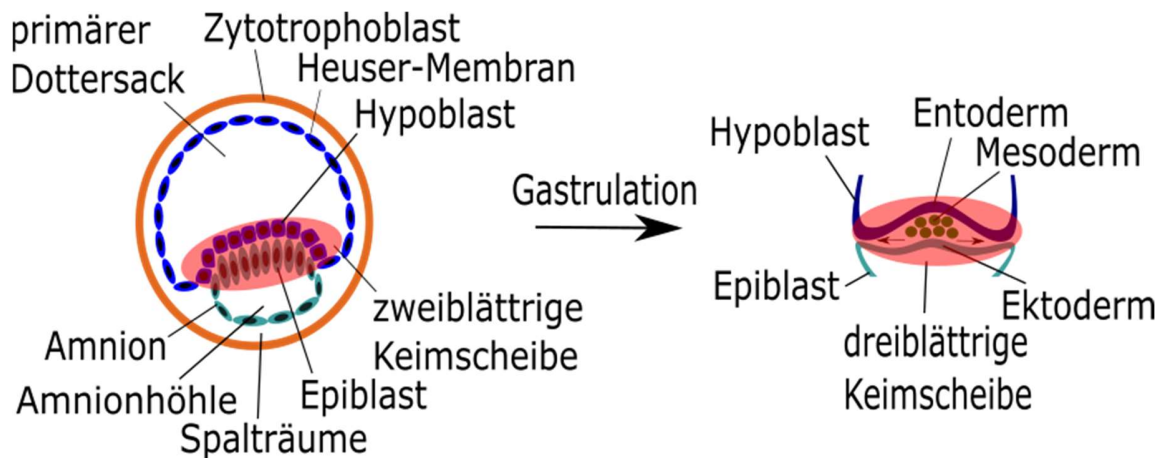


Abbildung 3: Entwicklung von der zweiblättrigen zur dreiblättrigen Keimscheibe

Die Abbildung zeigt die Entwicklung von der zweiblättrigen zur dreiblättrigen Keimscheibe mit den Keimblättern Mesoderm, Entoderm und Ektoderm im Zuge der Gastrulation. Es handelt sich um eine Darstellung im Sagittalschnitt in Anlehnung an *Duale Reihe Anatomie*. S. 80. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2010.

Aus dem Ektoderm gehen das Oberflächen-Ektoderm und die Neuralplatte hervor. Während der sogenannten Neurulation bildet sich aus der Neuralplatte das Neuralrohr, welches sich zum zentralen Nervensystem entwickelt (*Duale Reihe Anatomie*. S. 73 – 83. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2010). Die Randzonen der Neuralplatte sind an der Bildung weiterer ektodermaler Strukturen beteiligt. Neben der Neuralleiste ist hier auch die präplakodale Region (PPR) zu finden, welche den Ursprung der Plakoden darstellt (Abbildung 4). Plakoden sind vorübergehende Verdickungen des Kopfektoderms (van Wijhe 1883; von Kupffer 1891) und Ausgangspunkt für eine Reihe spezialisierter sensorischer Organe (Baker and Bronner-Fraser, 2001, Streit, 2004, Streit, 2007, Schlosser, 2006, Patthey et al., 2014, Saint-Jeannet and Moody, 2014, Moody and LaMantia, 2015).

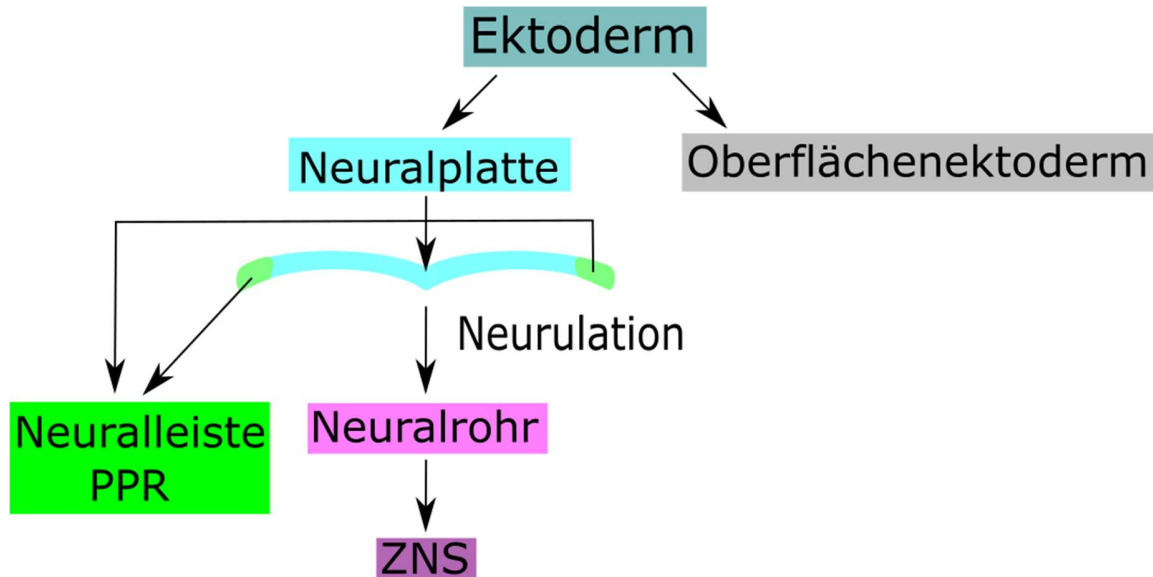


Abbildung 4: Ektodermale Entwicklung

Die Abbildung zeigt schematisch die Entwicklung des Ektoderms zum neuronalen Ektoderm, aus dem die Neuralplatte hervorgeht und zum Oberflächenektoderm, welches später die Epidermis hervorbringt. Während der Neurulation entsteht aus der Neuralplatte das Neuralrohr. Von diesem ausgehend erfolgt die Entwicklung des zentralen Nervensystems. Am Rand der Neuralplatte differenzieren sich die Neuralleiste und die PPR voneinander ab.

1.2.2 Entwicklung des Riechepithels

Das Riechepithel gehört mit seinen olfaktorischen Neuronen zu den sensorischen Organen, die aus embryonalen Plakoden hervorgehen (Moody and LaMantia, 2015). Zu den menschlichen Plakoden gehören die otogene, die trigeminale, die adenohipophysale, die epibranchiale, die Linsen- und olfaktorische Plakode (Graham and Begbie, 2000, Baker and Bronner-Fraser, 2001). Eine Übersicht der menschlichen Plakoden wird in Abbildung 5 dargestellt. Alle Plakoden stammen von der PPR ab (Bhattacharyya and Bronner-Fraser, 2008, Moody and LaMantia, 2015, Saint-Jeannet and Moody, 2014, Streit, 2008, Streit, 2007). Im Folgenden soll die Entwicklung der PPR, deren Weiterentwicklung zu Plakoden und die Differenzierung in die olfaktorische Plakode näher beschrieben werden.

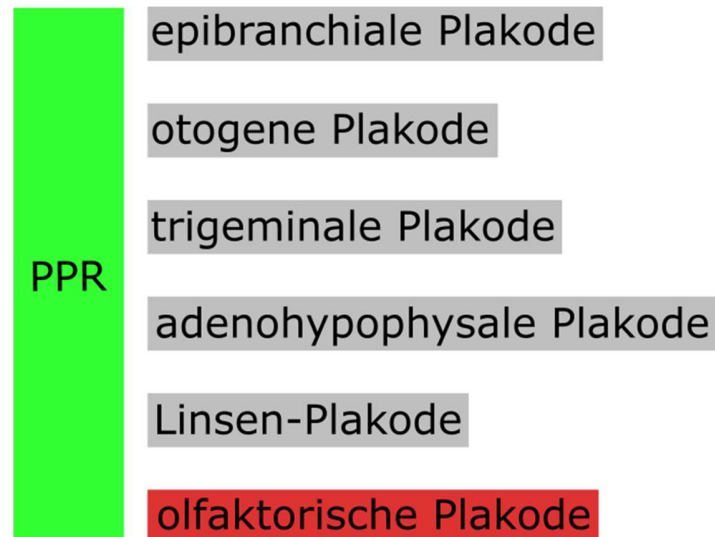


Abbildung 5: Menschliche Plakoden

Die Abbildung zeigt die menschlichen Plakoden mit Abstammung von der präplakodalen Region.

1.2.2.1 Entwicklung der präplakodalen Region

Während der embryonalen Gastrulation können die drei Keimblätter Mesoderm, Entoderm und Ektoderm voneinander unterschieden werden. Das Ektoderm differenziert sich später in das neuronale und nicht-neuronale Ektoderm. Aus dem neuronalen Ektoderm entwickelt sich die Neuralplatte als Abstammungsgrundlage des ZNS, während sich aus dem nicht-neuronalen Ektoderm die Epidermis entwickelt (Saint-Jeannet and Moody, 2014). Dort wo sich nicht-neuronales und neuronales Ektoderm berühren, entsteht unter Beeinflussung von Mesoderm und Entoderm die sogenannte neurale Grenzzone (Abbildung 6). Diese differenziert sich in Neuralleiste und PPR, welche den anterioren Teil der Neuralplatte hufeisenförmig umgibt (Moody and LaMantia, 2015). Studien zur Kartierung der Genexpression während der frühen Entwicklung in Küken (Couly and Le Douarin, 1990, Couly and Le Douarin, 1987, Streit, 2002) und Amphibien (Streit, 2004, Schlosser and Ahrens, 2004, Pieper et al., 2011) weisen darauf hin, dass der Ursprung aller Plakoden im

umgebenden Bereich der Neuralplatte liegt (Bhattacharyya and Bronner-Fraser, 2008). Als PPR-Marker gelten vor allem Gene der *Six*- und *Eya*-Familie (Moody and LaMantia, 2015, Esteve and Bovolenta, 1999, Kobayashi, 2000, Pandur and Moody, 2000, Ghanbari et al., 2001, McLarren et al., 2003, Schlosser and Ahrens, 2004, Streit, 2004, Litsiou et al., 2005, Christophorou et al., 2009).

Die neurale Grenzzone exprimiert unter anderem Gene der *Dlx*- und *Msx*-Familien (Abbildung 6). Diese Marker werden für die Expression von Neuralleisten- und PPR-Genen benötigt. *Dlx*-Gene sorgen für die Induktion der Neuralleisten- und PPR-Genen und unterdrücken die Neuralplatten-Gene (Feledy et al., 1999, Beanan and Sargent, 2000, Solomon and Fritz, 2002, Woda et al., 2003, McLarren et al., 2003, Esterberg and Fritz, 2009, Moody and LaMantia, 2015, Christophorou et al., 2009). Zu den Neuralleisten-spezifischen Genen gehören *Msx1*, *Pax3*, *FoxD3*, *Sox9/10*, *Dlx* und *TFAP2 α* (Moody and LaMantia, 2015).

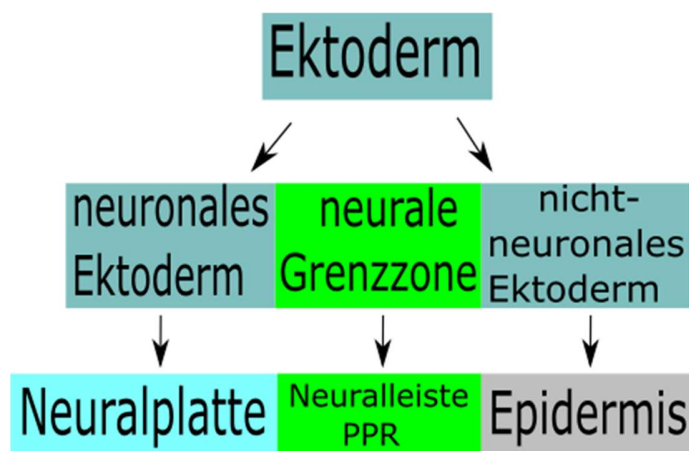


Abbildung 6: Entwicklung des Ektoderms

Die Abbildungen zeigen die Entwicklung des Ektoderms. Das Ektoderm differenziert sich in das neuronale und nicht-neuronale Ektoderm. Am Berührungspunkt dieser Regionen entsteht die neurale Grenzzone. Aus dieser gehen die Neuralleiste und die PPR hervor. Die Neuralplatte stammt vom neuronalen Ektoderm ab, während die Epidermis vom nicht-neuronalen Ektoderm gebildet wird.

Neurale Grenzzone			
<i>DLX</i>	<i>PAX3</i>	<i>TFAP2A</i>	<i>FOXI</i>
<i>MSX1</i>	<i>ZIC</i>	<i>GATA</i>	

PPR		Neuralleiste	
<i>SIX1</i>	<i>EYA1</i>	<i>MSX1</i>	<i>PAX3</i>
<i>SIX4</i>	<i>EYA4</i>	<i>FOXD3</i>	<i>SOX9</i>
		<i>SOX10</i>	<i>DLX</i>
		<i>TFAP2A</i>	

Abbildung 7: Genexpression verschiedener Regionen

Die Abbildung zeigt die in verschiedenen Regionen exprimierten Gene und Genfamilien.

Aber nicht nur Transkriptionsfaktoren aus der neuralen Grenzzone werden für die vollständige Entwicklung der PPR benötigt, auch Signale benachbarter Gewebe sind daran beteiligt. Der Fibroblast Growth Factor (FGF) aus dem benachbarten Mesoderm und der anterioren Neuralleiste sorgt für die Inhibition von PPR-unterdrückenden Faktoren und erhöht die Expression von PPR-spezifischen Genen (Grocott et al., 2012). Hohe Mengen an FGF unterdrücken die PPR-Bildung, niedrige FGF-Spiegel sind für die Entwicklung der PPR günstig (Hong and Saint-Jeannet, 2007, Moody and LaMantia, 2015). Das Bone Morphogenetic Protein (BMP) ist essenziell für die Expressions-Modulation vieler Gene der Grenzzone (Bhat et al., 2013, Luo et al., 2001). Tatsächlich wird nur ein sehr früher BMP-Puls benötigt, um deren Expression zu bewirken (Kwon et al., 2010). Um die Entwicklung der PPR zu fördern, muss der BMP-Spiegel später wieder gesenkt werden (Dincer et al., 2013). Das benötigte BMP hierfür stammt aus der Neuralplatte (Schlosser, 2014). Um weiterhin die Entwicklung der PPR zu fördern, geben umliegende Gewebe Faktoren ab, die den Wnt-Signalweg hemmen (Moody and LaMantia, 2015, Takai et al., 2010). Wnt inhibiert die PPR-Formation, weshalb niedrige Spiegel vonnöten sind, um sie zu expandieren beziehungsweise zu fördern (Litsiou et al., 2005,

Hong and Saint-Jeannet, 2007). Zusammengefasst begünstigt ein FGF-Puls in einer Umgebung mit niedrigen BMP- und Wnt-Konzentrationen die Induktion der PPR (Litsiou et al., 2005). Abbildung 8 zeigt die Beteiligung verschiedener Gewebe an der Entstehung der PPR. Die Entwicklung der olfaktorischen Plakode aus einem Teil der PPR soll nachfolgend näher erörtert werden.

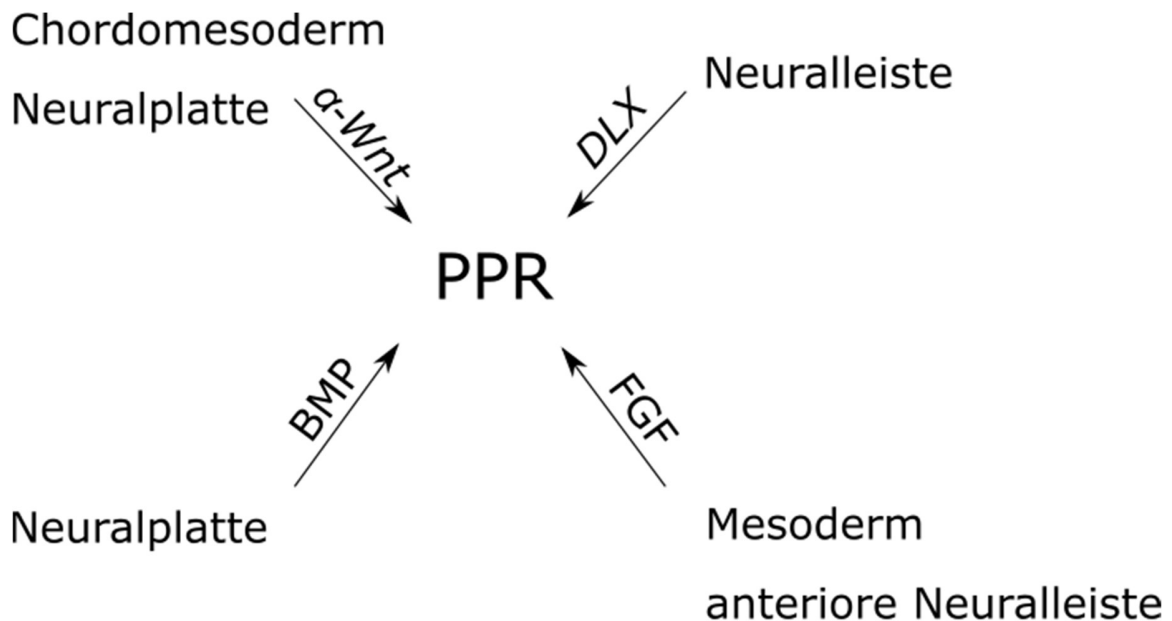


Abbildung 8: Beteiligung verschiedener Gewebe und Faktoren an der Entwicklung der PPR

Die Abbildung zeigt die an der Entwicklung der PPR beteiligten Faktoren und Gewebe. *DLX* aus der Neuralleiste sorgt für die Induktion der PPR. Weiterhin werden eine moderate FGF-Konzentration sowie ein früher BMP-Puls mit anschließender Erniedrigung für die Entwicklung der PPR benötigt. FGF hierfür stammt aus dem Mesoderm und der anterioren Neuralleiste. α -Wnt aus der Neuralplatte und dem Chordomesoderm fördert die PPR-Formation. BMP stammt aus der Neuralplatte.

1.2.2.2 Entwicklung der olfaktorischen Plakode

Studien haben gezeigt, dass anfänglich alle Zellen innerhalb der PPR befähigt sind jegliche Art von Plakode zu bilden (Moody and LaMantia, 2015, Streit, 2007, Bhattacharyya and Bronner-Fraser, 2008, Bailey and Streit, 2006, Saint-Jeannet and Moody, 2014). Durch Signale umgebender Gewebe jedoch wird der Zielzustand der Zellen bestimmt und diese zur Entwicklung in eine bestimmte Richtung angeregt

(Saint-Jeannet and Moody, 2014). Wenige Stunden nach Festigung der PPR als eigenständige Region innerhalb des Ektoderms beginnt sie, sich in einen anterioren, intermediären und posterioren Teil zu differenzieren. Aus dem anterioren Teil entstehen später die adenohipophysale, Linsen- und olfaktorische Plakode, wobei die adenohipophysale und die Linsen-Plakode die einzigen nicht-neurogenen Plakoden darstellen (Bailey et al., 2006). Der intermediäre Teil ist Ausgangspunkt der trigeminalen Plakode, während sich aus dem posterioren Teil die restlichen Plakoden bilden (Moody and LaMantia, 2015). Während zu Beginn der PPR viele Gene über die gesamte Region verteilt exprimiert werden, begrenzt sich deren Expression später entweder auf den anterioren oder posterioren Teil (Schlosser, 2006, Schlosser and Ahrens, 2004, Sjødal and Gunhaga, 2008). Allgemein ist die Theorie anerkannt, dass Signale umgebender Gewebe zusammen mit einer spezifischer Signalkombination aus BMP, FGF, Wnt und Retinsäure (RA) die spezifische Plakodenidentität bewirken (Saint-Jeannet and Moody, 2014), wobei bestimmte Signalwege spezifisch für die Entwicklung einer bestimmten Plakode benötigt werden. Olfaktorische Vorläuferzellen befinden sich in einem Gebiet der anterioren PPR und überlappen mit Vorläuferzellen der Linse; zusammen können sie als anteriore Plakodenvorläuferzellen bezeichnet werden und zeichnen sich unter anderem durch eine *Pax6*-Expression aus (Abbildung 9). Somatostatin und Nozizeptin spielen eine Rolle in der Regulation der *Pax6*-Expression, sodass diese für die Entwicklung der olfaktorischen oder Linsen-Plakode als wichtig betrachtet werden (Lleras-Forero et al., 2013). Weiterhin werden *Dlx3* und *Dlx5* als Marker verschiedener olfaktorischer Plakoden-Vorgänger angesehen (Bhattacharyya and Bronner-Fraser, 2008). Untersuchungen haben gezeigt, dass sich alle Zellen der PPR ohne Einfluss bestimmter Zytokine zur Linsen-Plakode entwickeln würden, sodass diese Entwicklung unterdrückt werden muss, um andere Plakoden zu fördern (Bailey et al., 2006, Tchieu et al., 2017). Diese Unterdrückung wird durch FGF aus der anterioren Neuralleiste gewährleistet und eingeleitet. Besonders FGF8 fördert die Entwicklung der olfaktorischen Plakode (Bailey et al., 2006). Als Marker der olfaktorischen Plakode gelten unter anderem *Ebf2* (Bally-Cuif et al., 1998, Moody and LaMantia, 2015), *Emx2*

(Moody and LaMantia, 2015, Mallamaci et al., 1998), *Foxg1* (Kawauchi et al., 2009) und *Dlx5* (Yang et al., 1998, Levi et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit werden folgende Marker betrachtet: *EYA1*, *EYA2* und *SIX1* für die PPR, sowie *EBF2*, *EMX2* und *FOXG1* für die olfaktorische Plakode. Die Entwicklung von der olfaktorischen Plakode zum olfaktorischen Epithel wird im Folgenden beschrieben.

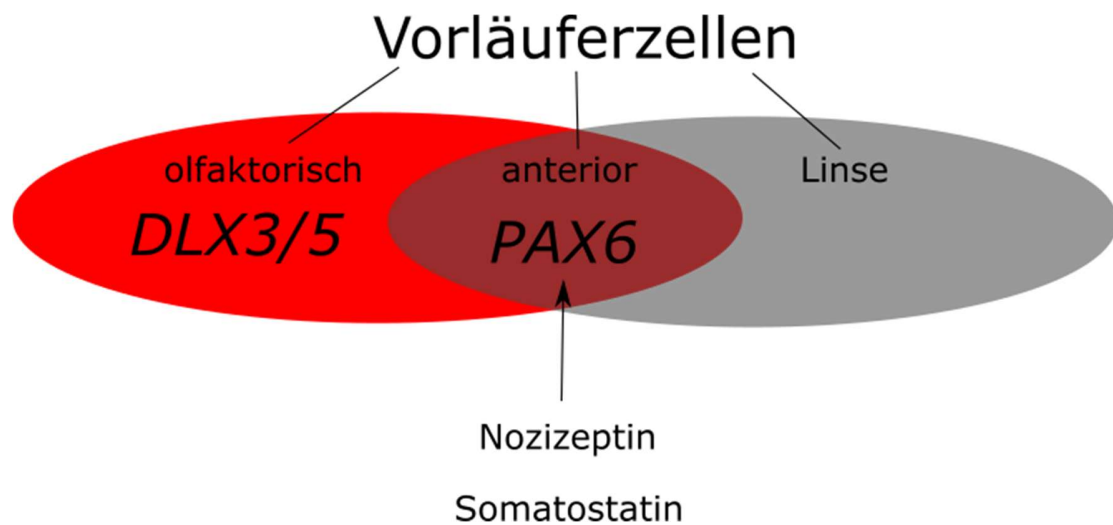


Abbildung 9: Anteriore, olfaktorische und Linsen-Vorläuferzellen

Die Abbildung zeigt die Überlappung olfaktorischer und Linsen-Vorläuferzellen. Zusammen werden sie als anteriore Vorläuferzellen der PPR bezeichnet, welchen die Expression von *PAX6* gemein ist. Die *PAX6*-Expression wird durch Nozizeptin und Somatostatin beeinflusst. Olfaktorische Vorläuferzellen exprimieren *DLX3* und *DLX5*.

1.2.2.3 Entwicklung des olfaktorischen Epithels

Um ein komplettes olfaktorisches Epithel mit olfaktorischen Rezeptorneuronen bilden zu können, wird nicht nur die olfaktorische Plakode, sondern auch das darunter liegende und von der Neuralleiste abstammende Mesenchym benötigt (Kawauchi et al., 2009). Nach der Entstehung der olfaktorischen Plakode stülpt sich diese zur Riechgrube ein. Mit fortschreitender Entwicklung vertiefen sich Einstülpungen und es bilden sich weitere Ausbuchtungen. Ausgehend von der Riechgrube differenziert sich das olfaktorische Epithel. Dieses enthält Zellen, die sich asymmetrisch teilen

und somit zu olfaktorischen Neuronen, beziehungsweise neuronalen Vorläuferzellen werden (Chen et al., 2009). Das olfaktorische Epithel lässt sich in verschiedene Bereiche unterteilen (Moody and LaMantia, 2015). Im je nach Publikation basal oder lateral genannten Abschnitt befinden sich die Stammzellen, welche in großen Mengen *Meis1*, *Pbx1/2/3*, *Pax7* sowie *Six1* exprimieren. *Sox2* hingegen ist in diesen Zellen verringert (Tucker et al., 2010, Chen et al., 2009). Die Genexpression von *Sox2* in den basal liegenden Zellen wird durch *Foxg1* beeinflusst (Kawauchi et al., 2009). Im medialen Anteil des olfaktorischen Epithels herrschen mit hohen *Sox2*- und niedrigen *Six2*-Spiegeln gegensätzliche Verhältnisse. Ebenfalls ist dort eine *Six4*- (Chen et al., 2009) und *Pax6*-Expression, sowie eine Differenzierung von olfaktorischen Rezeptorneuronen und GnRH-Neuronen beschrieben. Die Studienergebnisse (Chen et al., 2009, Tucker et al., 2010) wurden an Mäusen ermittelt. Abbildung 10 zeigt schematisch die Entwicklung der olfaktorischen Plakode zum olfaktorischen Epithel. Die schnelle Entwicklung und Differenzierung der Zellen ist auf ein abgestimmtes Zusammenspiel von Plakoden-Ektoderm und dem benachbarten und von der Neuralleiste abstammenden Mesenchym zurückzuführen. FGF- und BMP-exprimierende Regionen sorgen für die konstante Aussendung von mesenchymalen Differenzierungssignalen (Moody and LaMantia, 2015). Retinsäure- und FGF-Signale sind für die Kommunikation zwischen Mesenchym und olfaktorischem Plakoden-Ektoderm verantwortlich und beeinflussen die neuronale Differenzierung zum olfaktorischen Epithel (Bhasin et al., 2003, LaMantia et al., 2000, Lassiter et al., 2014).

Zusammenfassend kann für die Entwicklung des olfaktorischen Epithels mit olfaktorischen Rezeptorneuronen festgehalten werden, dass durch die regulierte Expression von *Six1*, *Sox2* und anderen Genen der *Six/Sox*-Familie das Plakoden-Ektoderm zur Bildung von Neuronen befähigt wird. Nur durch Signale aus benachbarten Geweben jedoch kann die Neuronenbildung auch tatsächlich vollzogen werden (Moody and LaMantia, 2015).

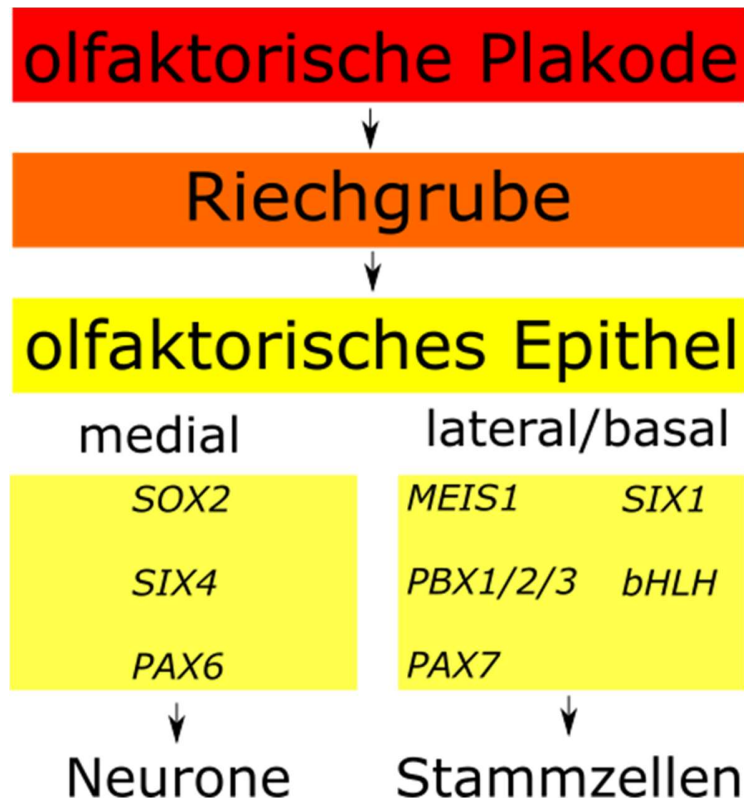


Abbildung 10: Entwicklung der olfaktorischen Plakode zum olfaktorischen Epithel

Die olfaktorische Plakode entwickelt sich über das Stadium der Riechgrube zum olfaktorischen Epithel, welches in einen medialen und lateralen/basalen Teil unterschieden werden kann. Die Unterscheidung dieser Anteile erfolgt unter anderem durch unterschiedliche Genexpression. Der mediale Teil bildet im weiteren Verlauf Neurone aus, während der laterale/basale Teil die Stammzellen stellt.

1.2.3 Rolle der *SIX*-Gene in der Entwicklung des Riechepithels

Die Rolle der *Six*-Gene während der Entwicklung des Riechepithels wurde durch eine Studie an Mäusen näher untersucht (Chen et al., 2009). Während *Six4* in den neuronalen Vorläuferzellen des olfaktorischen Epithels beobachtet werden kann, findet man *Six1* in den basal liegenden Stammzellen. *Six1*- und/oder *Six4*-Mutationen lösen Fehlbildungen des olfaktorischen Epithels aus. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine synergistische Wirkung von *Six1* und *Six4* mit dem FGF- und BMP-Signalweg zur regelrechten Ausbildung der olfaktorischen Plakode (Chen et al., 2009). Weiterhin spielt *Six1* eine Rolle bei der frühen Neurogenese im olfaktorischen

Epithel durch die Regulation von Transkriptionsfaktoren. Ist die Expression von *Six1* gestört beziehungsweise fehlt *Six1*, kann man keine neuronalen Frühformen oder Zellansammlungen beobachten, welche im Normalfall von der olfaktorischen Plakode bzw. dem olfaktorischen Epithel abstammen. Ebenfalls ist dann die Ausbildung von olfaktorischen Rezeptorneuronen und GnRH-positiven Neuronen gestört (Ikeda et al., 2007).

1.3 Humane induziert pluripotente Stammzellen

Alle Erkenntnisse, die bisher zur Aufklärung der oben genannten Entwicklungsvorgänge geführt haben, wurden durch Forschung an Tieren verschiedener Spezies gewonnen. Zurzeit werden Experimente durchgeführt in denen versucht wird, die entdeckten Signalwege auf menschliche Zellen zu übertragen und so die Entwicklung verschiedener Plakoden zu induzieren (Dincer et al., 2013, Koehler et al., 2017). Als Ausgangspunkt all dieser Experimente werden pluripotente Zellen benötigt. Pluripotenz bezeichnet die Eigenschaft von Stammzellen, Zellen aller drei Keimblätter hervorbringen und sich theoretisch unendlich oft teilen zu können. Bei embryonalen Stammzellen handelt es sich um physiologisch vorkommende pluripotente Zellen (Evans and Kaufman, 1981, Martin, 1981). Aus somatischen Zellen können pluripotente Stammzellen induziert werden (Takahashi and Yamanaka, 2006). Durch das Überführen nuklearer Komponenten von murinen somatischen Zellen in Oozyten (Wilmut et al., 1997) oder durch Vereinigung mit embryonalen Stammzellen (Cowan et al., 2005, Tada et al., 2001) konnte eine Reprogrammierung somatischer Zellen zur Pluripotenz herbeigeführt werden. Die Vermutung lag daher nahe, dass unbefruchtete Oozyten und embryonale Stammzellen Faktoren enthalten, welche die Reprogrammierung somatischer Zellen induzieren. Diese Faktoren wurden als Oct3, Oct4, Sox2, c-Myc und Klf4 identifiziert. Durch retrovirales Einbringen dieser Faktoren konnten murine Fibroblasten zur Pluripotenz reprogrammiert werden (Takahashi and Yamanaka, 2006). Die Anwendung des Reprogrammierungsverfahrens durch retrovirale Transduktion an humanen somatischen Zellen (Fibroblasten) gelang nur ein Jahr später (Takahashi et al., 2007). Neuere Studien konnten humane

somatische Zellen ausschließlich unter Verwendung des Faktors *OCT4* zur Pluripotenz reprogrammieren (Kim et al., 2009). Die in der Arbeit verwendeten hiPSZ wurden ausschließlich unter Verwendung des Faktors *OCT4* hergestellt.

Die nachfolgenden Ausführungen nehmen hauptsächlich Bezug auf Raab et al. (2014). Die ersten humanen Zellen, die für die Erzeugung von hiPSZ verwendet wurden waren Fibroblasten (Takahashi et al., 2007). Ursächlich dafür ist zum großen Teil ihre Verfügbarkeit, da sie leicht aus Hautbiopsien isoliert werden können. Des Weiteren sind sie in ihrer Handhabung in Kultur relativ pflegeleicht. Trotzdem muss zu ihrer Gewinnung ein invasiver Eingriff vorgenommen werden. Dieser kann schmerzhaft sein und muss von einem Arzt durchgeführt werden. Durch den Eingriff steigt das Risiko für Infektionen, es können allergische Reaktionen gegen das Anästhetikum auftreten, Narben- bzw. Keloidbildungen sind möglich und es kann zu kleinen Blutungen an der Entnahmestelle kommen (Raab et al., 2014). Fibroblasten zeichnen sich durch eine hohe Reprogrammierungsfähigkeit und schnelles Zellwachstum aus. Nicht reprogrammierte Fibroblasten allerdings können durch ihre schnelle Proliferation reprogrammierte Zellen überwachsen. Ebenfalls können nur Fibroblasten in niedrigen Passagen (geringer als 5) verwendet werden, da mit steigenden Passagen die Effizienz der Reprogrammierung sinkt (Streckfuss-Bomeke et al., 2013). Ihre Reprogrammierungseffizienz beträgt etwa 0,01 - 0,5 % bei einem etwa 3 - 5 Wochen andauernden Reprogrammierungsprozess (Takahashi et al., 2007). Anschließend dauert es maximal zwei Wochen bis Stammzellkolonien ersichtlich sind; diese Zeitspanne ist im Vergleich zu anderen Zellarten, die zur Reprogrammierung verwendet werden können, relativ lang (Takahashi et al., 2007, Aasen et al., 2008). Aufgrund genannter Faktoren, aber vor allem aufgrund des invasiven Eingriffs zur Gewinnung von Fibroblasten, wurde weiter nach Alternativen – auch nicht-invasiven – geforscht. Neben vergleichsweise einfach zugänglichen Zelltypen aus Blut (Haase et al., 2009, Loh et al., 2009) und Urin (Zhou et al., 2011), werden auch schwerer gewinnbare Zelltypen wie beispielsweise pankreatische Betazellen (Bar-Nur et al., 2011) oder mesenchymale Stromazellen aus Weisheitszähnen (Atari

et al., 2012, Oda et al., 2010) verwendet. Während all diese Zelltypen gewisse Nachteile mit sich bringen, seien es eine geringe Reprogrammierungseffizienz, hohe Kosten für die Gewinnung oder Kultivierung oder die Einschränkung des Personenkreises, von dem die Zellen gewonnen werden können, bringt die Verwendung von Keratinozyten aus gezupften Haaren große Vorteile mit sich (Raab et al., 2014). Diese werden nachfolgend erläutert. Unter einfachen Bedingungen können gezupfte Haare über mehrere Tage lang gelagert werden. Lange Transportwege stellen somit kein Problem dar. Des Weiteren wird ein invasiver Eingriff vermieden. Die Keratinozyten werden in einem kalziumarmen Medium kultiviert, wobei eine auswachsende Haarwurzel genügend Zellen für eine Reprogrammierung liefert. Durch die Abwesenheit von Kalzium sollen die Keratinozyten am Altern gehindert werden, da mit zunehmendem Alter die Reprogrammierungseffizienz sinkt. Keratinozyten können innerhalb von 1-2 Wochen reprogrammiert werden und weisen eine hohe Grundexpression von C-MYC und KLF4 auf. Dies kann eine effiziente Reprogrammierung begünstigen (Raab et al., 2014), welche im Vergleich zu Fibroblasten um bis das Hundertfache auf 1-2 % gesteigert ist (Linta et al., 2012, Aasen et al., 2008, Shi et al., 2008).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl der Riechsinn in vielen Bereichen des Lebens eine zentrale Rolle spielt, gibt es bisher im Vergleich zu anderen Sinnen wenige wissenschaftliche Arbeiten, die sich mit seiner frühen Entwicklung beschäftigen. Ausgehend von hiPSZ soll ein adhärenthes Differenzierungsprotokoll für die frühe olfaktorische Entwicklung generiert und auf RNA- und Proteinebene untersucht werden. Die hiPSZ werden aus Keratinozyten von Kontrollpersonen durch lentivirale Infektion gewonnen und auf PPR und olfaktorische Plakoden-Marker mit qRT-PCR und Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Dazu werden folgende Teilschritte durchgeführt:

- a) Analyse von hiPSZ auf RNA- und Proteinebene auf olfaktorische Markerexpression
- b) Differenzierung der hiPSZ zu präplakodalen Zellen und olfaktorischen Plakoden-Zellen
- c) Vergleich verschiedener Modifizierungen des olfaktorischen Protokolls

Das Ziel der Arbeit soll die Generierung eines adhärenthes Differenzierungsprotokolls für die frühe olfaktorische Entwicklung sein, welches nachweislich zur Expression von präplakodalen und olfaktorischen plakodalen Markern führt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Ethikvotum

Für die Arbeitsgruppe Liebau gilt folgendes Aktenzeichen der Ethikkommission: 638/2013BO1. Das Aktenzeichen 177/2019BO2 gilt zusätzlich für die olfaktorische Forschung innerhalb der Arbeitsgruppe.

2.1.2 Zelllinien

In der nachfolgenden Tabelle werden alle verwendeten Zelllinien aufgeführt.

Tabelle 1: Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Verwendung
hiPSZ KF	hiPSZ aus reprogrammierten menschlichen Fibroblasten	Stammzellen für Differenzierung
hiPSZ K2	hiPSZ aus reprogrammierten menschlichen Keratinozyten von Kontrollperson 2	Stammzellen für Differenzierung
Lenti-X-239T	Ursprung aus Nierenzellen HEK293 (Takara)	Reprogrammierung von Keratinozyten
MEF	CD1 Mausembryo-Fibroblasten E12,5 (StemCell™ Technologies)	Herstellung von MEF-konditioniertem Medium
REF	Rattenembryo-Fibroblasten E 14,5	Ammen-Zellen während der Reprogrammierung

2.1.3 Gebrauchsfertige Reaktionslösungen

In der nachfolgenden Tabelle werden alle verwendeten gebrauchsfertigen Reaktionslösungen aufgeführt.

Tabelle 2: Gebrauchsfertige Reaktionslösungen

Bezeichnung	REF-Nr. oder Kat. Nr.	Hersteller
Cells Direct One Step qRT-PCR Kit	46-7201	Invitrogen
ExtractME Total RNA Micro Spin Kit	EM31-250	BLIRT S.A.
PreAmp Master Mix	100-5581	Fluidigm

QuantiFast Probe RT-PCR Kit	2044	QIAGEN
QuantiNova SYBR Green PCR Kit	2080	QIAGEN
StemLight Pluripotency Antibody Kit	9656S	Cell Signaling Technology

2.1.4 Chemikalien

In der nachfolgenden Tabelle werden alle verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 3: Chemikalien

Bezeichnung	REF-Nr. oder Kat. Nr.	Hersteller
2x Assay Loading Reagent	85000736	Fluidigm
Cascade Biologics EpiLife	MEPI500CA	Thermo Fisher Scientific
Collagen from human placenta	C5533-5MG	Sigma Aldrich Chemie GmbH
CryoStem	05-710-1E	Biological Industries
DMEM (+4,5 g/l D-Glucose, +L-Glutamin, - Pyruvat)	41965-039	Thermo Fisher Scientific
DMEM/F-12 (1:1) + GlutaMAX	31331-028	Thermo Fisher Scientific
DPBS -/- Dulbecco's Modified Eagle's Medium	14189-094	Thermo Fisher Scientific
DPBS +/- Dulbecco's Modified Eagles' Medium	14040-133	Thermo Fisher Scientific
DPBS Calcium, Magnesium	14040-091	Thermo Fisher Scientific
DPBS ohne Calcium ohne Magnesium	14190-094	Thermo Fisher Scientific
GE Sample Loading Reagent	85000735	Fluidigm
Glucose	HN06.1	Carl Roth GmbH + Co.KG
Keratinocyten-Dispase	354235	Corning
Knockout-DMEM (1X)	10829-018	Thermo Fisher Scientific
Matrigel hESC-qualified Matrix	354177	CORNING
Normal Donkey Serum	S30-100ml	EMD Millipore Corporation

PFA	0335	Carl Roth GmbH + Co.KG
ProLong® Diamond Antifade Mountant with DAPI	P36962	Thermo Fisher Scientific
ReLeSR	05873	STEMCELL Technologies
RNAse-free water	1018017	QIAGEN
Synth-a-Freeze	A12542-01	Thermo Fisher Scientific
TaqMan Assay 20 x	4351372	Applied Biosystems
TE Buffer pH 7,0	AM9861	Invitrogen
Triton X 100	3051	Carl Roth GmbH + Co.KG
TrypLE Express	12604-021	Thermo Fisher Scientific
TrypLE Express	12604-021	Thermo Fisher Scientific
Universal TaqMan PCR Mix No AmpErase - UNG	4324018	Applied Biosystems

2.1.5 Zusätze

In der nachfolgenden Tabelle werden alle verwendeten Zusätze aufgeführt.

Tabelle 4: Zusätze

Bezeichnung	REF-Nr. oder Kat. Nr.	Hersteller
2-Mercaptoethanol	31350-010	Thermo Fisher Scientific
Antibiotic Antimycotic	15240-062	Thermo Fisher Scientific
B-27 Supplement	17504-044	Thermo Fisher Scientific
Bio Pure Human Serum Albumine 10 % Solution	05-720-1B	Biological Industries
BMP4	120-05ET	PeptoTech
CD Lipid Concentrate	11905-031	Thermo Fisher Scientific
Dorsomorphin	ab120843	Abcam
FCS	10500-064	Thermo Fisher Scientific
FGF2	GFH146	Cell Guidance Systems
FGF8	100-25	PeptoTech
GlutaMAX	35050-038	Thermo Fisher Scientific
HKGS (Human Keratinocyte Growth Supplement)	S-001-5	Thermo Fisher Scientific
Human Activin A	GFH6	Cell Guidance Systems
ITS	354350	Corning
IWR1e	I0161	Sigma Aldrich Chemie GmbH

KnockOut SR Serum Replacement	10828-028	Thermo Fisher Scientific
MEM Non-Essential Amino-Acids	11140-050	Thermo Fisher Scientific
Polybrene	H9268	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Retinsäure	R2625	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Recombinant Human TGF- β 1	100-21	PeproTech
SB431542	S1076	Selleckchem
Vitamin C	3525.1	Carl Roth GmbH + Co.KG
Y-27632 2HCl (Rock-Inhibitor)	S1049	Selleckchem

2.1.6 Oligonukleotide

In der nachfolgenden Tabelle werden die Primer des QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kits (Qiagen) und die TaqMan-Sonden des Fluidigms (Life Technologies) genannt.

Tabelle 5: Oligonukleotide

Bezeichnung	REF-Nr. oder Kat. Nr.	Hersteller
Hs_EBF2_1_SG	QT00072072	QIAGEN
Hs_EMX2_1_SG	QT00215824	QIAGEN
Hs_EYA1_1_SG	QT00070980	QIAGEN
Hs_EYA2_1_SG	QT00076573	QIAGEN
Hs_FOXG1_1_SG	QT00245329	QIAGEN
Hs_GAPDH_1_SG	QT00079247	QIAGEN
Hs_HMBS_1_SG	QT00014462	QIAGEN
Hs_MSX1_1_SG	QT00224350	QIAGEN
Hs_PAX6_1_SG	QT00071169	QIAGEN
Hs_SIX1_1_SG	QT00010584	QIAGEN
Hs_SIX4_1_SG	QT00035959	QIAGEN
Hs_SOX2_1_SG	QT00237601	QIAGEN
Hs_EBF2_va.1_SG	QT02503781	QIAGEN
ASCL1	Hs04187546_g1	Life Technologies
CALB2	Hs00418693_m1	Life Technologies
CK14	Hs00265033_m1	Life Technologies

DLX5	Hs00193291_m1	Life Technologies
DMRTA1	Hs00403012_m1	Life Technologies
EBF2	Hs00224081_m1	Life Technologies
E-CAD = CDH1	Hs01023894_m1	Life Technologies
EMX2	Hs00244574_m1	Life Technologies
EYA1	Hs00166804_m1	Life Technologies
EYA2	Hs00193347_m1	Life Technologies
FOXE3	Hs00846317_s1	Life Technologies
FOXG1	Hs01850784_s1	Life Technologies
FOXI3	Hs03645828_s1	Life Technologies
GATA3	Hs00231122_m1	Life Technologies
GBX2	Hs00230965_m1	Life Technologies
KRT19	Hs00761767_s1	Life Technologies
LHX3	Hs01033412_m1	Life Technologies
MSX1	Hs00427183_m1	Life Technologies
NCAM1	Hs00941830_m1	Life Technologies
NCAM2	Hs00189850_m1	Life Technologies
NESTIN	Hs04187831_g1	Life Technologies
NEUROD1	Hs01922995_s1	Life Technologies
NGN1	Hs01029249_s1	Life Technologies
OMP	Hs01087269_s1	Life Technologies
OTX2	Hs00222238_m1	Life Technologies
PAX2	Hs00240858_m1	Life Technologies
PAX6	Hs00240871_m1	Life Technologies
PAX8	Hs01015257_g1	Life Technologies
RPSA	Hs03046712_g1	Life Technologies
SIX1	Hs01018030_m1	Life Technologies
SIX3	Hs00193667_m1	Life Technologies
SIX4	Hs00213614_m1	Life Technologies
SOX1	Hs01057642_s1	Life Technologies
SOX10	Hs00366918_m1	Life Technologies
SOX2	Hs01053049_s1	Life Technologies
SOX9	Hs01001343_g1	Life Technologies
TFAP2A	Hs01029413_m1	Life Technologies
TUBB3	Hs00801390_s1	Life Technologies
UCHL1	Hs00985157_m1	Life Technologies
ZIC1	Hs00602749_m1	Life Technologies

2.1.7 Antikörper

In der nachfolgenden Tabelle werden die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper aufgelistet.

Tabelle 6: Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	REF-Nr. oder Kat. Nr.	Hersteller
Primärantikörper			
Anti-beta III Tubulin antibody Mouse	1:750	ab78078	Abcam
Anti-FOXG1 antibody Goat	1:500	ab3394	Abcam
Eya1 polyclonal antibody Rabbit	1:100	22658-1-AP	Proteintech
Eya2 monoclonal antibody (M04), clone 2F8 Mouse	1:50	H00002139-M04	Abnova
Human/Mouse EBF-2 Antibody Sheep	1:40	AF7006	Bio-Techne
PAX3	1:31	Ab15717	Abcam
Pax-6 polyclonal antibody, purified Rabbit	1:100	PRB-278P	BioLegend
Six1 polyclonal antibody Rabbit	1:100	10709-1-AP	Proteintech
Six4 monoclonal antibody (M09), clone 7E2 Mouse	1:67	H00051804-M09	Abnova
Sekundärantikörper			
Donkey Anti-Goat IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	1:1000	ab150129	Abcam

Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	1:1000	ab150105	Abcam
Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 568)	1:1000	ab175472	Abcam
Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 647)	1:1000	ab150107	Abcam
Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	1:1000	ab150073	Abcam
Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 568)	1:1000	ab175470	Abcam
Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 647)	1:1000	ab150075	Abcam
Donkey Anti-Sheep IgG H&L (Alexa Fluor® 568)	1:1000	ab175712	Abcam
Verwendete Antikörper des StemLight Pluripotency Antibody Kits			
Nanog (D73G4) XP Rabbit mAb	1:200	4903	Cell Signaling Technology
Sox2 (D6D9) Rabbit mAb	1:200	9656	Cell Signaling Technology
Oct-4A (C30A3) Rabbit mAb	1:200	9656	Cell Signaling Technology

2.1.8 Geräte

In folgender Tabelle werden die benutzten Geräte aufgeführt.

Tabelle 7: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Axio Imager M2 Forschungsmikroskop	Zeiss
Biomark TM	Fluidigm
Eppendorf Research Plus Pipette 0,1 - 2,5 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 0,5 - 10 µl	Eppendorf

Eppendorf Research Plus Pipette 10 – 100 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 100 - 1000 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 500 - 5000 µl	Eppendorf
EVOS FL Cell Imaging System	Thermo Fisher Scientific
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 1 – 10 µl	Thermo Fisher Scientific
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 10 – 100 µl	Thermo Fisher Scientific
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 100 – 1000 µl	Thermo Fisher Scientific
Flockeneisbereiter AF-103	Scotsman
Gefrierschrank GN 4113-20K	Liebherr
Heracell 240i CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific
Heraeus™ Fresco™ Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Heraeus™ Megafuge™ 16 Universal- zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Kühl-Gefrierkombination CUN 3933- 21B	Liebherr
Mikrowelle MW13145W	Amica
MSC-Advantage™ biologische Sicher- heitswerkbank, Klasse 2	Thermo Fisher Scientific
Nanophotometer™ P-Class	Implen
NeoVortex D-6012	NeoLab
Pipetus®	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Primoverte inverses Mikroskop	Zeiss
StepOnePlus™ Real-time PCR System	Thermo Fisher Scientific
Ultra-Tiefkühlschrank Forma 900 Series	Thermo Fisher Scientific

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

In der nachstehenden Tabelle sind alle verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Material und Methoden

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	REF-Nr. oder Kat. Nr.	Hersteller
0,5 ml Reaktionsgefäß	72.704.700	Sarstedt
1,5 ml Reaktionsgefäß	72.706.700	Sarstedt
12 Well Kulturplatten	353043	Corning
15 ml Zentrifugenröhrchen	62.554.502	Sarstedt
24 Well Kulturplatten	662168	Greiner Bio One
25 cm ² Kulturflaschen	3815	Corning
50 ml Zentrifugenröhrchen	227261	Greiner Bio One
6 Well Kulturplatten	353046	Corning
96.96 Dynamic Array™ IFC	BMK-M-96.96	Fluidigm
BD Plastipak 50 ml Spritzen	300869	VWR
Clip Tip™ Pipettenspitzen 1 - 10 µl	94410210	Thermo Fisher Scientific
Clip Tip™ Pipettenspitzen 10 - 100 µl	94410310	Thermo Fisher Scientific
Clip Tip™ Pipettenspitzen 100 - 1000 µl	94410710	Thermo Fisher Scientific
Cryoröhrchen 1,2 ml	430487	Corning
MicroAmp® Optical Adhesive Film	4311971	Thermo Fisher Scientific
Nitril powderfree Handschuhe	290417	ABENA
Pipettenspitzen 10 µl	720011	Biozym
Pipettenspitzen 1000 µl	740290	Greiner Bio One
Pipettenspitzen 200 µl	70.760.002	Sarstedt
Serologische Pipette 10 ml	86.1254.001	Sarstedt
Serologische Pipette 25 ml	357525	Corning
Serologische Pipette 5 ml	86.1253.001	Sarstedt

2.1.10 Software und Internetressourcen

Nachfolgend werden verwendete Software und Internetressourcen aufgeführt.

Tabelle 9: Software

Bezeichnung	Quelle
Software	
Adobe Illustrator	Adobe Systems Software
AxioVision SE64 Rel 4.9	Carl Zeiss AG
EndNote	Clarivate Analytics
Fluidigm Real-Time PCR Analysis Software v.3.0.2.	Fluidigm
Inkscape	freie Software zur Erzeugung von Vektorgrafiken
Microsoft Office	Microsoft Corporation
StepOne Software V 2.3	Thermo Fisher Scientific
Internetressourcen	
NCBI PubMed Publikationsdatenbank	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

2.1.11 Hersteller

In der nachfolgenden Tabelle sind die Hersteller der verwendeten Materialien aufgelistet.

Tabelle 10: Hersteller

Abcam, Cambridge, United Kingdom	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ABENA, Zörbig, Deutschland	Fluidigm, San Francisco, USA
Abnova, Heidelberg, Deutschland	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Adobe Systems, San José, USA	Implen GmbH, München, Deutschland
Amica, Wronki, Polen	Liebherr, Bulle, Schweiz
BioLegend, Fell, Deutschland	Life Technologies, Paisley, United Kingdom
Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Bio-Techne, Minneapolis, USA	NeoLab, Heidelberg, Deutschland

Material und Methoden

Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
Blirt S.A., Gdąnsk, Polen	Qiagen, Hilden, Deutschland
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	Scotsman, Illinois, USA
Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	Selleckchem, München, Deutschland
Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Clarivate Analytics, London, United Kingdom	Stem Cell Technologies, Köln, Deutschland
Corning, Amsterdam, Niederlande	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EMD Millipore Corporation, Massachusetts, USA	VWR, Darmstadt, Deutschland

2.1.12 Medien

In der nachfolgenden Tabelle werden alle verwendeten Medien in ihrer Zusammensetzung aufgelistet.

Tabelle 11: Zusammensetzung aller verwendeten Medien

Medium	Grundmedium	Zusätze	Verwendung
FTDA	DMEM F-12 + GlutaMAX 1 % AA 1 % HSA 1 % CDL	0,1 % ITS 5 ng/ml Activin A 10 ng/ml FGF2 0,5 ng/ml TGFβ 50 nM Dorsomorphin	Nährmedium für Stammzellen
GM-Medium	DMEM F12 + GlutaMAX 1 % GlutaMAX (100X) 1 % AA		Grundmedium Differenzierung
KOSR-Medium	DMEM F12 + GlutaMAX 20 % KO-SR 1 % NEAA 1 % AA 0,2 % β-ME		Grundmedium Differenzierung
pKOSR-Medium	DMEM F12 + GlutaMAX 20 % KSR 1 % AA		Grundmedium Differenzierung

2.2 Methoden

2.2.1 Stammzellen

Die verwendeten Stammzellen sind charakterisiert und erfüllen die Anforderungen, welche für die durchgeführten Versuche bedeutsam sind (Klingenstein et al., 2016).

2.2.1.1 Stammzellen auftauen

Will man Stammzellen für einen längeren Zeitraum lagern, können sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren werden. Pro eingefrorenem Kryoröhrchen werden 1 - 2 Wells einer 6-Well-Platte mit je 700 µl Matrigel in KO-DMEM beschichtet und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird das verbliebene Matrigel entfernt, pro Well 500 µl FTDA hinzugefügt und das Kryoröhrchen mit den Stammzellen im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Die nun flüssige Zellsuspension wird in DMEM/F-12 + GlutaMAX aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt, welches daraufhin bei 1500 rpm für zwei Minuten zentrifugiert wird. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in dem Kulturmedium resuspendiert und auf die zuvor mit Matrigel beschichteten Wells verteilt.

2.2.1.2 Stammzellen passagieren

Ist das Well vollständig mit Stammzellen bedeckt oder zeigt sich ein Farbumschlag des Kulturmediums, müssen die Zellen auf weitere Wells passagiert werden. Dazu werden 6-Well-Platten mit Matrigel in KO-DMEM beschichtet und für eine Stunde inkubiert. Das Medium wird von den zu passagierenden Wells entfernt und diese mit PBS +/- gewaschen. Pro Well werden 500 µl ReLeSR hinzugefügt und die Zellen bei Raumtemperatur eine Minute inkubiert. Anschließend wird die Enzymlösung entfernt und bei Raumtemperatur weitere vier bis acht Minuten abgewartet. Pro Well werden die nun gelösten Stammzellen in FTDA aufgenommen und auf neue Platten gleichmäßig verteilt. Die Zellen werden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 5 % O₂ kultiviert.

2.2.1.3 Stammzellen einfrieren

Werden nicht alle Wells passagiert, so können die restlichen Zellen eingefroren werden. Dazu wird das Nährmedium entfernt und pro Well 500 µl ReLeSR hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute mit ReLeSR und vier Minuten bei Raumtemperatur nach Absaugen der Enzymlösung werden die Zellen mit FTDA abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugationszeit von 2 Minuten bei 1500 rpm wird der Überstand verworfen, das Zellpellet mit 800 µl CryoStem resuspendiert und die Zell-Suspension auf Kryoröhrchen verteilt. Die Lagerung der Kryoröhrchen erfolgt in flüssigem Stickstoff.

2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung

Ziel der Immunfluoreszenzfärbung ist es, in Zellen vorhandene Proteine sichtbar zu machen und deren Lokalisation zu detektieren. Dazu werden Antikörper benutzt, die an ihre intrazellulären Antigene binden. Diese intrazellulären Antigene entsprechen den zu detektierenden Proteinen.

2.2.2.1 Fixierung der Zellen für Immunfluoreszenz-Färbung

Das Medium wird entfernt und die Wells mit PBS -/- gewaschen. Pro Well werden auf 37 °C vorgewärmte 300 bis 500 µl 4 % Paraformaldehyd (PFA) + 10 % Saccharoselösung zu den Zellen gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Behandlung der Zellen mit PFA und Saccharose kommt die Stoffwechselaktivität zum Erliegen, die Zellen sterben ab und werden gleichzeitig in ihrem Zustand fixiert. Anschließend werden die Zellen für 5 Minuten mit PBS -/- gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in PBS -/- bei 4 °C gelagert.

2.2.2.2 Färbevorgang

Im ersten Schritt wird das PBS -/- abgenommen und für eine Inkubationszeit von 10 Minuten 250 µl 0,2 % Triton X hinzugegeben. Die Antikörper (AK) werden in 5 % normalem Eselserum (NDS) entsprechend der Verdünnungen laut Hersteller-Datenblatt eingesetzt (Tabelle 6), die Lösungen anschließend kurz gemischt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Nach Verstreichen der Zeit wird das Triton X

abgenommen und dieselbe Menge an NDS pro Well hinzugefügt. Es folgt eine Inkubationszeit der Zellen in den Färbelösungen von einer Stunde, in der sich die Primärantikörper an ihr entsprechendes Antigen anlagern. Anschließend werden die überschüssigen nicht angelagerten Antikörper in drei Waschschrritten abgewaschen. Der erste und dritte Waschschrift entsprechen sich und werden mit je 500 µl PBS -/- für je 5 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Dazwischen wird für zwei Minuten bei Raumtemperatur mit PBS +/- gewaschen. Sekundärantikörper werden in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS -/- eingesetzt, kurz gemischt und bei Dunkelheit auf Eis gelagert. Unter Ausschluss von Licht wird die Sekundärantikörperlösung auf den Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut werden die nicht von Primär-AK gebundenen Sekundär-AK abgewaschen. Auf den dritten Waschschrift folgend werden die Deckgläser mit je Well 500 µl dd H₂O gewaschen. Währenddessen wird das Eindeckelmedium mit DAPI auf Objektträger aufgetropft. DAPI durchdringt die Zellmembran und bindet im Zellkern spezifisch an die kleine Furche der DNA. Des Weiteren zeichnet DAPI sich durch blaue Fluoreszenz und Nicht-Färbung des Zytoplasmas aus. Nach Ende des Waschvorgangs werden die Deckgläser fixiert. Die auf dem Objektträger fixierten Deckgläser werden über Nacht bei Dunkelheit getrocknet und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.3 RNA-Analysen

Die Genexpression in Zellen kann über die Analyse der Menge an transkribierter zugehöriger RNA (mRNA) beurteilt werden. Da diese RNA-Mengen meist sehr gering sind, werden sie im Prozess der qRT-PCR in cDNA umgeschrieben, diese in einer PCR vervielfältigt und anschließend detektiert. Hierfür werden zwei verschiedene Geräte benutzt, die beide die Genexpression der Zellen zu bestimmten Zeitpunkten detektieren können, jedoch für unterschiedlich große Probensätze geeignet sind. Der Biomark™ von Fluidigm kann für bis zu 96 Proben verwendet werden, die mit ebenso vielen Gensonden gekoppelt werden können. Dieser wird für RNA-Analysen der olfaktorischen Differenzierung zu mehreren verschiedenen Zeitpunkten benutzt. Das StepOnePlus™ Real-time PCR System ist für kleinere Probensätze

ausgelegt und wird für diejenigen olfaktorischen Differenzierungen verwendet, die eine RNA-Analyse zu nur einem Zeitpunkt erforderten. Im Folgenden sollen die Vorbereitungsschritte für eine qRT-PCR und die zwei verschiedenen Analysemethoden kurz beschrieben werden.

2.2.3.1 Zellpellet-Gewinnung für RNA-Extraktion

Das Nährmedium der Zellen wird entfernt und die Wells mit PBS -/- gewaschen. Im 24-Well-Format werden pro Well 200 µl TrypLE hinzugefügt und für drei Minuten bei 37 °C belassen. Die nun vereinzelteten Zellen werden mit 0,5 - 1 ml DMEM F12 pro Well abgespült, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C für 2 Minuten mit 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellpellets mit 1 ml PBS -/- re-suspendiert und die Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 Minuten bei 2000 rpm und 4 °C wird das PBS vorsichtig abgenommen. Nun können die Tubes in flüssigem Stickstoff gelagert oder direkt mit der RNA-Extraktion fortgefahren werden.

2.2.3.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wird nach Herstellerprotokoll des ExtractME Total RNA Micro Spin Kit (Tabelle 2) durchgeführt. Der darin enthaltene optionale Schritt zur Entfernung von DNA wird nicht durchgeführt. Eluiert wird mit je 10 µl Elution-Buffer REB.

2.2.3.3 qRT-PCR mit StepOnePlus real-time PCR System

Die Detektion der cDNA erfolgt über fluoreszente Moleküle. Da mit jedem Zyklus die cDNA-Menge exponentiell ansteigt, erhöht sich auch die Intensität der Fluoreszenz. Durch einen Vergleich des Fluoreszenzsignals von Genen, die von jeder Zelle exprimiert werden (Housekeeping Gene; HMBS oder GAPDH), und des Fluoreszenzsignals der gewünschten Gene kann eine quantitative Analyse der gewünschten Gene durchgeführt werden. DNA-interkalierende Farbstoffe detektieren die gesamte DNA; da nur der gewünschte RNA-Abschnitt durch die qRT-PCR vervielfältigt wird, stellt dies jedoch kein Problem dar.

Im Ablauf der qRT-PCR werden für 20 bis 40 Zyklen sich wiederholende Temperaturwechsel ausgeführt, wobei jeder Zyklus aus zwei bis drei Temperatur-Stufen besteht und in Denaturierung, Annealing und Elongation eingeteilt wird. Die Höhe der Temperaturen sowie die Haltezeit der einzelnen Stufen sind jeweils abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase und weiteren Inhaltsstoffen des Reaktionsgemisches.

Die qRT-PCR wird nach Herstellerangaben durchgeführt. In den nachfolgenden Tabellen sind jeweils der Mastermix (Tabelle 12) und die PCR-Laufzeiten (Tabelle 13) aufgeführt.

Tabelle 12: Grundvolumina für qRT-PCR-Mastermix

	Menge in μ l
RNAse-freies Wasser	6,8
Primer	2
2x PCR-Mix	10
Polymerase	0,2

Tabelle 13: Zyklusschritte qRT-PCR

Vorgang	Temperatur °C	Haltezeit in sec
Start	50	600
	95	300
Zyklen (Denaturierung, Annealing, Elongation)	95	10
	60	30
Schmelzkurven	60-95	-

2.2.3.4 Fluidigm mit Biomark™

Der Biomark™ verwendet statt eines DNA-interkalierenden Farbstoffes TaqMan-Sonden zur Detektion der cDNA. Die qRT-PCR wird automatisch durchgeführt, vorab muss die Synthese von cDNA nach Herstellerangaben im StepOnePlus aus den Proben erfolgen. Nach Synthese der cDNA wird die Reaktionsplatte nach Herstellerangaben bestückt und die Analyse für je drei biologische und zwei technische Replikate gestartet. Es werden 20 ng RNA pro Probe eingesetzt.

2.2.4 Differenzierungsprotokolle

Im Rahmen der Versuche werden verschiedene olfaktorische Differenzierungsprotokolle mit hiPSZ als Ausgangszellen getestet. Diese sind in ihrer Zusammensetzung in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. An Tag 11 erfolgte jeweils eine Fixierung der Zellen für Immunfluoreszenzfärbung und Gewinnung eines Zellpellets für die RNA-Analysen. Durch Vorarbeiten im Labor ergab sich das Grundprotokoll OPP (**O**lfaktorisches **P**lakoden**p**rotokoll). Darauf aufbauend ergaben sich durch Modifikation weitere Differenzierungsprotokolle. Alle verwendeten Protokolle sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt. Dabei wurden folgende Abkürzungen verwendet:

- OPP Olfaktorisches Plakodenprotokoll
- APP Adhärentes Plakodenprotokoll
- OAPP Olfaktorisches adhärentes Plakodenprotokoll

Tabelle 14: Differenzierungsprotokolle

Name	Tag	Grundmedium	Zusätze
OPP	0-2	100 % KOSR-Medium	-
	3-4		10 ng/ml BMP4 1 µM SB431542
	5-9		25 ng/ml FGF2 2 µM Dorsomorphin 2,8 µM IWR1e
	10-11		25 ng/ml FGF2 100 ng/ml FGF8 2 µM Dorsomorphin
APP1	0	100 % pKOSR-Medium	10 µM SB431542
	1-2	75 % pKOSR-Medium 25 % GM-Medium	10 µM SB431542
	3-4	50 % pKOSR-Medium 50 % GM-Medium	10 µM SB431542
	5-11	25 % pKOSR-Medium 75 % GM-Medium	10 µM SB431542

Material und Methoden

APP2	0	100 % pKOSR-Medium	10 µM SB431542 3 µM Dorsomorphin
	1-2	75 % pKOSR-Medium 25 % GM-Medium	10 µM SB431542 6 µM Dorsomorphin
	3-4	50 % pKOSR-Medium 50 % GM-Medium	10 µM SB431542
	5-11	25 % pKOSR-Medium 75 % GM-Medium	10 µM SB431542
OAPP2	0	100 % pKOSR-Medium	10 µM SB431542 3 µM Dorsomorphin
	1-2	75 % pKOSR-Medium 25 % GM-Medium	10 µM SB431542 6 µM Dorsomorphin
	3-4	50 % pKOSR-Medium 50 % GM-Medium	10 ng/ml BMP4 10 µM SB431542
	5-7	25 % pKOSR-Medium 75 % GM-Medium	25 ng/ml FGF2 2,8 µM IWR1e 10 µM SB431542
	8-11	25 % pKOSR-Medium 75 % GM-Medium	100 ng/µl FGF8 2,8 µM IWR1e 10 µM SB431542
OAPP3	0	100 % pKOSR-Medium	10 ng/ml BMP4 10 µM SB431542
	1	75 % pKOSR-Medium 25 % GM-Medium	10 ng/ml BMP4 10 µM SB431542
	2	75 % pKOSR-Medium 25 % GM-Medium	10 µM SB431542 3 µM Dorsomorphin
	3-4	50 % pKOSR-Medium 50 % GM-Medium	10 µM SB431542 6 µM Dorsomorphin
	5-7	25 % pKOSR-Medium 75 % GM-Medium	25 ng/ml FGF2 2,8 µM IWR1e 10 µM SB431542
	8-11	25 % pKOSR-Medium 75 % GM-Medium	100 ng/µl FGF8 2,8 µM IWR1e 10 µM SB431542

Eine grafische Darstellung der verwendeten Zusätze der verschiedenen Differenzierungsprotokolle zeigt Abbildung 11.

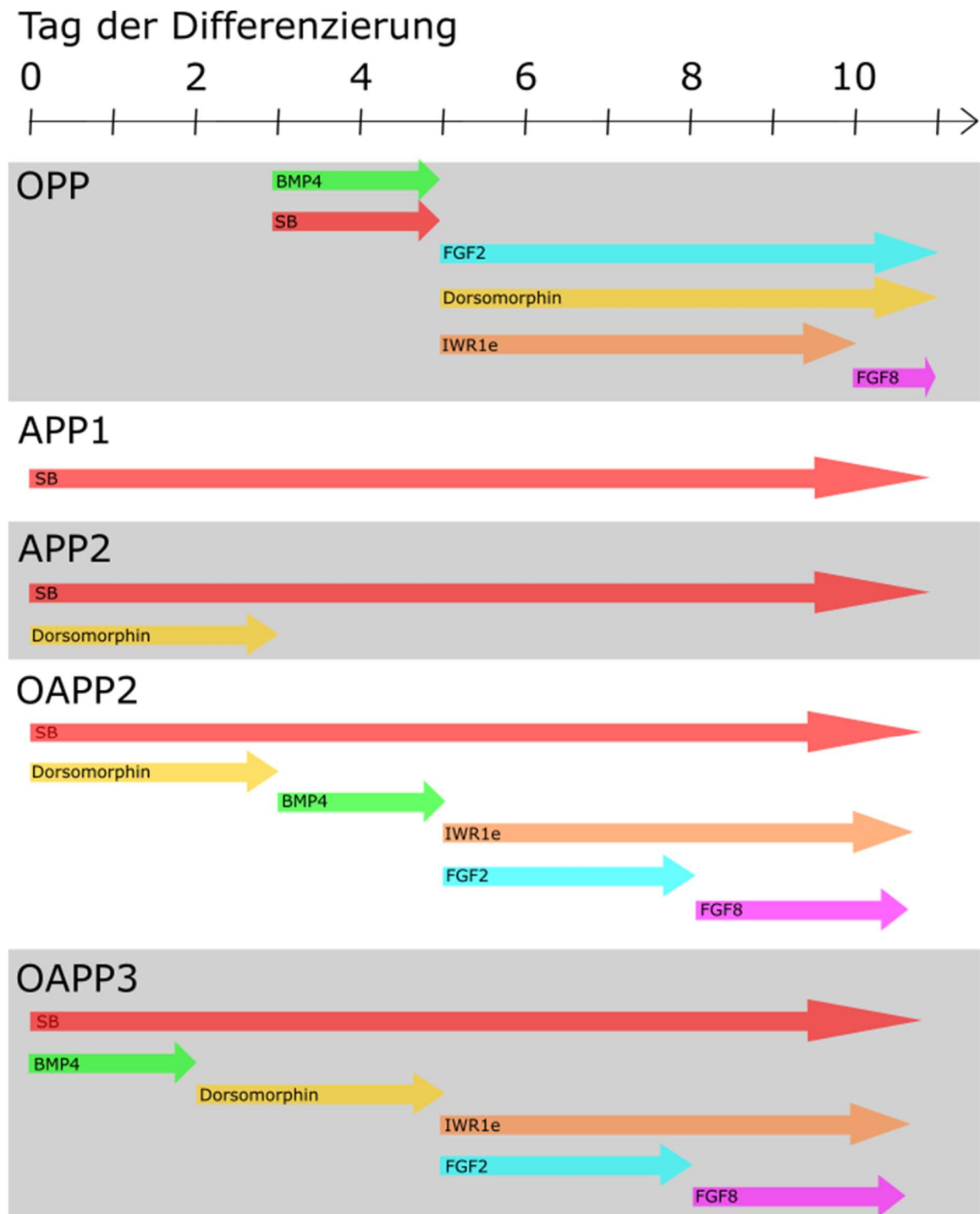


Abbildung 11: Differenzierungsprotokolle und Zusätze

Die Abbildung zeigt die Zusätze und Zugabezeitpunkte der Differenzierungsprotokolle.

2.3 Statistik

Die Anzahl biologischer Replikate bei den RNA-Analysen betrug jeweils drei, während die Anzahl technischer Replikate entweder mit zwei (Fluidigm) oder drei (StepOne Plus) festgelegt war.

Der CT-Wert bezeichnet diejenige Anzahl der Vermehrungszyklen, bei der die Fluoreszenz des erfassten Gens in der qRT-PCR erstmalig das Hintergrundleuchten übersteigt. Die CT-Werte der technischen Replikate pro biologischem Replikat wurden gemittelt (MW CT). Durch Bezug des Mittelwertes auf das jeweilige Housekeeping-Gen wurde pro biologischem Replikat ein ΔCT -Wert ermittelt durch Anwendung folgender Formel:

$$\Delta CT = 2^{-(MW CT_{Gen} - MW CT_{Housekeeping})}$$

Formel 1: Ermittlung ΔCT -Wert

Der ΔCT -Wert stellt die auf das Housekeeping-Gen normalisierten Expressionswerte dar. Die ΔCT -Werte der biologischen Replikate wurden gemittelt. Dadurch ergibt sich der MW ΔCT . Die Standardabweichung der ΔCT -Werte (STAB ΔCT) wurde über die Excel-Funktion *STABW.S* ermittelt. Diese verwendet die nachfolgende Formel:

$$STAB \Delta CT = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

Formel 2: Ermittlung STAB ΔCT -Wert

Dabei bezeichnet n den Stichprobenumfang, x die einzelnen Messwerte und \bar{x} den Stichprobenmittelwert. Durch Anwendung folgender Formel wurde aus STAB ΔCT die Standardabweichung des Mittelwertes der CT-Werte (SEM ΔCT) berechnet:

$$SEM \Delta CT = \frac{STAB \Delta CT}{\sqrt{\text{Anzahl biologischer Replikate}}}$$

Formel 3: Ermittlung SEM ΔCT - Wert

Die Differenz von zwei ΔCT -Werten wird als $\Delta\Delta CT$ -Wert bezeichnet und stellt die Expressionsunterschiede zwischen zwei Konditionen dar. Die $\Delta\Delta CT$ -Werte ergeben sich durch folgende Formel:

$$\Delta\Delta CT = \frac{MW \Delta CT_{Versuchszell}}{MW \Delta CT_{Bezugszellen}}$$

Formel 4: Ermittlung $\Delta\Delta CT$ -Wert

Die Genexpression eines bestimmten Gens wurde vornehmlich in Bezug auf hiPSZ dargestellt. Dazu wurde der $\Delta\Delta CT$ -Wert der hiPSZ auf 1 gesetzt. Die Standardabweichung der $\Delta\Delta CT$ -Werte wurde wie folgt ermittelt:

$$SEM \Delta\Delta CT = \frac{SEM \Delta CT_{Versuchszellen}}{MW \Delta CT_{Versuchszellen}}$$

Formel 5: Ermittlung SEM $\Delta\Delta CT$ -Wert

In den Grafiken werden jeweils MW ΔCT -Werte und SEM ΔCT , oder $\Delta\Delta CT$ -Werte und SEM $\Delta\Delta CT$ dargestellt. Die Signifikanz wurde durch Verwendung eines gepaarten TTESTs mit zweiseitiger Verteilung ermittelt. Als Matrizes wurden die ΔCT -Werte der biologischen Replikate der Versuchszellen und der Bezugszellen verwendet. Die Ergebnisse wurden folgendermaßen eingestuft:

Tabelle 15: Signifikanzen

Wahrscheinlichkeit	Grafische Darstellung	Wertung
$P \leq 0,05$	*	signifikant
$P \leq 0,01$	**	sehr signifikant
$P \leq 0,001$	***	hoch signifikant

3 Ergebnisse

Die Entwicklung des olfaktorischen Epithels *in vivo* erfolgt über die Stadien der PPR und der olfaktorischen Plakode. Als Grundlage für die Erzeugung olfaktorischen Epithels *in vitro* muss somit ein Differenzierungsprotokoll vorliegen, welches in der Erzeugung von PPR und olfaktorischer Plakode aus hiPSZ resultiert. Der folgende Ergebnisteil gliedert sich in drei Abschnitte:

- 1) Charakterisierung hiPSZ
- 2) Analyse Ausgangsprotokoll hinsichtlich olfaktorischer Genexpression
- 3) Analyse optimierter Differenzierungsprotokolle hinsichtlich olfaktorischer Genexpression

3.1 Charakterisierung hiPSZ

hiPSZ wachsen ammenzellenfrei als Kolonien auf mit Matrigel beschichteten Kulturplatten.

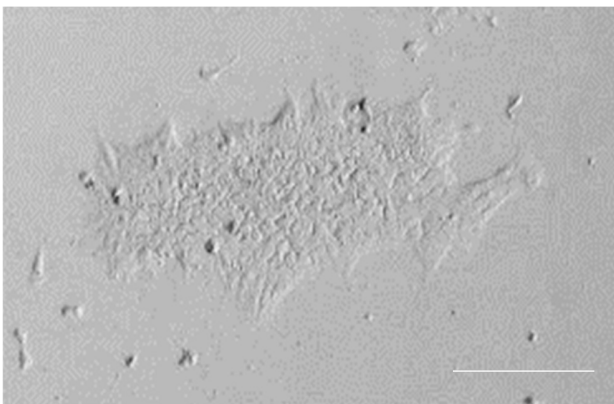


Abbildung 12: hiPSZ-Kolonie

Die Abbildung zeigt eine Stammzell-Kolonie. Der Maßstabsbalken entspricht 250 μm .

Um die Funktionalität der späteren Differenzierungen beurteilen zu können, muss die Expression olfaktorischer Marker in hiPSZ ermittelt werden. Dies erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbungen. Die für die PPR spezifischen und für die Färbung verwendeten Marker waren EYA1, EYA2, SIX1 und SIX4. Die olfaktorische Plakode exprimiert EBF2 und FOXG1. Des Weiteren wurden hiPSZ auf MSX1 als Marker der

neuronalen Grenzzone oder auch Neuralleiste überprüft. Es zeigten sich keinerlei spezifische Färbungen für die verwendeten Marker. Hinsichtlich der getesteten Marker wiesen die hiPSZ demzufolge keine in der Immunfluoreszenzfärbung detektierbare Expression auf.

3.2 Analyse OPP

Durch Vorarbeiten im Labor ergab sich das Differenzierungsprotokoll OPP. Die Genexpression an Tag 8 und 10 der Differenzierung wird im Folgenden für die PPR-Marker *EYA1*, *EYA2* und *SIX1* dargestellt. Wenn im nachfolgenden Ergebnisteil relativierte Genexpressionen normalisiert auf ein Housekeeping-Gen und hiPSZ dargestellt werden, handelt es sich in den Grafiken um die Darstellung von Fold Inductions, das heißt es wird eine quantitative Größenänderung zwischen der Ursprungsexpression in hiPSZ und der gemessenen Expression des jeweiligen Gens dargestellt. Die Genexpression in hiPSZ wurde für die Auswertungen auf 1 gesetzt.

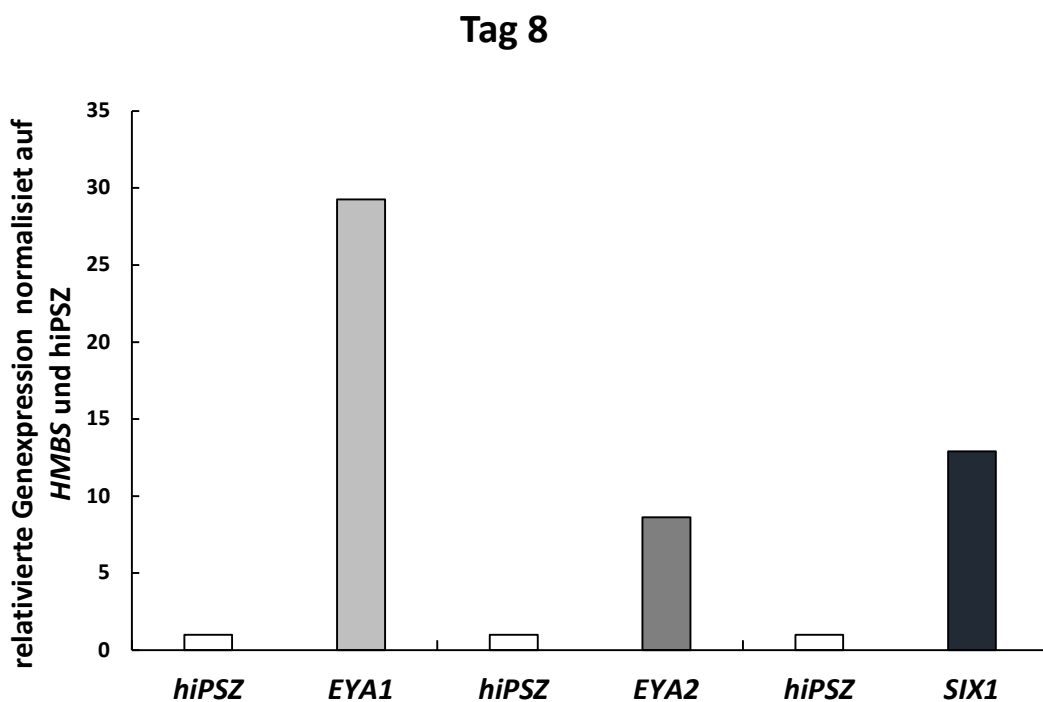


Abbildung 13: Genexpression an Tag 8 der Differenzierung

Ergebnisse

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *EYA1*, *EYA2* und *SIX1* an Tag 8 der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *HMBS* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 3$.

Die Expression aller drei getesteten Gene war höher als in hiPSZ. An Tag 8 der Differenzierung war die *EYA1*-Expression am höchsten, gefolgt von *SIX1* und *EYA2*. Gegenüber hiPSZ war die Expression von *EYA1* an Tag 8 der Differenzierung um den Faktor 29 erhöht. Die Expression von *EYA2* war um das Achtfache und die Expression von *SIX1* um das Zwölffache höher als in hiPSZ.

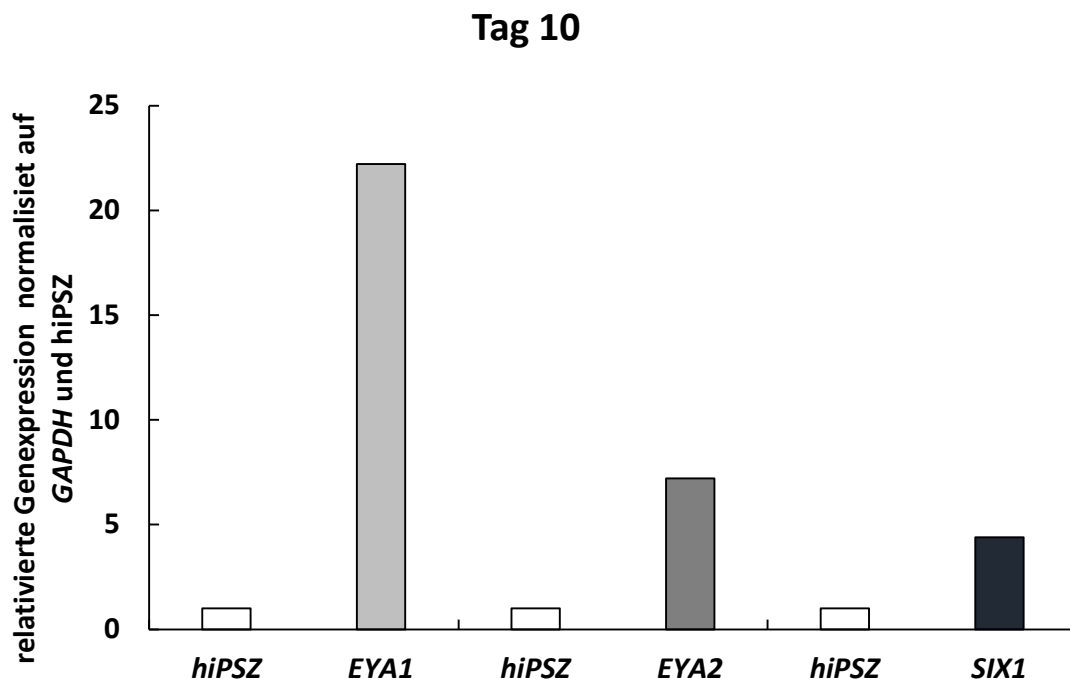


Abbildung 14: Genexpression an Tag 10 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *EYA1*, *EYA2* und *SIX1* an Tag 10 der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 3$.

Anstelle von *HMBS* als Housekeeping-Gen wurde für alle weiteren Analysen *GAPDH* verwendet, da laborinterne Versuche genauere Ergebnisse bei der Verwendung von *GAPDH* zeigten. An Tag 10 der Differenzierung war die Genexpression aller drei getesteten Gene höher als in hiPSZ. Die höchste Expression war erneut

für *EYA1* zu verzeichnen. Sie erreichte ein 22-faches der Expression in hiPSZ. Die Expression von *EYA2* war im Gegensatz zu Tag 8 der Differenzierung größer als von *SIX1*.

Es konnten im Ausgangsprotokoll OPP eine erhöhte Expression der PPR-Marker *EYA1*, *EYA2* und *SIX1* im Vergleich zu hiPSZ festgestellt werden. Das weist darauf hin, dass durch das OPP die Anzahl der PPR-Zellen erhöht werden kann.

3.3 Analyse verschiedener Differenzierungsprotokolle

3.3.1 Vergleich OPP und APP1

Im Folgenden wurde OPP mit dem Differenzierungsprotokoll APP1 (**A**dhärentes **P**lakoden**p**rotokoll **1**) verglichen. Ein Vergleich der Zusätze der Differenzierungsprotokolle zeigt Abbildung 15. Die Differenzierungsprotokolle OPP und APP1 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich Genexpression auf RNA-Ebene analysiert. Ziel war die Überprüfung auf PPR und olfaktorische Plakoden-Marker.

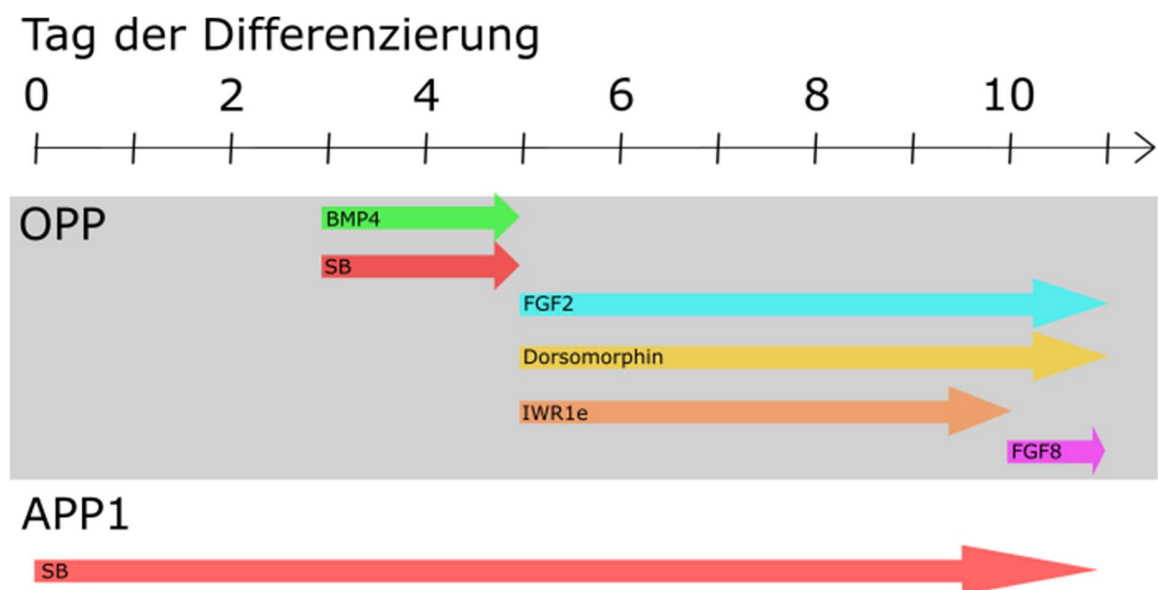


Abbildung 15: Zusätze OPP und APP1 im Vergleich

Die Abbildung zeigt die verwendeten Zusätze der Differenzierungsprotokolle OPP und APP1 im Vergleich.

3.3.1.1 PPR-Marker: OPP vs. APP1

Nachfolgend werden die Ergebnisse für Marker der präplakodalen Region dargestellt.

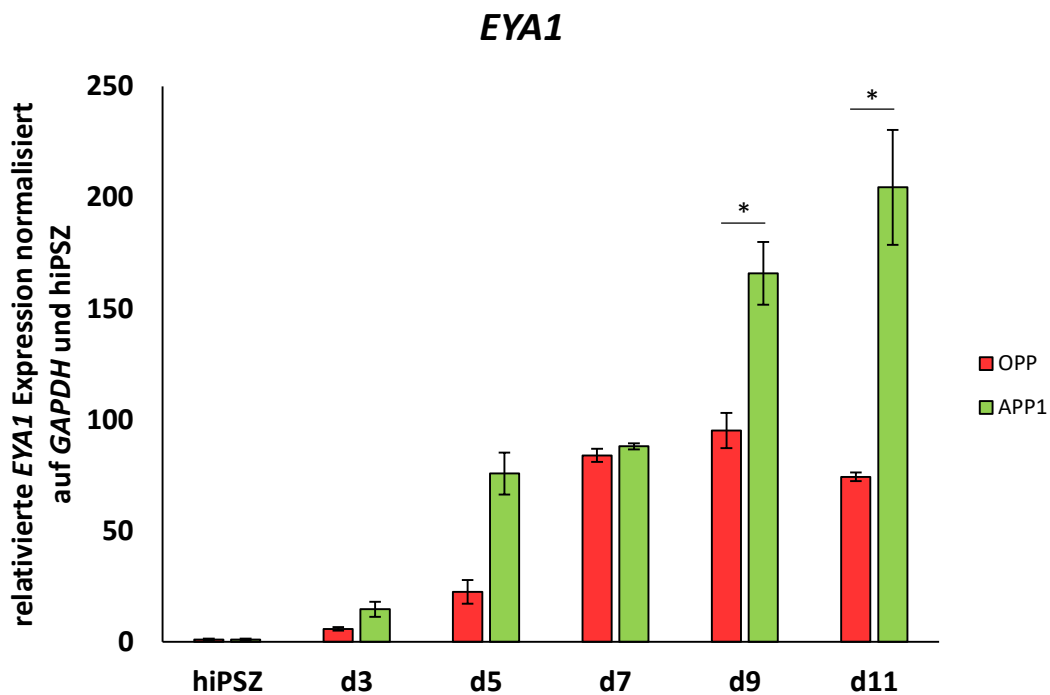


Abbildung 16: *EYA1*-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *EYA1* zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Die *EYA1*-Expression lag zu allen erfassten Zeitpunkten in beiden Differenzierungsprotokollen über hiPSZ-Level. Unter OPP stieg die *EYA1*-Expression bis zu Tag 9 der Differenzierung an. Für das Differenzierungsprotokoll APP1 war ein stetiger Anstieg der Expression bis zu Tag 11 der Differenzierung zu verzeichnen. An den Tagen 9 und 11 war die Expression von *EYA1* in APP1 signifikant höher als in OPP. Für *EYA1* ergab sich eine deutlich höhere Expression in APP1 zu allen erfassten Zeitpunkten als in OPP.

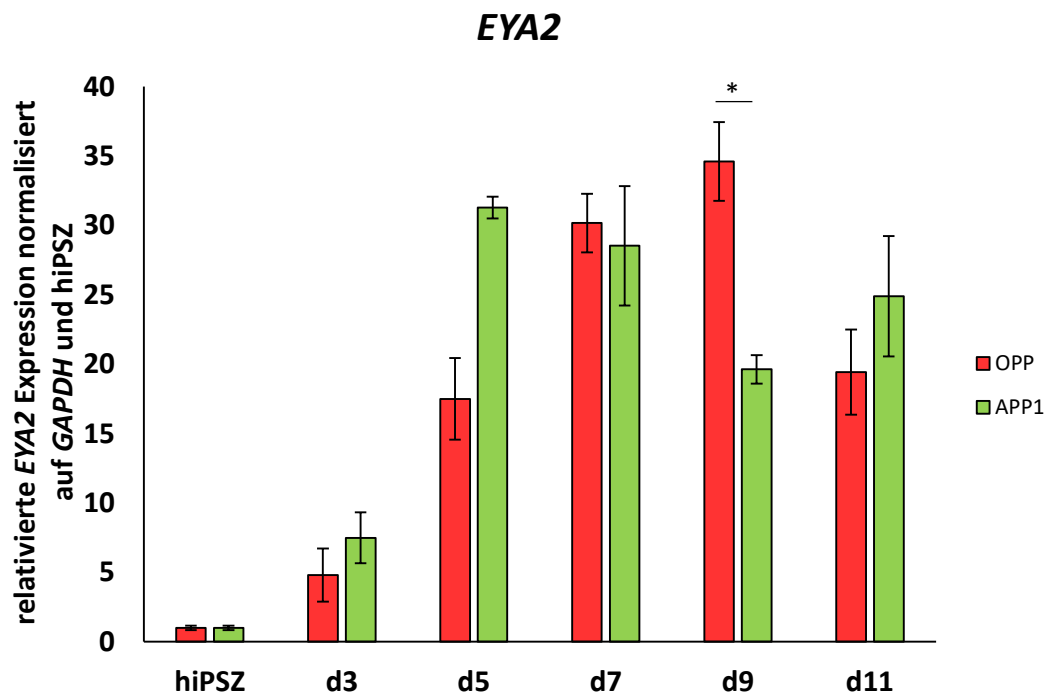


Abbildung 17: EYA2-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *EYA2* zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Die *EYA2*-Expression lag zu allen erfassten Zeitpunkten in beiden Differenzierungsprotokollen über hiPSZ-Level. Unter OPP stieg die Expression bis zu Tag 9 der Differenzierung an. Von Tag 3 zu Tag 5 fand ein deutlicher Anstieg der Genexpression von *EYA2* unter APP1 statt. An Tag 9 der Differenzierung war die Expression unter OPP signifikant höher als in APP1. Für *EYA2* war die Expression im APP1 an den Tagen 3, 5 und 11 tendenziell höher als in OPP.

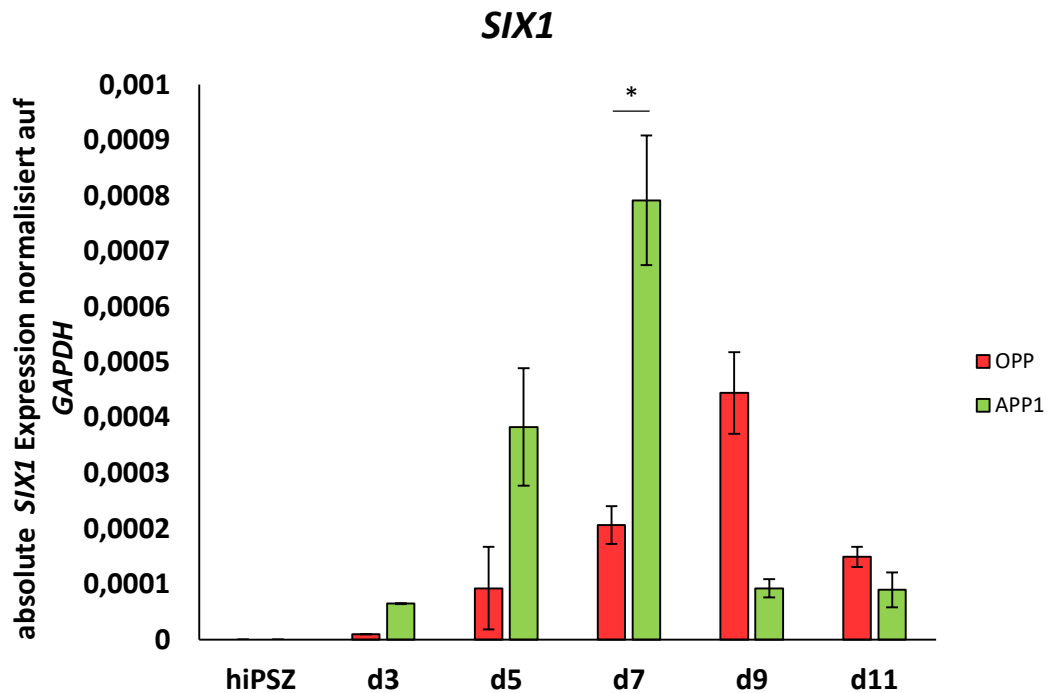


Abbildung 18: *SIX1*-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *SIX1* zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH*. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Für die Auswertung der Genexpression von *SIX1* wurde eine absolute Darstellungsweise gewählt, da die Genexpression in hiPSZ gegen Null ging. Die höchste Expression von *SIX1* war an Tag 7 unter APP1 zu verzeichnen; sie war dort ebenfalls signifikant höher als unter OPP. Die Expression von *SIX1* stieg unter OPP bis zu Tag 9 der Differenzierung an. Unter APP1 war ein Anstieg der Expression bis zu Tag 7 zu beobachten. Betrachtet man *SIX1* als PPR-Marker so war an den Tagen 3, 5 und 7 die Expression in APP1 gegenüber OPP erhöht.

3.3.1.2 Olfaktorische Plakoden-Marker: OPP vs. APP1

SIX1 ist sowohl ein Marker der PPR als auch der olfaktorischen Plakode. An Tag 11 lag die Expression von *SIX1* in OPP und APP1 über hiPSZ-Level, war jedoch geringer als an Tag 7 und Tag 9 der Differenzierung. Die Expression an den Tagen 9 und 11 war höher in OPP als in APP1.

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die Marker der olfaktorischen Plakode dargestellt.

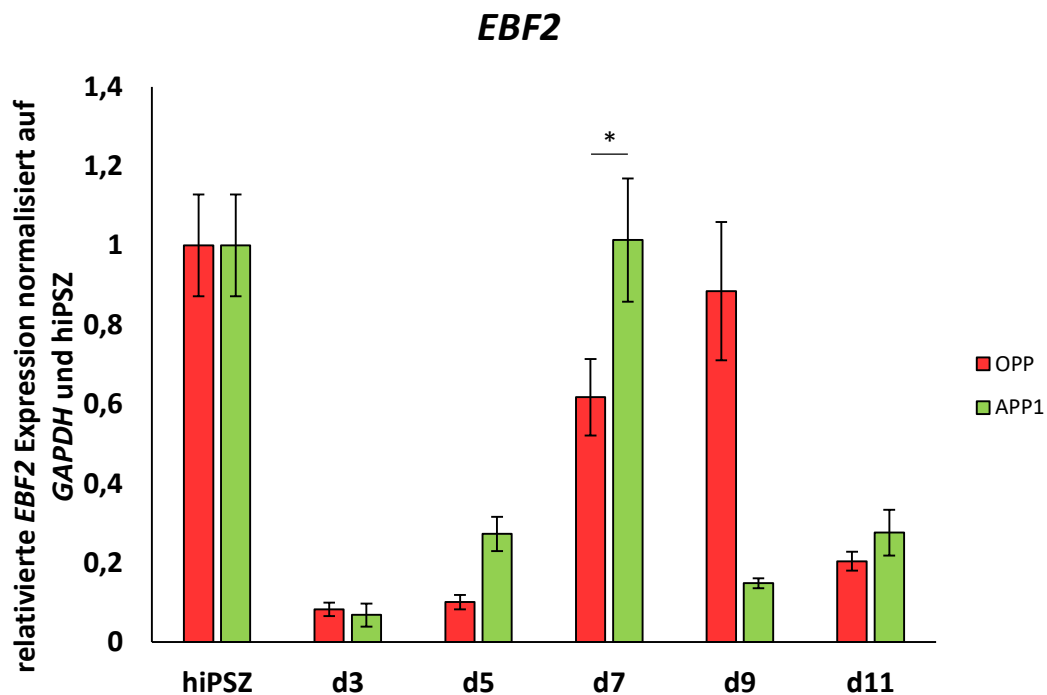


Abbildung 19: *EBF2*-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *EBF2* zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Unter Berücksichtigung der Fehlerbalken blieb die Expression von *EBF2* zu allen erfassten Zeitpunkten unter hiPSZ-Level. Als Ausnahme davon war die Expression

an Tag 7 der Differenzierung unter APP1 zu bemerken; diese lag auf Niveau der hiPSZ. Die Expression von *EBF2* war an Tag 7 unter APP1 signifikant höher als unter OPP. An Tag 9 ragte die Expression von *EBF2* in OPP gegenüber dem Differenzierungsprotokoll APP1 heraus.

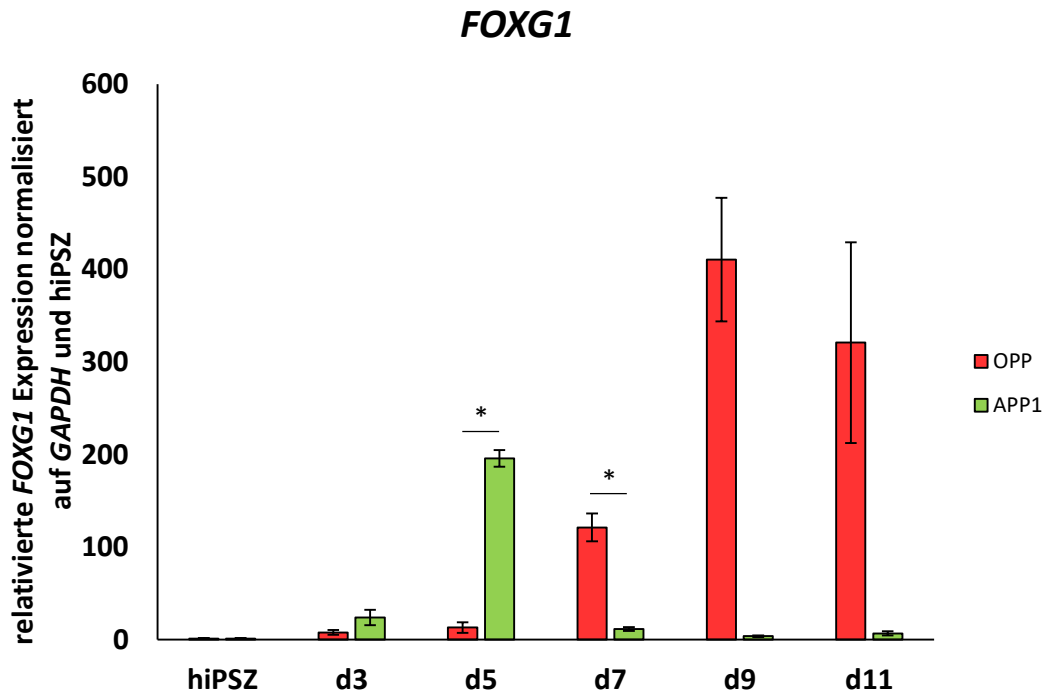


Abbildung 20: *FOXG1*-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *FOXG1* zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Die Expression von *FOXG1* lag zu allen erfassten Zeitpunkten unter beiden Differenzierungsprotokollen über hiPSZ-Level. Die höchste Expression war an Tag 9 der Differenzierung unter OPP zu verzeichnen. Die Expression unter APP1 war an Tag 5 maximal. An Tag 5 war die Expression unter APP1 signifikant höher als unter OPP. An Tag 7 war die Expression unter OPP signifikant höher als unter APP1. Für *FOXG1* war die Expression plakodaler Marker in OPP an den Tagen 7, 9 und 11 größer als in APP1.

3.3.1.3 Zusammenfassung

Beim Vergleich der Ergebnisse der RNA-Analysen für die Differenzierungsprotokolle OPP und APP1 zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung fiel auf, dass das Differenzierungsprotokoll APP1 bei Betrachtung der Marker für die PPR dem Differenzierungsprotokoll OPP überlegen war.

Das Differenzierungsprotokoll OPP war bei späteren Zeitpunkten zu denen die olfaktorische Plakode zu erwarten ist, den Ergebnissen des Differenzierungsprotokolls APP1 überlegen.

Eine Zusammenfassung der Genexpression verschiedener Gene im Vergleich der Differenzierungsprotokolle zeigt Tabelle 16.

Tabelle 16: Vergleich OPP und APP1

	<i>EYA1</i>		<i>EYA2</i>		<i>SIX1</i>		<i>EBF2</i>		<i>FOXG1</i>	
	OPP	APP1	OPP	APP1	OPP	APP1	OPP	APP1	OPP	APP1
	Tag 3		■		■		■	■		
Tag 5		■		■		■		■		■
Tag 7		■	■			■		■	■	
Tag 9		■	■		■		■		■	
Tag 11		■		■	■			■	■	

Die Tabelle zeigt die höhere Expression des jeweiligen Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt der Differenzierung. Die höhere Expression am jeweiligen Tag ist in der Tabelle durch ■ markiert.

Die Entwicklung zur PPR wurde durch das Differenzierungsprotokoll APP1 gefördert. Die Entwicklung zur olfaktorischen Plakode wurde durch OPP besser als durch APP1 gefördert. Da die Entwicklung der PPR durch APP1 gefördert wurde, die Expression olfaktorischer Plakoden-Marker allerdings hinter OPP zurückblieb, wurde im nächsten Schritt eine Abwandlung des Protokolls APP1 untersucht, welche bei Untersuchungen gegenüber APP1 eine erhöhte *SIX1*-Expression aufwies. Diese

Modifikation wurde als APP2 (**A**dhärentes **P**lakoden**p**rotokoll 2) bezeichnet. Im Vergleich zu APP1 wurde bei APP2 bis zu Tag 2 der Differenzierung Dorsomorphin hinzugegeben (Abbildung 21).

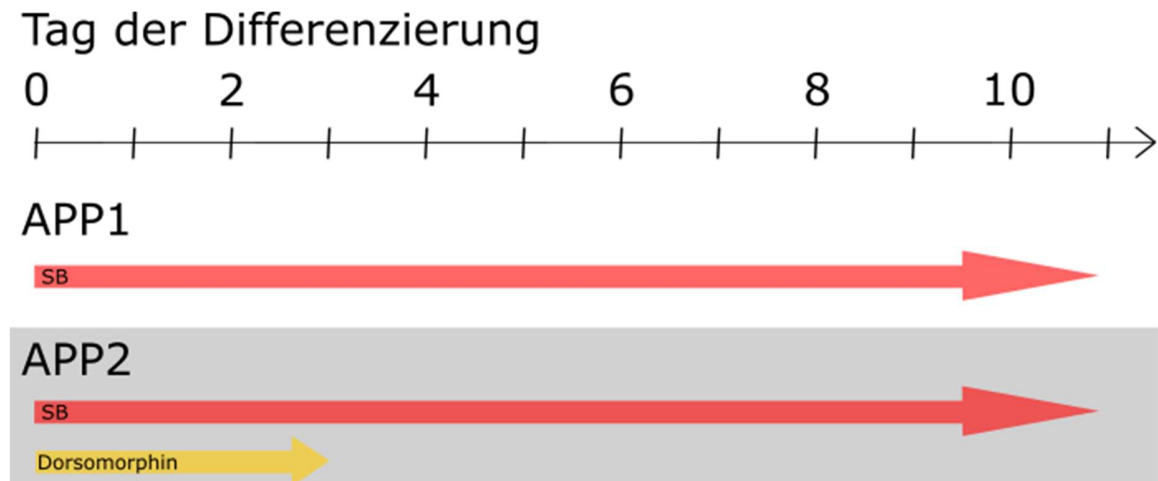


Abbildung 21: Zusätze APP1 und APP2 im Vergleich

Die Abbildung zeigt die Zusätze der Differenzierungsprotokolle APP1 und APP2 im Vergleich.

3.3.2 Vergleich OPP, APP1 und APP2

Die Differenzierungsprotokolle OPP, APP1 und APP2 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich Genexpression auf RNA-Ebene analysiert. Ziel war die Überprüfung auf PPR und olfaktorische Plakoden-Marker.

3.3.2.1 PPR-Marker: OPP vs. APP1 vs. APP2

Nachfolgend werden die RNA-Ergebnisse der PPR-Marker *EYA1*, *EYA2* und *SIX1* für die Differenzierungsprotokolle OPP, APP1 und APP2 an den Tagen 7 und 11 der Differenzierung dargestellt. Diese wurden jeweils als Zeitpunkt für das Auftreten der PPR und olfaktorischen Plakode definiert, wobei die Grenzen fließend sind.

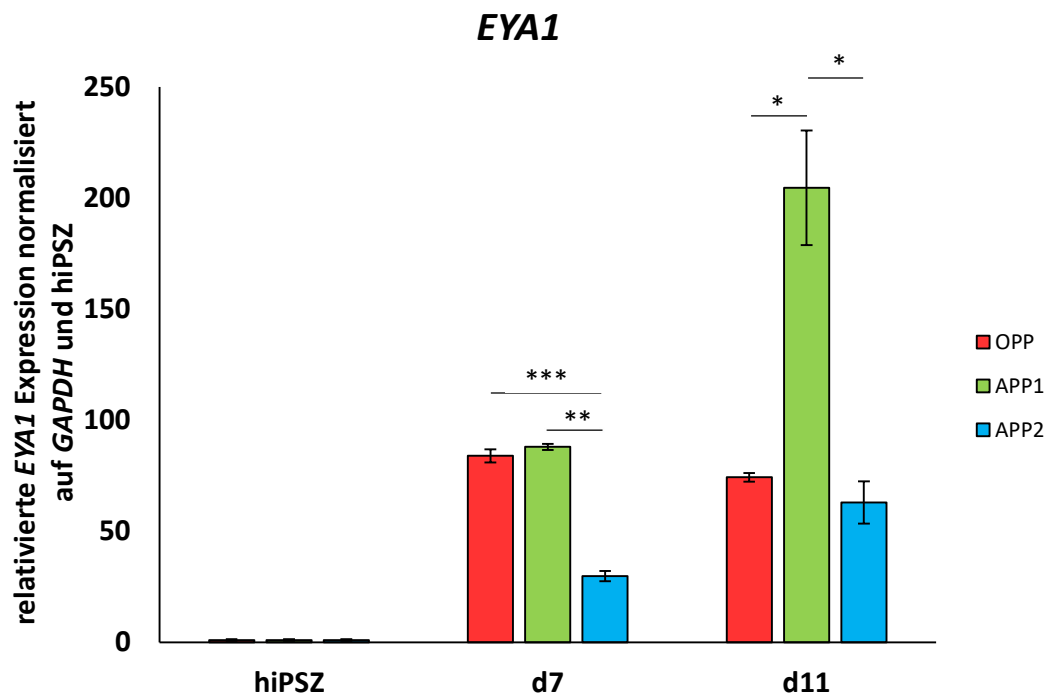


Abbildung 22: *EYA1*-Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *EYA1* zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Die Expression von *EYA1* lag zu allen erfassten Zeitpunkten bei allen Differenzierungsprotokollen über hiPSZ-Level. An Tag 7 der Differenzierung war die Expression unter APP2 am geringsten. OPP und APP1 wiesen an Tag 7 eine ähnlich hohe Expression auf; diese war jeweils signifikant höher als in APP2. An Tag 11 der Differenzierung war unter APP1 die höchste *EYA1*-Expression zu verzeichnen. OPP

und APP2 wiesen eine ähnlich hohe Expression auf; die Expression von APP1 war an Tag 11 jeweils signifikant höher als in OPP und APP2 (Abbildung 22).

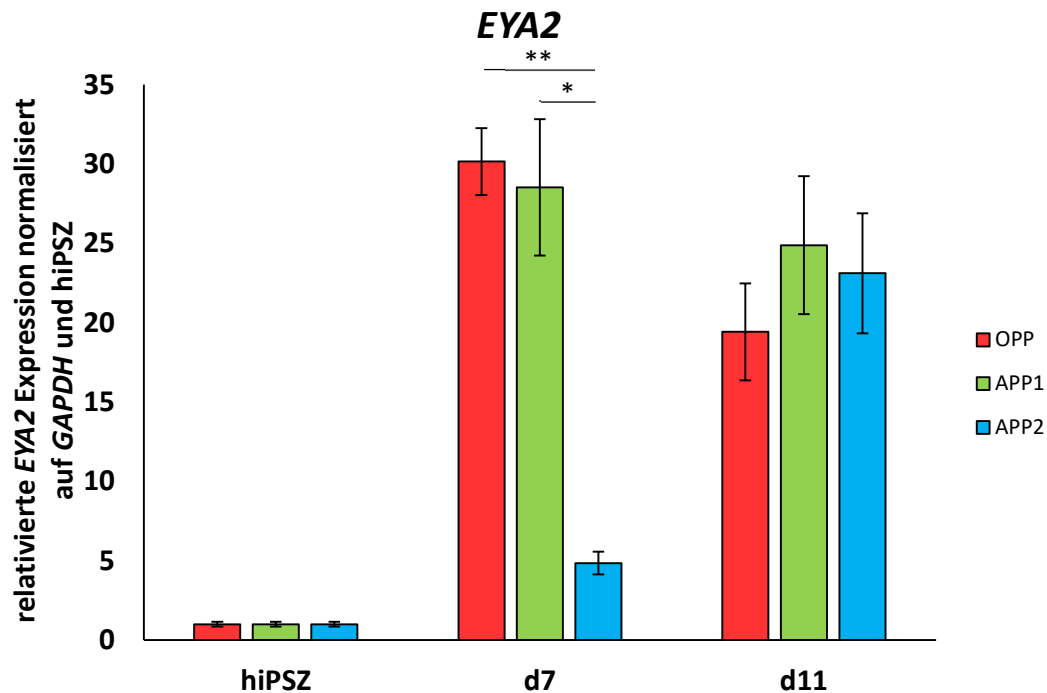


Abbildung 23: EYA2-Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *EYA2* zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Die Expression von *EYA2* lag zu allen erfassten Zeitpunkten über hiPSZ-Level. Die geringste Expression war an Tag 7 unter APP2 zu beobachten. Die Expressionen unter OPP und APP1 waren an Tag 7 jeweils signifikant höher als unter APP2 (Abbildung 23).

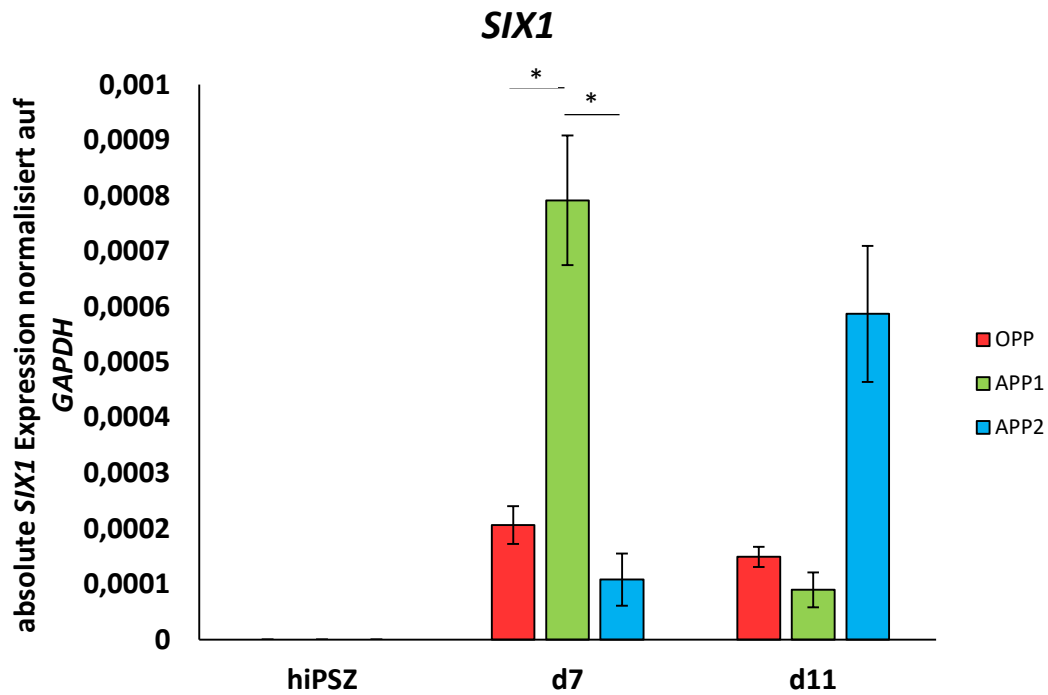


Abbildung 24: *SIX1*-Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *SIX1* zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

An Tag 7 der Differenzierung war die Expression unter APP2 am geringsten. APP1 wies die höchste *SIX1*-Expression an Tag 7 auf; diese war jeweils signifikant höher als in OPP und APP2 (Abbildung 24).

3.3.2.2 Olfaktorische Plakoden-Marker: OPP vs. APP1 vs. APP2

Bei Betrachtung von *SIX1* als plakodalem Marker an Tag 11 der Differenzierung war die die höchste Expression unter APP2 zu beobachten. APP1 wies an Tag 11 die geringste Expression von *SIX1* auf (Abbildung 24).

Im Anschluss werden die Ergebnisse für die Marker der olfaktorischen Plakode dargestellt.

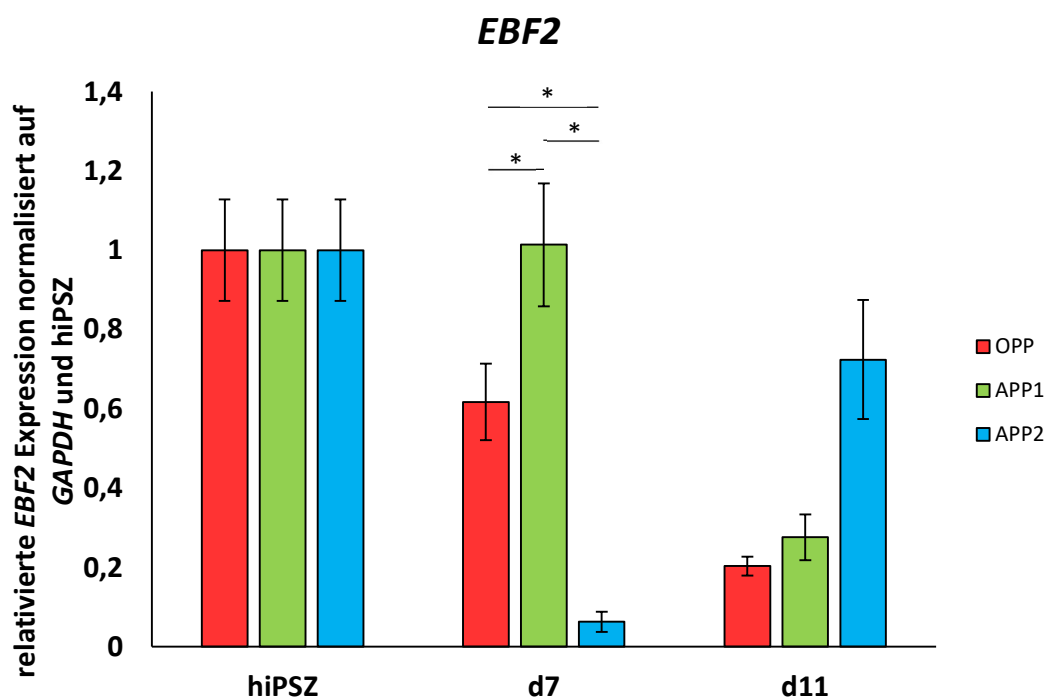


Abbildung 25: *EBF2*-Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *EBF2* zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Die Expression von *EBF2* lag zu allen erfassten Zeitpunkten und allen Differenzierungsprotokollen unter hiPSZ-Level. Ausnahme davon war Tag 7 der Differenzierung unter APP1; die Expression konnte ebenbürtig mit hiPSZ-Level angesehen werden. Dabei war die Expression unter APP1 an Tag 7 der Differenzierung jeweils signifikant höher als unter OPP und APP2. Weiterhin war die Expression von OPP

an Tag 7 signifikant höher als unter APP2. An Tag 11 der Differenzierung konnte unter APP2 die höchste *EBF2*-Expression detektiert werden (Abbildung 25).

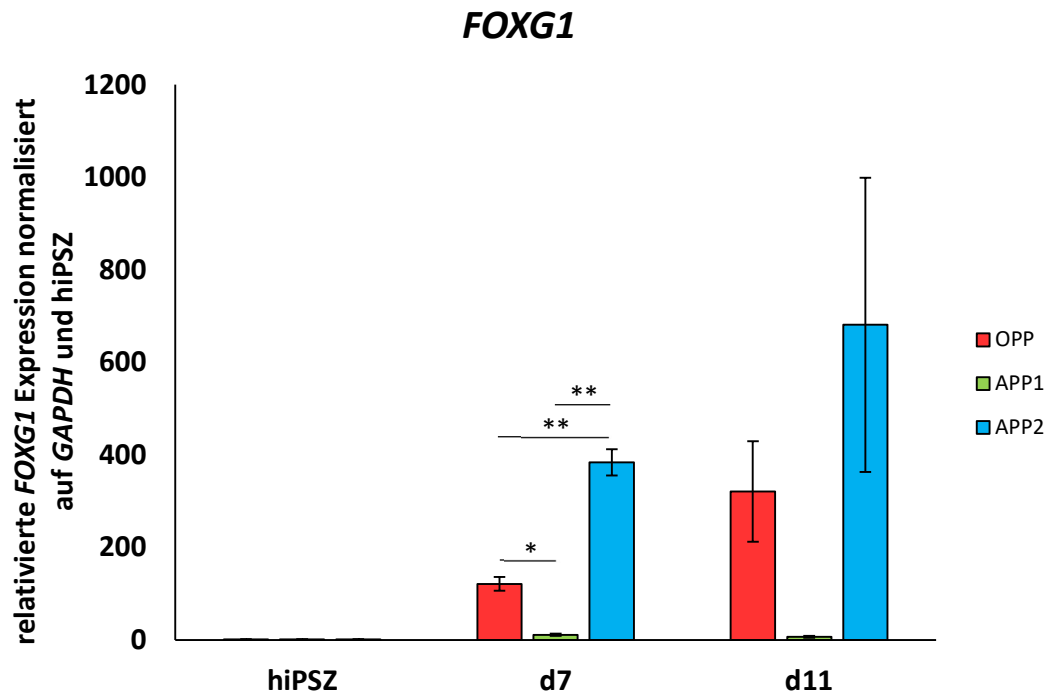


Abbildung 26: *FOXG1*-Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *FOXG1* zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Die Expression von *FOXG1* liegt unter allen Differenzierungsprotokollen an Tag 7 und Tag 11 über hiPSZ-Level. Die geringste Expression weist sowohl an Tag 7 als auch an Tag 11 APP1 auf, gefolgt von OPP. Die höchste Expression war unter APP2 zu erfassen. An Tag 7 der Differenzierung ist die Expression unter APP2 jeweils signifikant höher als unter OPP und APP1; unter OPP ist die Expression signifikant größer als unter APP1 (Abbildung 26).

3.3.2.3 Zusammenfassung

Bei Betrachtung der Daten an Tag 7 der Differenzierung fiel die Expression aller PPR-Marker in APP2 geringer aus als in OPP und APP1. Bei Betrachtung der Expression plakodaler Marker in APP2 an Tag 11 war deren Expression höher als in den Differenzierungsprotokollen OPP und APP1. Das Differenzierungsprotokoll APP2 war zur Förderung der PPR weniger gut geeignet als die Differenzierungsprotokolle OPP und APP. Zur Förderung der olfaktorischen Plakode war das Differenzierungsprotokoll APP2 im Vergleich mit OPP und APP1 am besten geeignet. Eine Zusammenfassung der Genexpression aller drei Differenzierungsprotokolle im Vergleich zeigt Tabelle 17.

Tabelle 17: Vergleich OPP – APP1 – APP2

	<i>EYA1</i>		<i>EYA2</i>		<i>SIX1</i>		<i>EBF2</i>		<i>FOXG1</i>	
	Tag 7	Tag 11	Tag 7	Tag 11	Tag 7	Tag 11	Tag 7	Tag 11	Tag 7	Tag 11
OPP			■							
APP1	■	■		■	■		■			
APP2						■		■	■	■

Die Tabelle zeigt die höchste Expression des jeweiligen Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt der Differenzierung. Die höchste Expression am jeweiligen Tag ist in der Tabelle durch ■ markiert.

Da OPP in vorigen Versuchen gute Ergebnisse zur Entwicklung in Richtung der olfaktorischen Plakode zeigte, wurde ein neues Differenzierungsprotokoll erstellt, welches eine Kombination der Differenzierungsprotokolle OPP und APP2 darstellt. Diese Kombination wurde als OAPP2 (**O**lfaktorisches **a**dhärentes **P**lakoden**p**rotokoll **2**) bezeichnet. Die in APP2 verwendeten Zusätze Dorsomorphin und SB wurden als Zusätze zum Differenzierungsprotokoll OPP hinzugefügt; hierdurch ergab sich das Differenzierungsprotokoll OAPP2 (Abbildung 27).

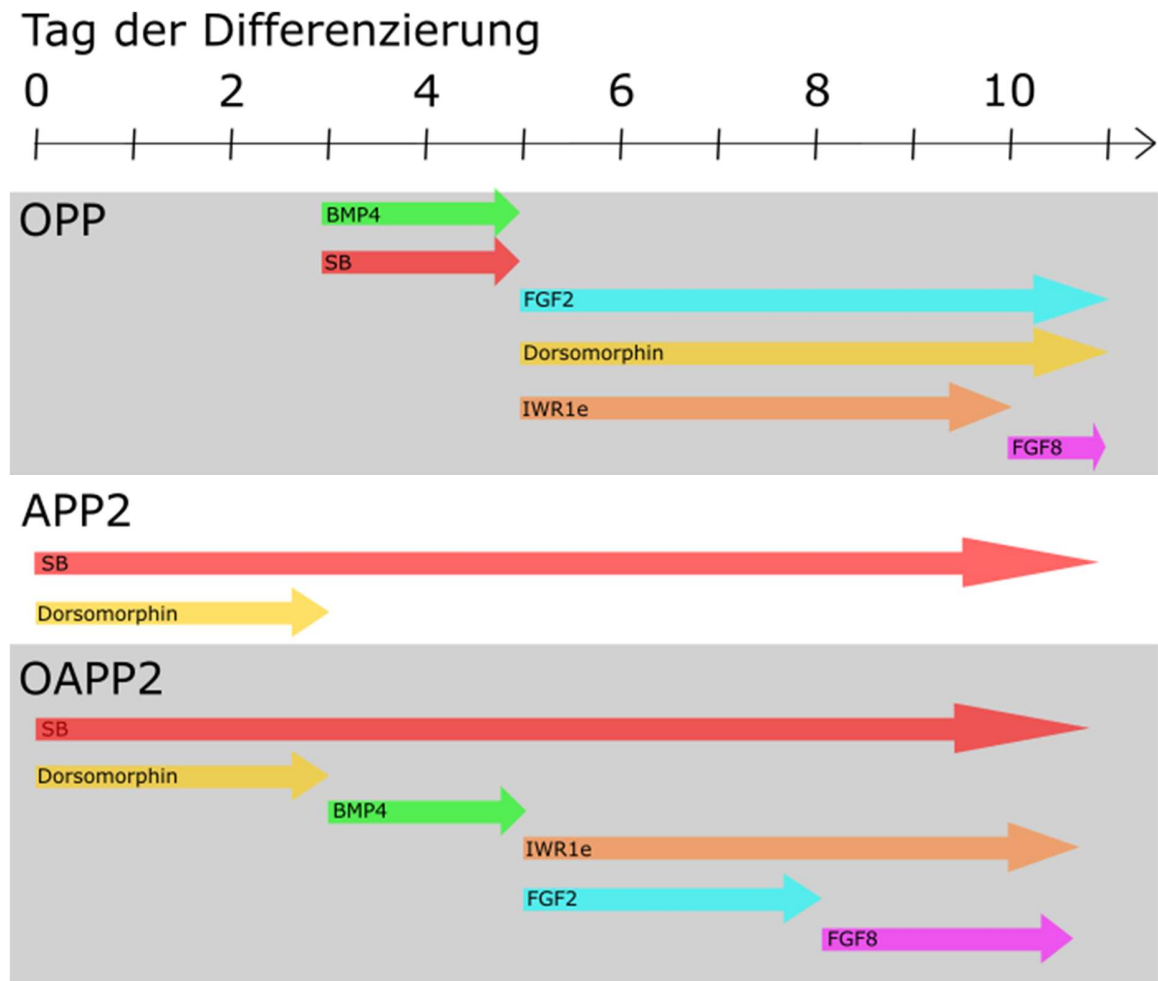


Abbildung 27: Zusätze OPP, APP2 und OAPP2 im Vergleich

Die Abbildung zeigt die Zusätze der Differenzierungsprotokolle OPP, APP2 und OAPP2 im Vergleich.

3.3.3 Vergleich OPP, APP2 und OAPP2

Durch Kombination der Differenzierungsprotokolle OPP und APP2 ergab sich das Differenzierungsprotokoll OAPP2. Dadurch sollten die positiven Ergebnisse vorausgehender Versuche in einem Protokoll vereint werden. Die Differenzierungsprotokolle OPP, APP2 und OAPP2 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich Genexpression auf RNA-Ebene analysiert. Ziel war die Überprüfung auf PPR und olfaktorische Plakoden-Marker. Vorausgehende Ergebnisse erzielten an Tag 7 der Differenzierung hinsichtlich der Expression von PPR-Genen gute Ergebnisse. An Tag 11 der Differenzierung war die Genexpression plakodaler Gene positiv zu bewerten. Für den Differenzierungsstatus der PPR werden im Folgenden die Datensätze an Tag 7 der Differenzierung repräsentativ betrachtet. Die olfaktorische Plakode wird durch die RNA-Ergebnisse an Tag 11 der Differenzierung dargestellt.

3.3.3.1 PPR-Marker: OPP vs. APP2 vs. OAPP2

Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse der RNA-Analysen für die Differenzierungsprotokolle OPP, APP2 und OAPP2 dargestellt.

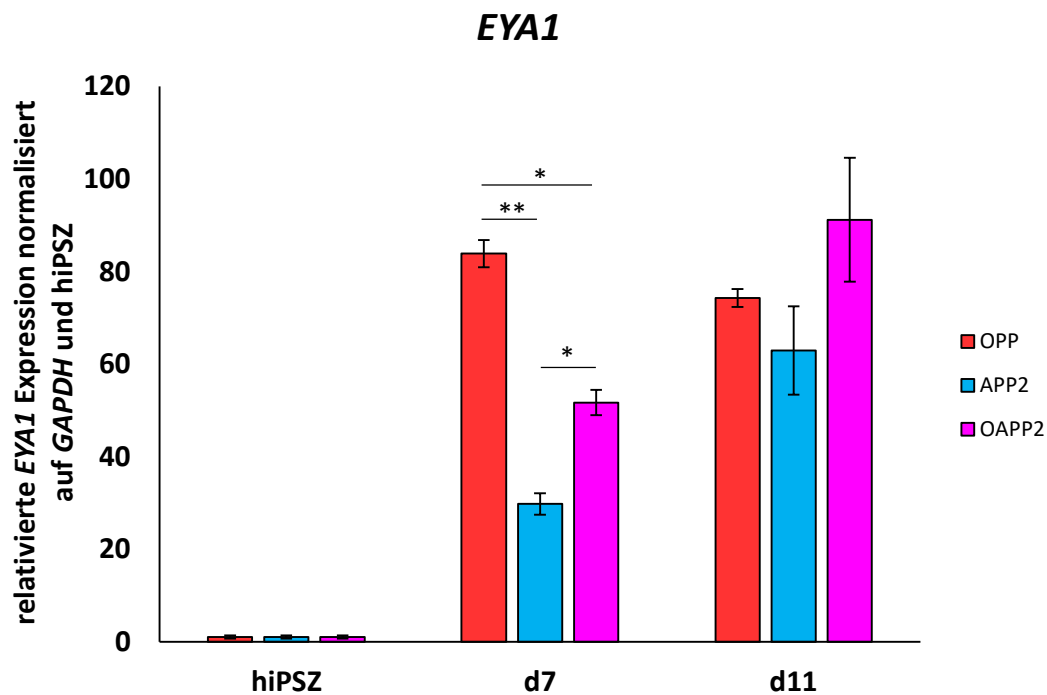


Abbildung 28: *EYA1*-Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *EYA1* zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Die *EYA1*-Expression lag an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung unter allen Differenzierungsprotokollen über hiPSZ-Level. An Tag 7 der Differenzierung konnte unter OPP die höchste Expression nachgewiesen werden. Die geringste Expression wies APP2 auf. An Tag 11 der Differenzierung zeigte sich unter OAPP2 die höchste Expression, gefolgt von OPP und APP2. Die Expression von *EYA1* unter OPP an Tag 7 der Differenzierung war jeweils signifikant höher als unter APP2 und OAPP2. Die Expression von *EYA1* unter OAPP2 an Tag 7 war signifikant höher als unter APP2 (Abbildung 28).

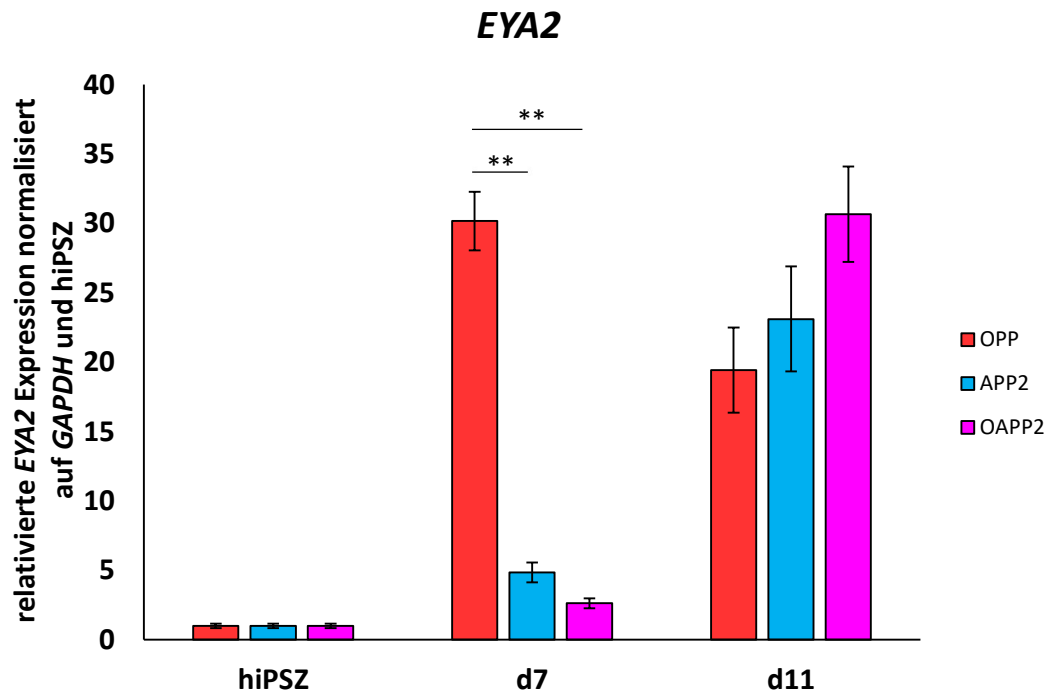


Abbildung 29: EYA2-Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von EYA2 zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit GAPDH und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Die Expression von EYA2 lag zu allen erfassten Zeitpunkten unter allen drei Differenzierungsprotokollen über hiPSZ-Level. Während die Expression von Tag 7 zu Tag 11 unter APP2 und OAPP2 anstieg, war für OPP ein Abfall zu verzeichnen. Die höchsten Expressionen fanden sich unter OPP an Tag 7 und unter OAPP2 an Tag 11 der Differenzierung. An Tag 7 war die Expression unter OPP signifikant höher als unter APP2 und OAPP2 (Abbildung 29).

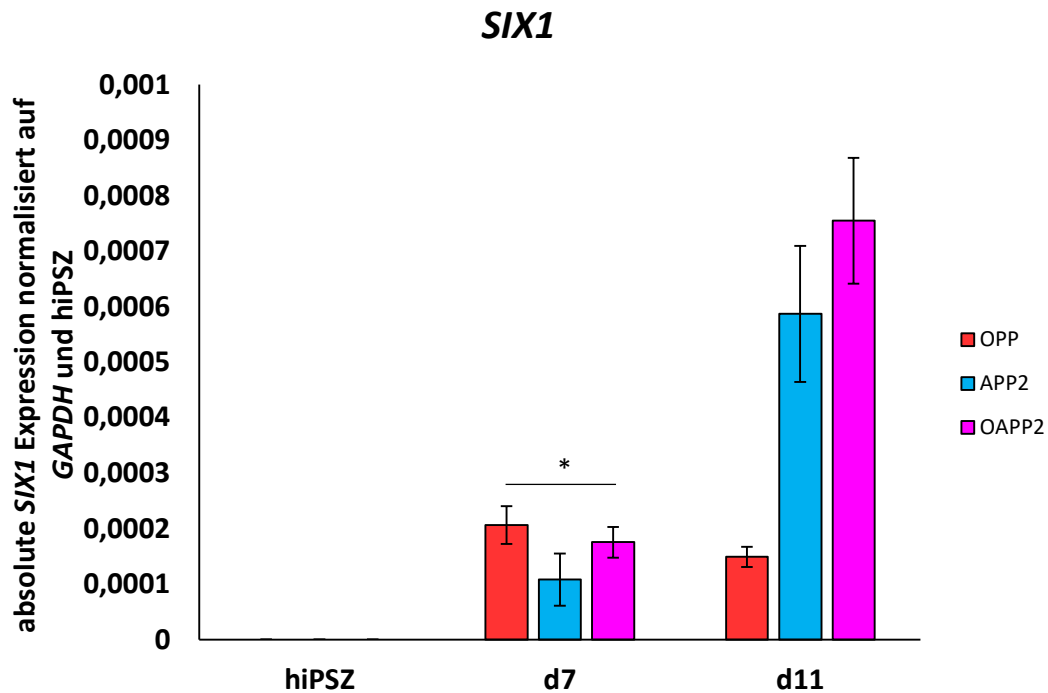


Abbildung 30: *SIX1*-Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *SIX1* zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

An Tag 7 der Differenzierung war die höchste *SIX1*-Expression unter OPP zu verzeichnen; diese war signifikant höher als unter OAPP2. Die geringste Expression an Tag 7 konnte unter APP2 vermerkt werden (Abbildung 30).

3.3.3.2 Olfaktorische Plakoden-Marker: OPP vs. APP2 vs. OAPP2

Für *SIX1* als plakodalen Marker konnte die geringste Expression unter OPP detektiert werden. Die höchste Expression wurde unter OAPP2 an Tag 11 nachgewiesen (Abbildung 30).

Die RNA-Analyse der Marker für die olfaktorische Plakode ergab die nachfolgend dargestellten Ergebnisse.

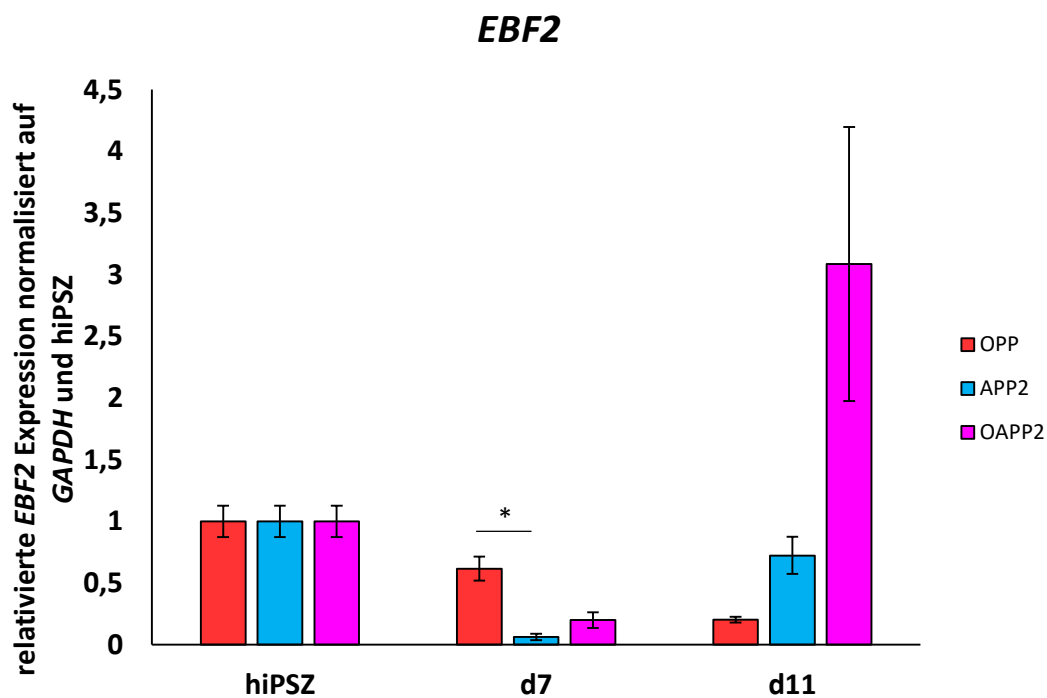


Abbildung 31: *EBF2*-Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *EBF2* zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Die höchste *EBF2*-Expression konnte an Tag 11 der Differenzierung unter OAPP2 detektiert werden. Sie stellte erstmalig eine Expression dar, welche über hiPSZ-Level lag. Die Expression unter APP2 und OAPP2 stieg von Tag 7 auf Tag 11 an; für OPP wurde ein Abfall für dieselben Zeitpunkte verzeichnet. An Tag 7 war die Expression unter OPP signifikant größer als unter APP2 (Abbildung 31).

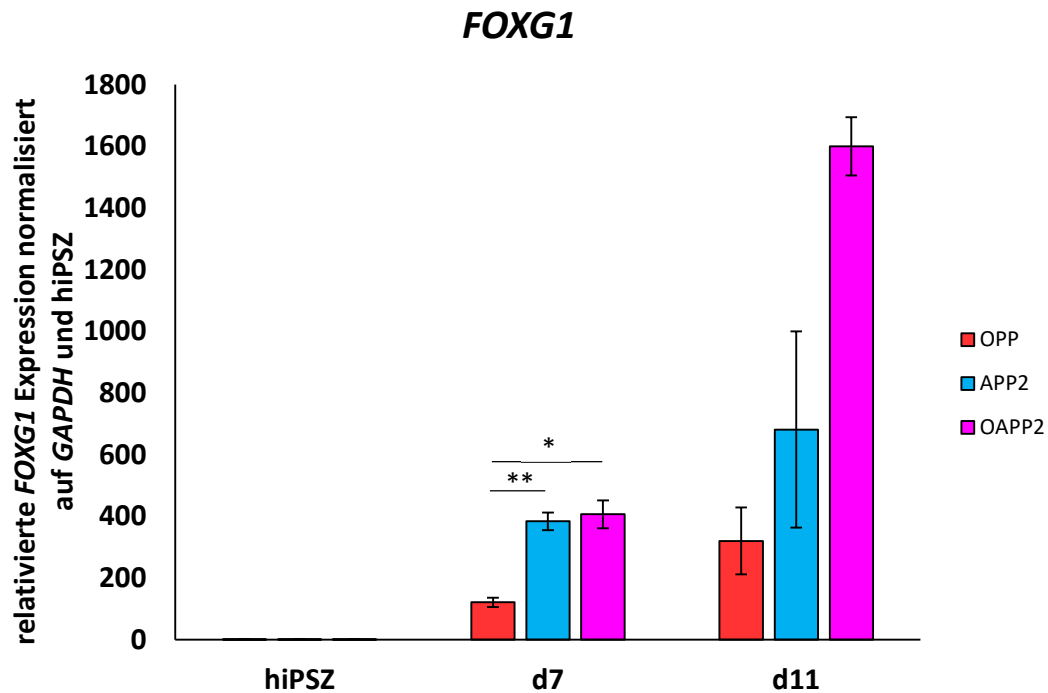


Abbildung 32: FOXG1-Expression an Tag 7 und Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von FOXG1 zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit GAPDH und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 2$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

An Tag 7 und 11 wurden unter OAPP2 jeweils die höchsten FOXG1-Expressionen verzeichnet. Unter OPP wurden jeweils die geringsten Expressionen vermerkt. Die Expressionen unter APP2 und OAPP2 an Tag 7 der Differenzierung waren jeweils signifikant höher als unter OPP (Abbildung 32).

3.3.3.3 Zusammenfassung

Hinsichtlich der Expression sowohl präplakodaler als auch olfaktorischer plakodaler Marker wies das Differenzierungsprotokoll OAPP2 an Tag 11 der Differenzierung die besten Ergebnisse auf. An Tag 7 der Differenzierung waren die Ergebnisse von OAPP2 den Differenzierungsprotokollen OPP und APP2 bei Betrachtung präplakodaler Marker unterlegen. Eine Zusammenfassung des Vergleichs der Differenzierungsprotokolle OPP, APP2 und OAPP2 wird in Tabelle 18 dargestellt. Tag 11 der Differenzierung wurde als repräsentativ für das Stadium der olfaktorischen Plakode bestimmt. Das Differenzierungsprotokoll OAPP2 war zur Förderung der Entwicklung der olfaktorischen Plakode sehr gut geeignet.

Tabelle 18: Vergleich OPP – APP2 – OAPP2

	<i>EYA1</i>		<i>EYA2</i>		<i>SIX1</i>		<i>EBF2</i>		<i>FOXG1</i>	
	Tag 7	Tag 11	Tag 7	Tag 11	Tag 7	Tag 11	Tag 7	Tag 11	Tag 7	Tag 11
	OPP	■		■		■		■		
APP2										
OAPP2		■		■		■		■	■	■

Die Tabelle zeigt die höchste Expression des jeweiligen Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt der Differenzierung. Die höchste Expression am jeweiligen Tag ist in der Tabelle durch ■ markiert.

Im nächsten Schritt wurde OAPP2 mit dem Differenzierungsprotokoll OAPP3 verglichen, welches sich in der Zugabereihenfolge der Zusätze Dorsomorphin und BMP4 von OAPP2 unterschied (Abbildung 33). Es sollte ermittelt werden, ob ein Unterschied zwischen den durch vorige Versuche entstandenen OAPP2 und OAPP3 vorlag.

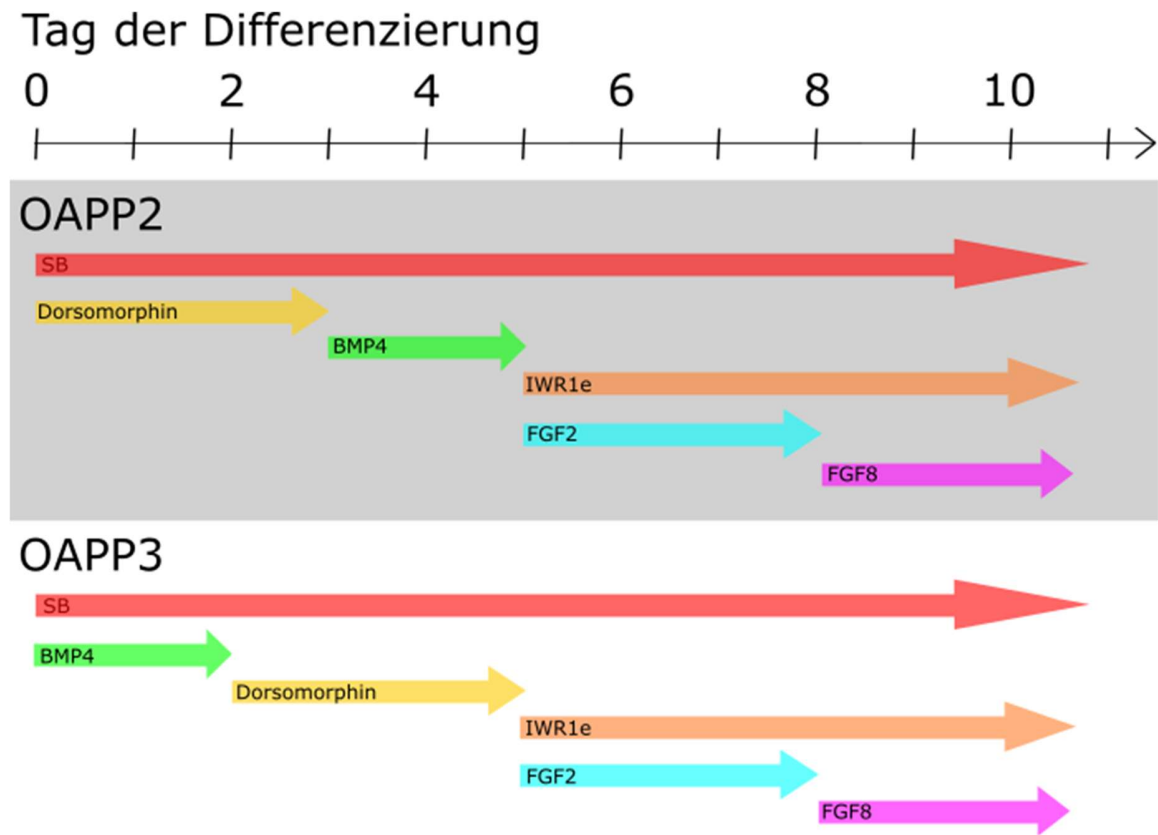


Abbildung 33: Zusätze OAPP2 und OAPP3 im Vergleich

Die Abbildung zeigt die Zusätze der Differenzierungsprotokolle OAPP2 und OAPP3 im Vergleich.

3.3.4 Vergleich OAPP2 und OAPP3

Die Differenzierungsprotokolle OAPP2 und OAPP3 wurden zum Zeitpunkt der olfaktorischen Plakode an Tag 11 der Differenzierung hinsichtlich Genexpression auf RNA-Ebene analysiert. Ziel war die Überprüfung auf PPR, olfaktorische Plakoden-Marker und Marker der Neuralleiste. In den Ergebnissen zuvor wurde Tag 7 als repräsentativ für den Status der PPR und Tag 11 als repräsentativ für die olfaktorische Plakode betrachtet. Die nachfolgenden Ergebnisse beschränken sich auf Tag 11, da die weitergehende Forschung in Richtung olfaktorischer Entwicklung vom Stand der olfaktorischen Plakode aus gestartet werden könnte. Um den Entwicklungsstatus der PPR von demjenigen der olfaktorischen Plakode abzugrenzen wurde zusätzlich auf PPR-Marker getestet. Das besser geeignete Differenzierungsprotokoll zur Förderung der Entwicklung der olfaktorischen Plakode sollte an Tag 11 eine geringere Expression präplakodaler Marker aufweisen. Ebenfalls war eine hohe Expression plakodaler Marker und eine geringe Expression von Markern der Neuralleiste anzustreben.

3.3.4.1 PPR-Marker: OAPP2 vs. OAPP3

Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse für die Expression von *EYA1*, *EYA2* und *SIX1* dargestellt.

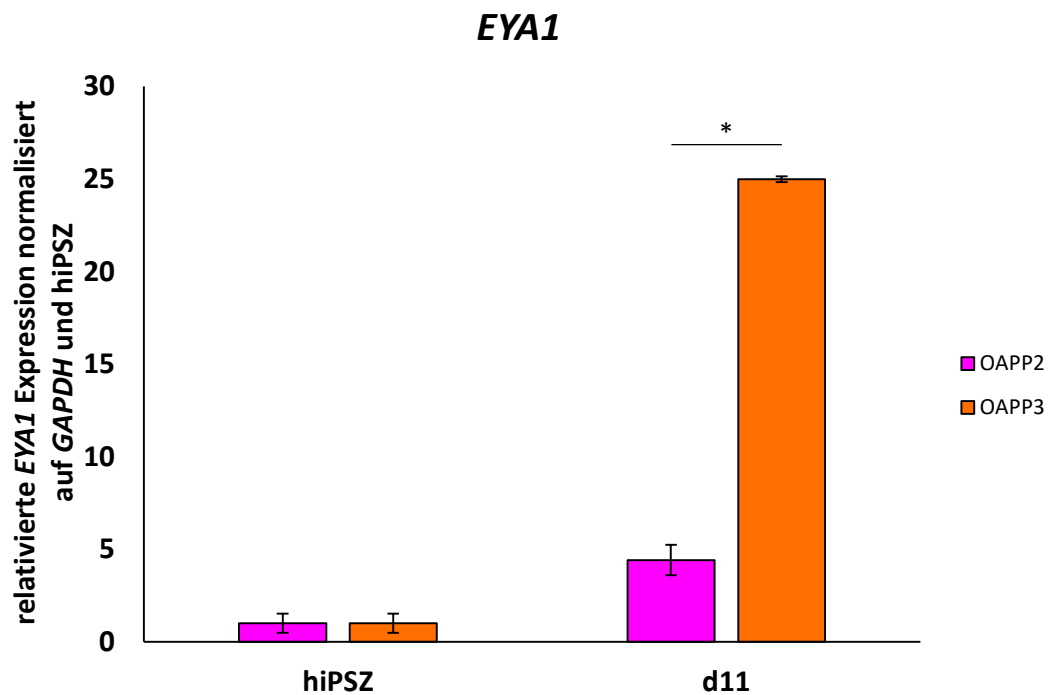


Abbildung 34: *EYA1*-Expression an Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *EYA1* an Tag 11 der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 3$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Die *EYA1*-Expression an Tag 11 der Differenzierung unter OAPP3 lag deutlich über hiPSZ-Level und war signifikant höher als unter OAPP2. Während die Expression unter OAPP2 gegenüber der Expression in hiPSZ etwa um den Faktor 4 erhöht war, war die Expression unter OAPP3 im Vergleich zu OAPP2 nochmals um etwa den Faktor 6 gesteigert (Abbildung 34).

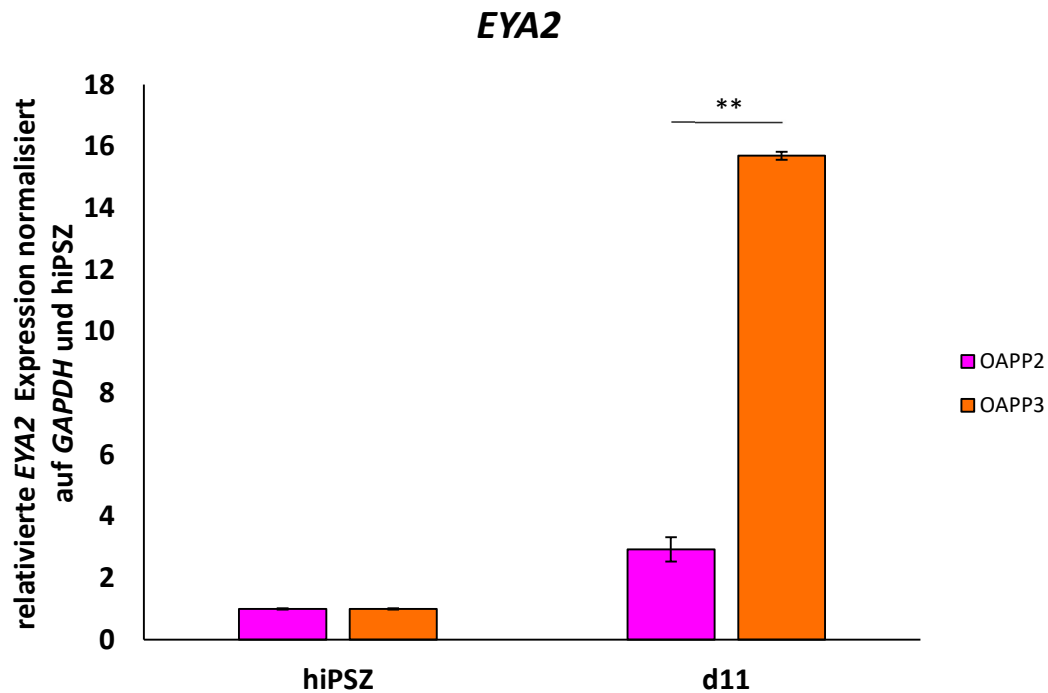


Abbildung 35: EYA2-Expression an Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *EYA2* an Tag 11 der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 3$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Die *EYA2*-Expression an Tag 11 der Differenzierung lag unter OAPP2 und OAPP3 über hiPSZ-Level. Unter OAPP3 war sie signifikant höher als unter OAPP2. Die Expression von *EYA2* unter OAPP2 war etwa doppelt so hoch wie in hiPSZ. Unter OAPP3 konnte eine bis um das 15-fache gesteigerte Expression im Vergleich mit hiPSZ gemessen werden. Im Vergleich von OAPP2 und OAPP3 war die Expression unter OAPP3 nochmal um etwa den Faktor 7,5 erhöht (Abbildung 35).

3.3.4.2 Plakoden-Marker: OAPP2 vs. OAPP3

Die Ergebnisse für Marker der olfaktorischen Plakode werden nachfolgend abgebildet.

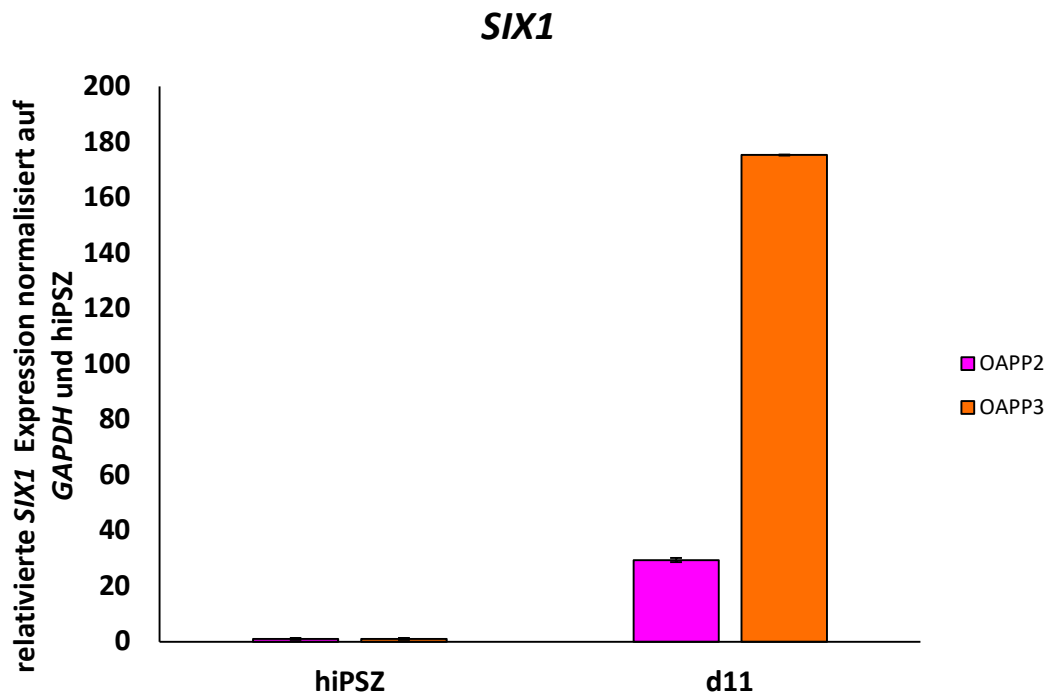


Abbildung 36: *SIX1*-Expression an Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *SIX1* an Tag 11 der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 3$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider.

Bei Betrachtung von *SIX1* als plakodalem Marker an Tag 11 der Differenzierung war die Expression unter OAPP3 deutlich höher als unter OAPP2. Während die Expression von *SIX1* unter OAPP2 gegenüber hiPSZ um etwa den Faktor 29 erhöht war, war diese Expression unter OAPP3 im Vergleich zu OAPP2 nochmals um das Fünffache erhöht (Abbildung 36).

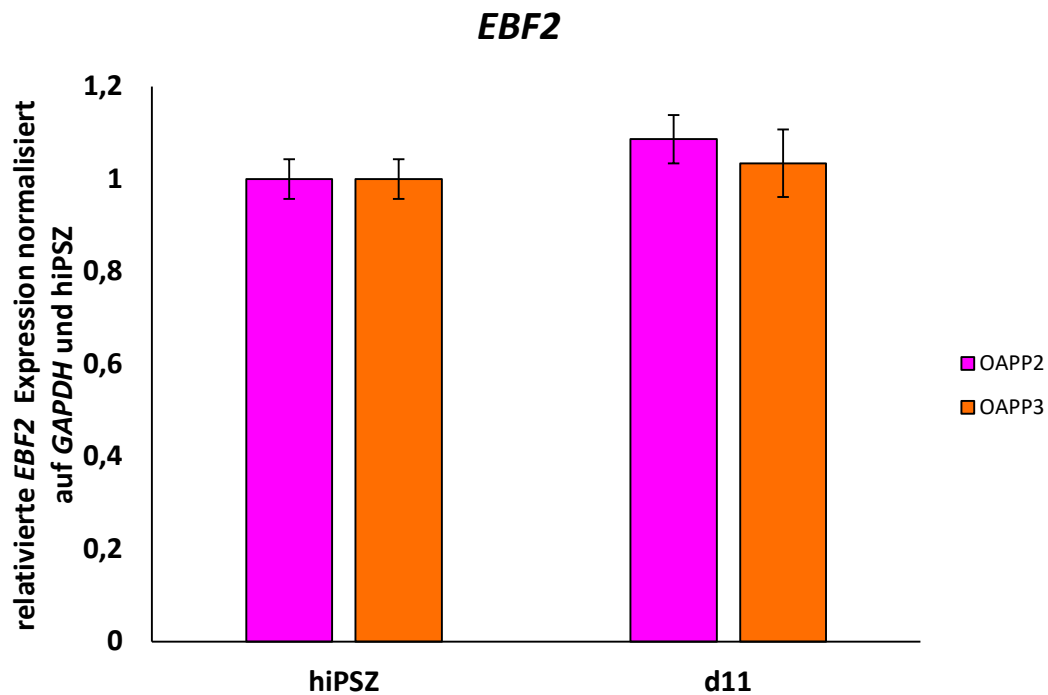


Abbildung 37: *EBF2*-Expression an Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *EBF2* an Tag 11 der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 3$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider.

Die *EBF2*-Expression unter OAPP2 und OAPP3 lag an Tag 11 der Differenzierung über hiPSZ-Level. Die Expression unter OAPP2 war höher als unter OAPP3. Bei Berücksichtigung des Fehlerbalkens kann die Expression von *EBF2* in beiden Protokollen aber als ebenbürtig angesehen werden (Abbildung 37).

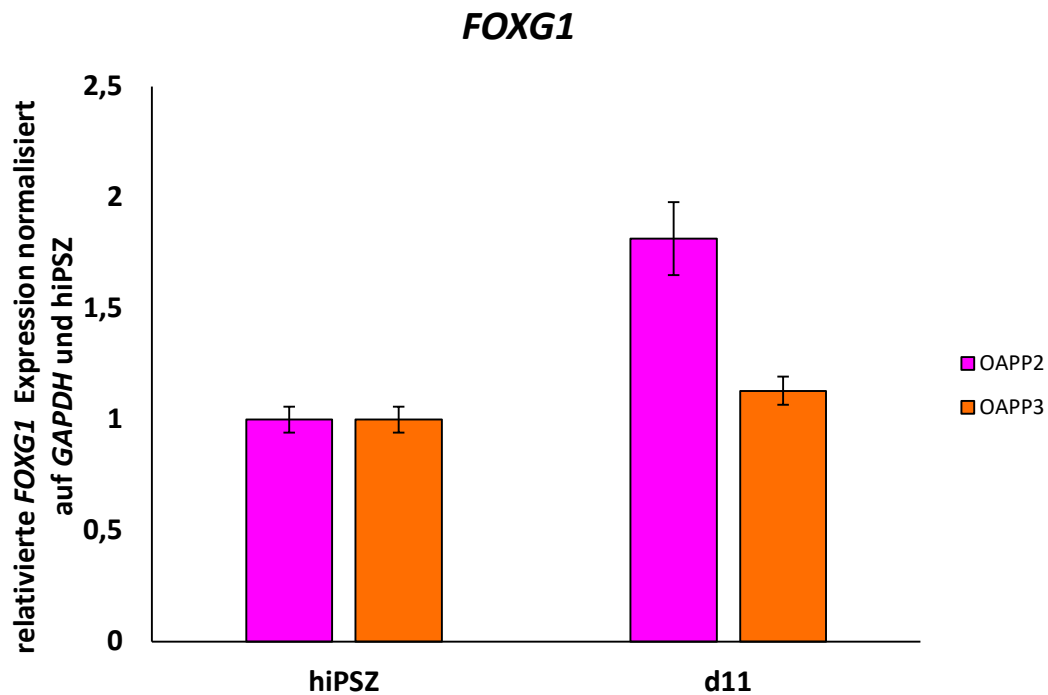


Abbildung 38: FOXG1-Expression an Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von FOXG1 an Tag 11 der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit GAPDH und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 3$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider.

Die Expression von FOXG1 war unter OAPP2 höher als unter OAPP3; beide Expressionen lagen über hiPSZ-Level. Die Expression unter OAPP2 war gegenüber hiPSZ um etwa den Faktor 1,8 erhöht. OAPP3 wies eine um etwa den Faktor 1,1 erhöhte Genexpression gegenüber hiPSZ auf (Abbildung 38).

3.3.4.3 *MSX1* als Neuralleisten-Marker: OAPP2 vs. OAPP3

Die Differenzierungsprotokolle OAPP2 und OAPP3 wurden auf *MSX1* als Marker der Neuralleiste überprüft. Ziel war eine möglichst niedrige Expression von *MSX1*, als Zeichen der Abgrenzung zur Neuralleiste.

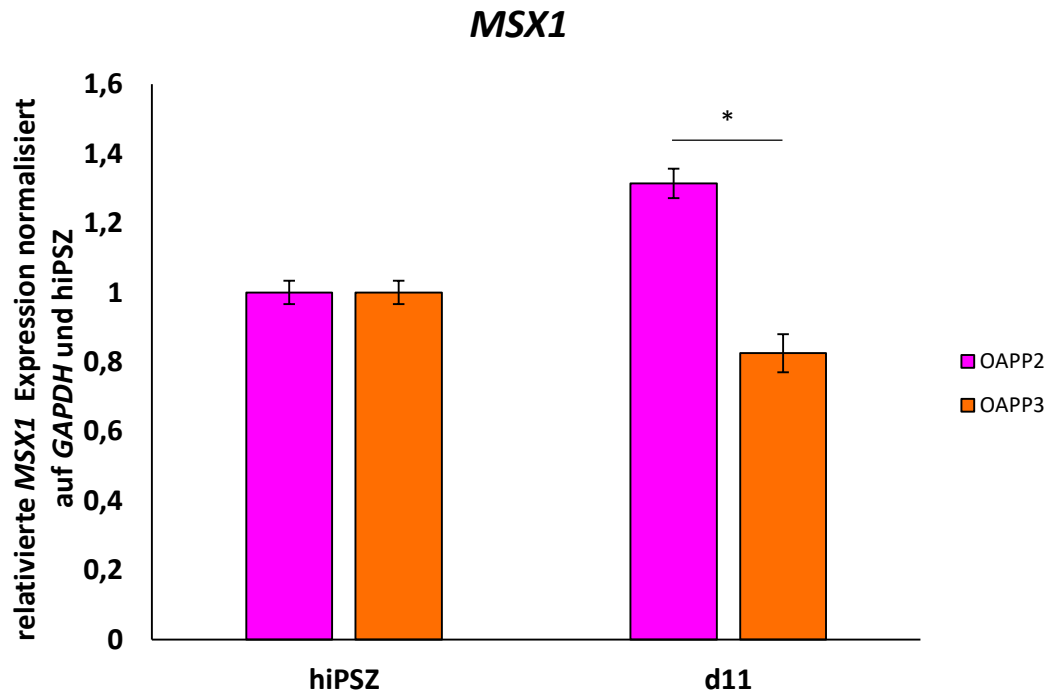


Abbildung 39: *MSX1*-Expression an Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt die RNA-Expression von *MSX1* an Tag 11 der Differenzierung. Die Verrechnung der Daten erfolgte intern mit *GAPDH* und bezieht sich auf hiPSZ. $n_b = 3$, $n_t = 3$. Der Fehlerbalken spiegelt den SEM wider. Signifikanzen: $P \leq 0,05$: *, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,001$: ***

Unter OAPP2 konnte eine gegenüber hiPSZ-Level um etwa den Faktor 1,3 erhöhte Expression von *MSX1* festgestellt werden. Im Gegenzug war die Expression unter OAPP3 geringer als in hiPSZ. Die Expression unter OAPP2 war signifikant höher als unter OAPP3 (Abbildung 39).

3.3.4.4 Zusammenfassung

Bei Betrachtung der präplakodalen Marker *EYA1*, *EYA2* und *SIX1* wies das Differenzierungsprotokoll OAPP3 gegenüber OAPP2 die höhere Expression auf. Demzufolge war OAPP2 zum Erhalt der olfaktorischen Plakode bei alleiniger Betrachtung der präplakodalen Marker zum Zeitpunkt der Plakode besser geeignet. Wird *SIX1* an Tag 11 der Differenzierung als plakodaler Marker betrachtet, so ist seine Expression in OAPP3 deutlich höher als in OAPP2. *FOXG1* als Marker der olfaktorischen Plakode wies bei OAPP3 geringere Expressionen auf als OAPP2; dies spräche ebenfalls für OAPP2 als besser geeignetes Differenzierungsprotokoll. Das Ergebnis der Expression von *EBF2* ließ bei Berücksichtigung des SEM keine eindeutigen Rückschlüsse zu, welches Differenzierungsprotokoll überlegen war. Die Expression von *MSX1* war unter dem Differenzierungsprotokoll OAPP2 geringer als unter OAPP3. Eine geringe Expression war anzustreben als Abgrenzung zur Neuralleiste. Das Differenzierungsprotokoll OAPP3 wies teilweise besser Ergebnisse auf als OAPP2, wurde aber auch teilweise von OAPP2 übertroffen. Eine Zusammenfassung der Genexpression ist in Tabelle 19 zu sehen.

Tabelle 19: Vergleich OAPP2 – OAPP3

	<i>EYA1</i>	<i>EYA2</i>	<i>SIX1</i>	<i>EBF2</i>	<i>FOXG1</i>	<i>MSX1</i>
	Tag 11					
OAPP2				■	■	■
OAPP3	■	■	■			

Die Tabelle zeigt die höchste Expression des jeweiligen Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt der Differenzierung. Die höchste Expression am jeweiligen Tag ist in der Tabelle durch ■ markiert.

3.3.4.5 Immunfluoreszenzfärbung: OAPP2 vs. OAPP3

Für weitergehende Schlüsse wurden bei beiden Protokollen an den Tagen 3, 9 und 11 der Differenzierung für Marker der PPR und olfaktorischen Plakode eine Immunfluoreszenzfärbung (IF) durchgeführt. Bei den verwendeten Markern handelt es sich um EYA1, EYA2, SIX4 und EBF2 für die PPR und olfaktorische Plakode, sowie SOX2 als ektodermalen Marker. Die Ergebnisse werden nachfolgend dargestellt.

3.3.4.5.1 Immunfluoreszenzfärbung EYA2

An Tag 3 der Differenzierung waren unter OAPP2 EYA2-positive Zellen zu sehen (Abbildung 40).

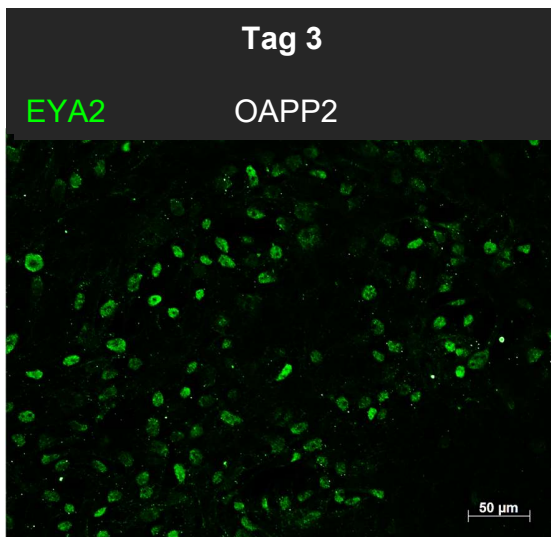


Abbildung 40: EYA2-positive Zellen an Tag 3 der Differenzierung unter OAPP2

Die Abbildung zeigt EYA2-positive Zellen an Tag 3 der Differenzierung unter dem Differenzierungsprotokoll OAPP2.

An Tag 9 und 11 der Differenzierung konnten unter beiden Differenzierungsprotokollen positive Zellen detektiert werden (Abbildung 41, Abbildung 42).

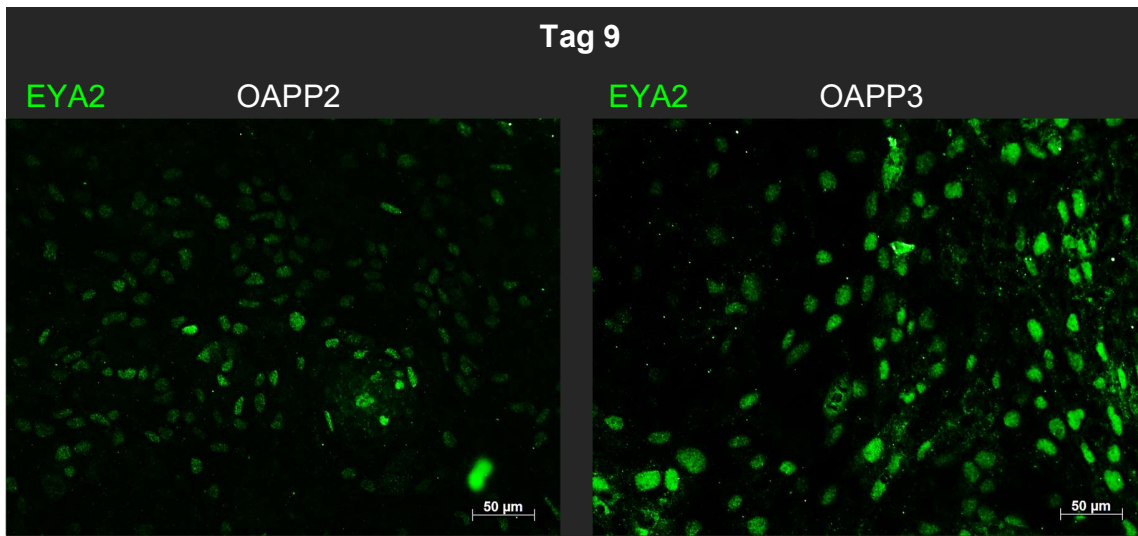


Abbildung 41: EYA2-positive Zellen an Tag 9 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt EYA2-positive Zellen an Tag 9 der Differenzierung: links unter OAPP2, rechts unter OAPP3.

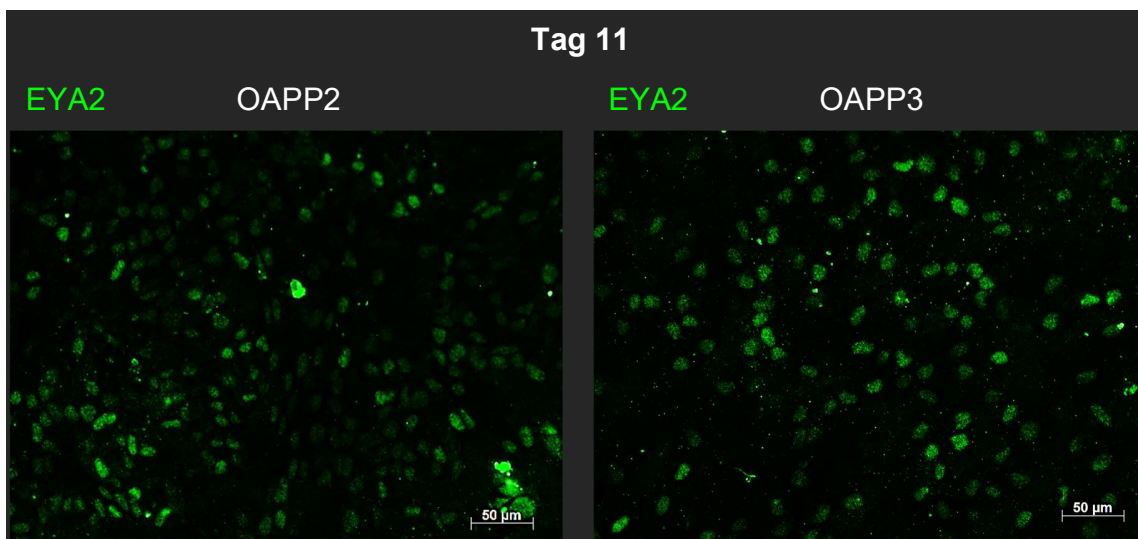


Abbildung 42: EYA2-positive Zellen an Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt EYA2-positive Zellen an Tag 11 der Differenzierung: links unter OAPP2, rechts unter OAPP3.

3.3.4.5.2 Immunfluoreszenzfärbung EBF2

EBF2-positive Zellen konnten an Tag 3 und 9 der Differenzierung unter OAPP2 und OAPP3 detektiert werden (Abbildung 43, Abbildung 44).

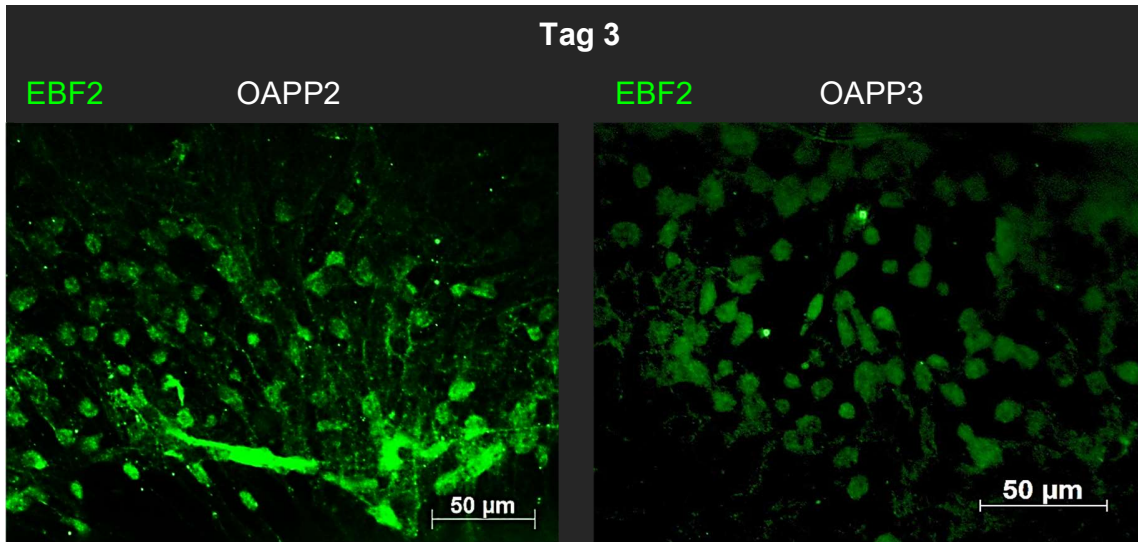


Abbildung 43: EBF2-positive Zellen an Tag 3 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt EBF2-positive Zellen an Tag 3 der Differenzierung: links unter OAPP2, rechts unter OAPP3.

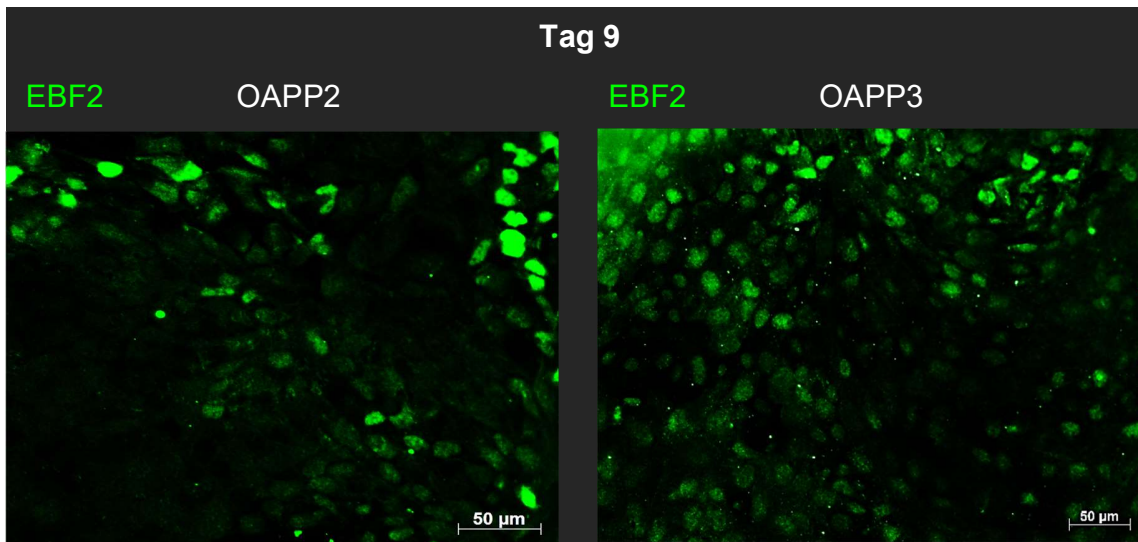


Abbildung 44: EBF2-positive Zellen an Tag 9 der Differenzierung

Ergebnisse

Die Abbildung zeigt EBF2-positive Zellen an Tag 9 der Differenzierung: links unter OAPP2, rechts unter OAPP3.

3.3.4.5.3 Immunfluoreszenzfärbung EYA1/EBF2

An Tag 11 der Differenzierung konnten EYA1- und EBF2-positive Zellen beobachtet werden. In beiden Differenzierungsprotokollen lag eine teilweise Kolokalisation vor (Abbildung 45).

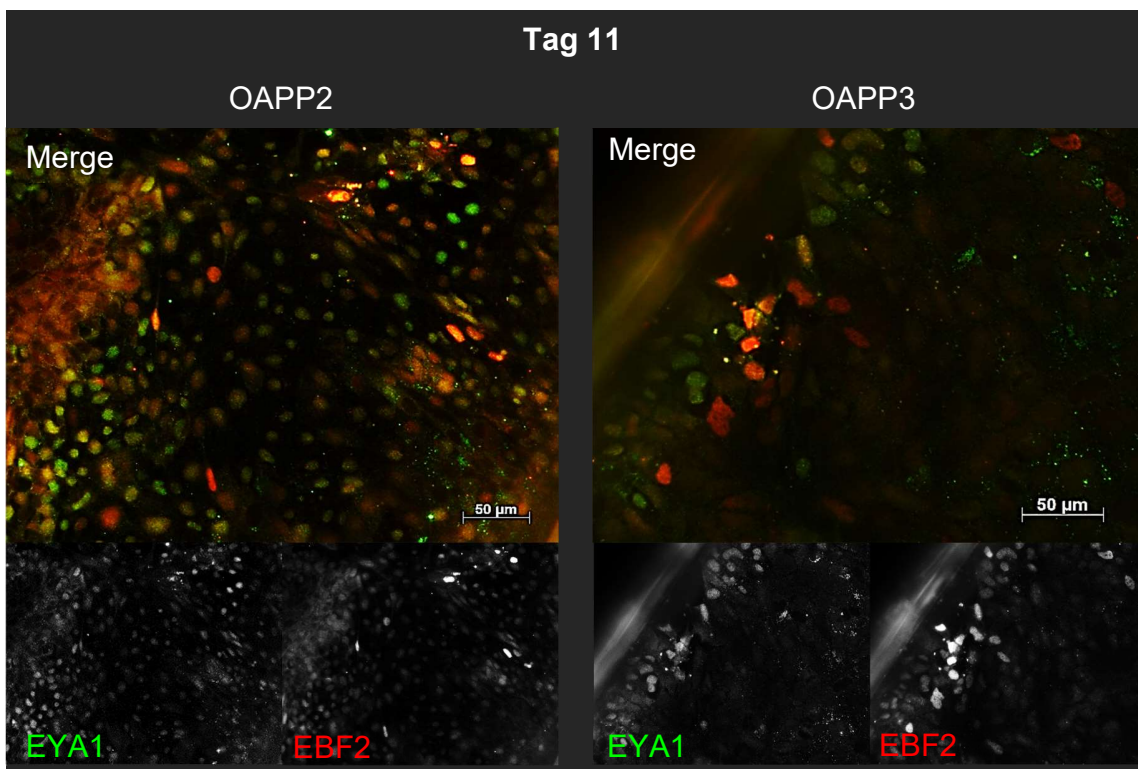


Abbildung 45: EYA1- und EBF2-positive Zellen an Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt EYA1- und EBF2-positive Zellen an Tag 11 der Differenzierung: links unter OAPP2, rechts unter OAPP3.

3.3.4.5.4 Immunfluoreszenzfärbung SIX4

Die oben genannten Ergebnisse beziehen sich auf Marker, welche auch in den RNA-Analysen aufgeführt wurden. SIX4 ist ebenfalls ein Marker der PPR. An Tag 3 und 9 der Differenzierung konnten bei OAPP2 und OAPP3 SIX4-positive Zellen in der Färbung detektiert werden (Abbildung 46, Abbildung 47).

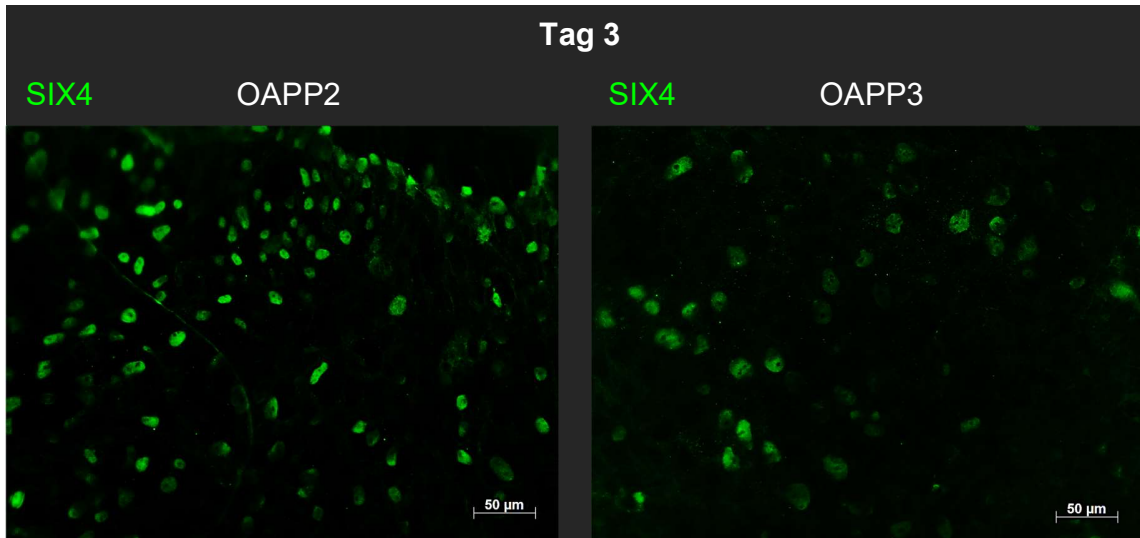


Abbildung 46: SIX4-positive Zellen an Tag 3 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt SIX4-positive Zellen an Tag 3 der Differenzierung: links unter OAPP2, rechts unter OAPP3.

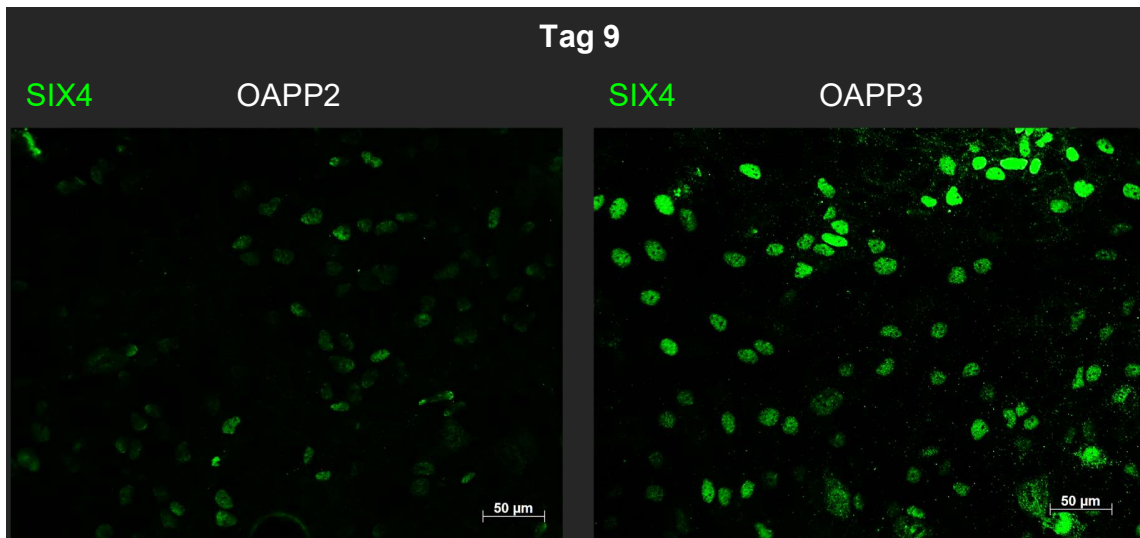


Abbildung 47: SIX4-positive Zellen an Tag 9 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt SIX4-positive Zellen an Tag 9 der Differenzierung: links unter OAPP2, rechts unter OAPP3.

3.3.4.5.5 Immunfluoreszenzfärbung SIX4/SOX2

An Tag 11 der Differenzierungen waren unter beiden Differenzierungsprotokollen SIX4-positive Zellen zu sehen. Es lag eine teilweise Kolo-kalisation mit SOX2 vor. SOX2 ist ein ektodermaler Marker. Neben Zellen der PPR lagen somit auch Zellen des neuronalen Ektoderms vor (Abbildung 48).

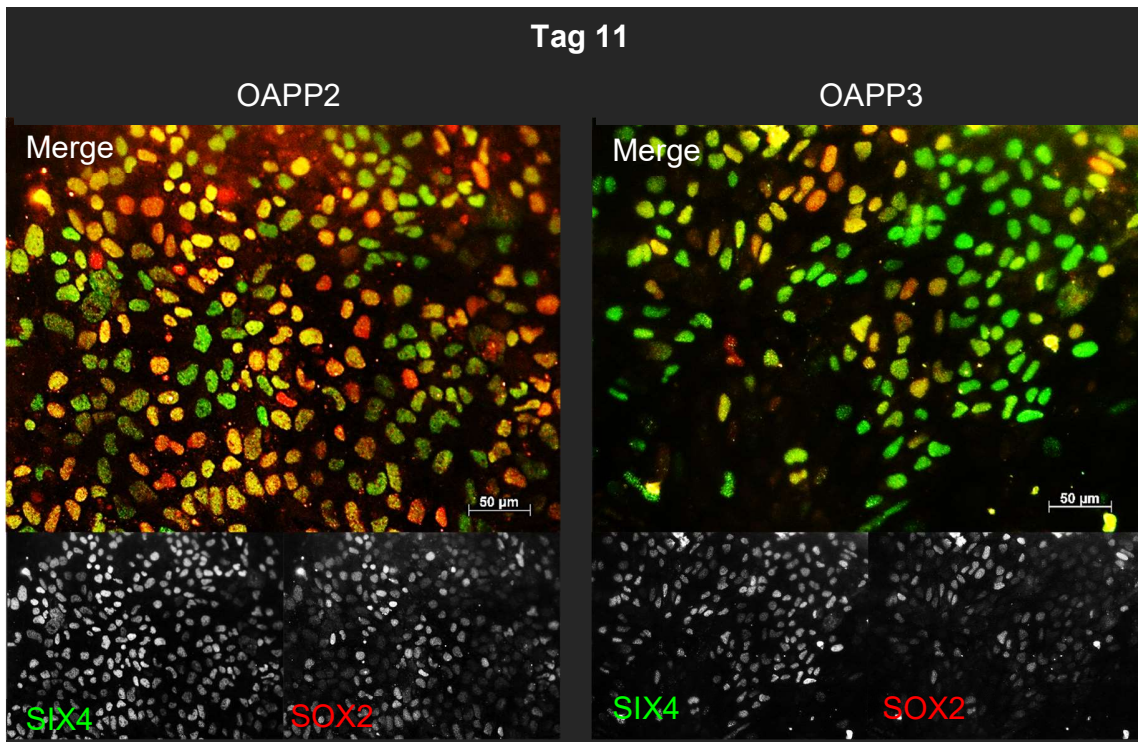


Abbildung 48: SIX4- und SOX2-positive Zellen an Tag 11 der Differenzierung

Die Abbildung zeigt SIX4- und SOX2-positive Zellen an Tag 11 der Differenzierung: links unter OAPP2, rechts unter OAPP3.

3.3.4.5.6 Zusammenfassung Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung

Sowohl das Differenzierungsprotokoll OAPP2 als auch OAPP3 zeigten für präplakodale und olfaktorische plakodale Marker zu unterschiedlichen Zeitpunkten positive Ergebnisse. Beide Differenzierungsprotokolle eignen sich hinsichtlich der Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung zur Generierung von PPR und olfaktorischen Plakodenzellen aus hiPSZ.

3.3.4.6 Zusammenfassung OAPP2 vs. OAPP3

Die Ergebnisse der RNA-Analysen und der Immunfluoreszenzfärbung ergaben keinen Vorteil eines Differenzierungsprotokolls gegenüber dem anderen. Viel mehr sind beide Differenzierungsprotokolle als geeignet zur Förderung der Entwicklung der olfaktorischen Plakode anzusehen.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das durch Vorarbeiten im Labor entstandene Differenzierungsprotokoll OPP erwies sich als sehr gute Grundlage zur Erzeugung neuer Differenzierungsprotokolle in Richtung PPR und olfaktorischer Plakode. Durch Versuche und RNA-Analysen konnten über die Zwischenschritte der Differenzierungsprotokolle APP1 und APP2 die Differenzierungsprotokolle OAPP2 und OAPP3 erzeugt werden. RNA-Analysen zeigten, dass OAPP2 zum Zeitpunkt der olfaktorischen Plakode eine höhere Expression für Marker der PPR aufwies als OAPP3. Aber auch die Expression der plakodalen Marker *EBF2* und *FOYG1* war in OAPP2 größer als in OAPP3. Bei Betrachtung des plakodalen Markers *SIX1* wies OAPP3 deutlich höhere Expressionen als OAPP2 auf. Zusätzlich war in OAPP3 die Expression von *MSX1* als Abgrenzung zur Neuralleiste geringer als in OAPP2. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung hoben weder OAPP2 noch OAPP3 im gegenseitigen Vergleich mit dem jeweils anderen Protokoll hervor. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit der Etablierung der Differenzierungsprotokolle OAPP2 und OAPP3 zwei Differenzierungsprotokolle zur Förderung der PPR und olfaktorischen Plakode vorliegen. Ausgehend von diesen kann in Zukunft weiter geforscht werden.

4 Diskussion

4.1 Ausgangsprotokoll OPP

Während in der Vergangenheit bereits hiPSZ-basierte Differenzierungsprotokolle für andere Organsysteme existierten (Koehler and Hashino, 2014), gab es bisher kein Differenzierungsprotokoll für das olfaktorische System.

Bei OPP wurde als Basis des Grundmediums DMEM F12 + GlutaMAX verwendet. DMEM/F-12 + GlutaMAX werden zur Unterstützung des Wachstums vieler Säuger-Zellen verwendet. Letzteres minimiert die Ammoniak-Bildung durch die Zugabe von GlutaMAX und schützt dadurch die Zellen. KOSR und NEAA unterstützt die Differenzierung, während β -ME die Oxidation biologischer Bestandteile der Lösung bremst. Durch die Zugabe von Penicillin-Streptomycin beziehungsweise AA wird Kontamination der Kultur mit Pilzen und Bakterien verringert. DMEM F12 + GlutaMAX enthalten Natrium Pyruvat als Puffer. Grundsätzlich unterstützt das an Tag 0 verwendete Grundmedium das Wachstum der Zellen. Durch die Zugabe von BMP4 und SB an Tag 3 der Differenzierung soll die Differenzierung von nicht-neuronalem Ektoderm induziert werden (Koehler and Hashino, 2014). An Tag 5 erfolgt durch die Zugabe von FGF2, Dorsomorphin und IWR1e die Induktion der PPR. Damit sich die PPR bilden kann muss die BMP und Wnt-Konzentration gering gehalten werden (Streit, 2008, Litsiou et al., 2005). Die BMP Konzentration wird durch Dorsomorphin als BMP-Antagonisten beeinflusst. IWR1e fungiert zusätzlich als Wnt-Antagonist. FGF2 wird für die Entwicklung von präplakodalem Ektoderm benötigt (Longworth-Mills et al., 2016). Ab Tag 10 der Differenzierung wird durch die Zugabe von FGF2, FGF8 und Dorsomorphin zum Grundmedium die Entwicklung zur olfaktorischen Plakode gefördert (Streit, 2008, Bailey et al., 2006, Sjodal et al., 2007).

An Tag 8 und 10 der Differenzierung wurde das Differenzierungsprotokoll auf die Expression der PPR-Marker *EYA1*, *EYA2* und *SIX1* überprüft. Zu beiden Zeitpunkten lag die Expression deutlich über hiPSZ-Level. Dies spricht für eine Differenzierung der Zellen. Von Tag 8 zu Tag 10 sank die Expression von *SIX1* und *EYA1*

geringfügig ab, während die Expression von *EYA2* nahezu gleich blieb. Dies könnte auf eine Weiterentwicklung vom Stadium der PPR hindeuten.

4.2 Protokollvariationen

Die Arbeitsgruppe um Dincer erhielt 2013 bei alleiniger Zugabe von SB als TGF- β - Inhibitor eine sehr hohe Expression von *EYA1* bei fehlender Expression von *SIX1*. Für die plakodale Entwicklung wurde zusätzlich bis Tag 3 der Differenzierung Noggin als BMP-Inhibitor zugegeben. Als Ergebnis wurden *SIX1*- und *EYA1*-positive Zellen detektiert. Das Grundmedium bestand aus einem KOSR-Medium, welches mit fortlaufender Differenzierung zu steigenden Anteilen mit N2-Medium zur Förderung der Entwicklung neuronaler Strukturen ersetzt wurde. Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um hESZ (Dincer et al., 2013).

In vorliegender Arbeit wurden als Grundmedium der Differenzierungsprotokolle APP1, APP2, OAPP2 und OAPP3 pKOSR- und GM-Medium verwendet. Das verwendete pKOSR-Medium bestand aus DMEM F12 + GlutaMAX als Basis mit 20 % KSR-Anteil. DMEM F12 + GlutaMAX bildeten ebenfalls die Basis des GM-Mediums, welches zusätzlich 1 % GlutaMAX (100X) enthielt. Beiden Medien wurde 1 % AA zugesetzt. Mit zunehmender Differenzierungszeit wurde der Anteil von pKOSR-Medium zugunsten von GM-Medium reduziert; dies geschah um jeweils den gleichen Prozentanteil und zu denselben Zeitpunkten wie bei Dincer. Statt N2-Medium wurde GM-Medium verwendet, da die Entwicklung neuronaler Strukturen nicht gefördert werden sollte - die Entwicklung von präplakodalen und plakodalen Strukturen stand im Vordergrund. Beim N2-Medium handelt es sich um ein KSR-Medium, welches N2-Supplement enthält (Dincer et al., 2013). Die Differenzierungsprotokolle APP1 und APP2 sind hinsichtlich ihrer Zusätze an die Protokolle von Dincer angelehnt. Das in der vorliegenden Arbeit APP2 genannte Differenzierungsprotokoll wies in Untersuchungen eine höhere *SIX1*-Expression im Vergleich zu APP1 auf (Dincer et al., 2013). Bei OAPP2 handelt es sich um eine Kombination von OPP und APP2. In der Entwicklung zur PPR und Plakode muss der Einfluss des BMP-Signalwegs zunächst

zugelassen werden (Luo et al., 2001, Bhat et al., 2013) und zu einem späteren Zeitpunkt inhibiert werden (Dincer et al., 2013). Bei Betrachtung des Differenzierungsprotokolls OAPP2 fällt auf, dass durch die Zugabe von Dorsomorphin ab Tag 0 der Differenzierung der BMP-Signalweg zunächst geblockt und anschließend ab Tag 3 wieder gefördert wird. Um die Auswirkung dieser Tatsache auf die Entwicklung zu testen wurde in OAPP3 die von der Literatur bevorzugte Zugabe-Reihenfolge von BMP und Dorsomorphin eingehalten.

4.3 Wohin führen die verwendeten Differenzierungsprotokolle?

4.3.1 Analyse auf RNA-Ebene

Unter Berücksichtigung der Genexpressionen der Differenzierungsprotokolle OPP, APP1, APP2 und OAPP2 zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung fällt auf, dass APP1 für PPR-Gene gute Ergebnisse zeigt. Konzentriert man sich mehr auf die Betrachtung plakodaler Marker scheint OAPP2 zu späteren Zeitpunkten (Tag 9 und 11) gute Ergebnisse zu liefern. Aber auch für die Expression von PPR-Markern weist OAPP2 einen Anstieg der Expression mit zunehmender Dauer der Differenzierung auf. Zusätzlich erfolgt eine Expression nicht für PPR spezifischer Marker, wie beispielsweise *MSX1*, welche vermuten lässt, dass durch OAPP2 eine allgemeine Förderung der Differenzierung von Zellen stattfindet; die Entwicklung in Richtung der olfaktorischen Plakode wird dadurch auch, aber nicht hauptsächlich gefördert. OAPP3 zeigt gute Ergebnisse hinsichtlich der Expression von PPR-Markern und Markern der olfaktorischen Plakode.

Betrachtet man OAPP2 und OAPP3 an Tag 11 der Differenzierung im repräsentativen Status der olfaktorischen Plakode, so kann nicht eindeutig gesagt werden, welches Differenzierungsprotokoll zur Förderung in Richtung olfaktorischer Plakode besser geeignet ist. Wünschenswert für ein gut geeignetes Differenzierungsprotokoll wären an Tag 7 eine hohe Expression präplakodaler Marker, welche an Tag 11 durch plakodale Marker abgelöst wird. Beide Differenzierungsprotokolle erfüllen diese Anforderungen auf unterschiedliche Weise.

4.3.2 Analyse auf Protein-Ebene

Um OAPP2 und OAPP3 näher untersuchen zu können wurde eine Immunfluoreszenzfärbung zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung durchgeführt. Durch Immunfluoreszenzfärbung werden Proteine detektiert.

An das besser geeignete Differenzierungsprotokoll wurden folgende Anforderungen gestellt:

- Expression präplakodaler und olfaktorischer Marker an Tag 9 (Übergangszustand zwischen PPR und Plakode)
- Expression plakodaler Marker an Tag 11

Eine Expression präplakodaler Marker bereits an Tag 3 der Differenzierung spricht für eine frühe Entwicklung zu PPR, deren Status an Tag 7 erreicht wird.

An Tag 3 der Differenzierung konnte EYA2 unter OAPP2 nachgewiesen werden. Dies spricht für einen frühen Start der Differenzierung zu PPR durch OAPP2. An Tag 9 und 11 wurde für beide Differenzierungsprotokolle ein positives Ergebnis für EYA2 erreicht. OAPP2 und OAPP3 erfüllen somit die für das bessere Protokoll wünschenswerten Eigenschaften bei Betrachtung von EYA2. Für beide Differenzierungsprotokolle konnte an Tag 3 bereits EBF2 als Marker der olfaktorischen Plakode nachgewiesen werden. An Tag 9 und 11 weisen OAPP2 und OAPP3 eine Expression von EBF2 auf, welche mit den an ein gutes Differenzierungsprotokoll gestellten Anforderungen übereinstimmt. Zusätzlich wurde in der Immunfluoreszenzfärbung auf SIX4 als präplakodalen Marker getestet. Eine positive Detektion für SIX4 war für beide Differenzierungsprotokolle an den Tagen 3 und 9 möglich. Zusätzlich wurde an Tag 11 unter beiden Protokollen eine Expression von EYA1 und SIX4 festgestellt. An Tag 11 ergaben sich unter OAPP2 und OAPP3 für SOX2 positive Zellen. SOX2 ist unter anderem ein Marker des Ektoderms und zeigt, dass neben PPR auch neuronales Ektoderm vorlag. Teilweise lag eine Kolo-kalisation von SIX4 und SOX2 vor, es waren aber auch Zellen zu sehen, welche nur SIX4 positiv oder SOX2 positiv waren. Bei den für beide Marker positiven Zellen könnte es sich um einen Zustand

handeln, von welchem die Entwicklung entweder zu neuralem Ektoderm oder zu PPR erfolgen kann. Die solitär SIX4 exprimierenden Zellen haben diesen Zustand bereits überschritten und exprimieren den PPR-typischen Marker.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung lassen sich keine eindeutigen Schlüsse ziehen, welches Differenzierungsprotokoll im Hinblick auf die Expression olfaktorischer plakodaler oder präplakodaler Marker am besten geeignet ist.

4.3.3 Zusammenfassung

Fasst man die Ergebnisse der Analysen auf RNA- und Proteinebene zusammen, so lässt sich sagen, dass mit den Differenzierungsprotokollen OAPP2 und OAPP3 zwei Differenzierungsprotokolle etabliert wurden, welche brauchbare Ergebnisse im Hinblick der Förderung der PPR und olfaktorischen Plakode liefern. In Zukunft müssen Untersuchungen erfolgen, welche die Differenzierung ab Tag 11 näher analysieren. Es ist zu vermuten, dass ab Tag 11 die Differenzierung noch stärker in Richtung olfaktorischer Plakode erfolgt und die Expression von PPR-Markern weiter abnimmt.

4.4 OAPP2 und OAPP3

Wird durch die Differenzierungsprotokolle OAPP2 und OAPP3 die frühe olfaktorische Entwicklung *in vitro* nachgeahmt? Diese Fragestellung soll im nachfolgenden Abschnitt diskutiert werden.

Im Zuge der Gastrulation bildet sich aus der zweiblättrigen Keimscheibe die drei Keimblätter mit Ektoderm, Mesoderm und Entoderm (Abbildung 3). Aus Teilen des Ektoderms entsteht die Neuralplatte, aus welcher sich in der Neurulation das Neuralrohr bildet. Aus den Randzonen der Neuralplatte bilden sich die Neuralleiste und die PPR (Abbildung 4). Aus der PPR entwickeln sich in Folge die Plakoden.

Verschiedene bereits publizierte neuro-ektodermale Differenzierungsprotokolle (Longworth-Mills et al., 2016, Koehler et al., 2017) und ein Differenzierungsprotokoll zur Erzeugung olfaktorischer Rezeptorneurone (Raab, 2017) arbeiten im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit nicht nur adhärent. hiPSZ werden routinemäßig adhärent

kultiviert. Werden die Stammzellen vereinzelt, in Suspension gebracht und für einige Tage kultiviert, so entstehen embryonale Körper. Das Stadium der embryonalen Körper entspricht dem Embryo während der Gastrulation. Auf die embryonalen Körper folgt nach Ausplattierung das Stadium der neuralen Rosetten (Raab, 2017). Eine Rosette verkörpert dabei das embryonale Neuralrohr. Neurale Rosetten bestehen aus sehr vielen einzelnen Rosetten, die sich rings um den ausplattierten embryonalen Körper anlagern (Hu et al., 2010). Dem viertägigen Stadium der embryonalen Körper schließt sich das 8 Tage dauernde Rosettenstadium an, sodass nach 12 Tagen der Übergang zum Stadium der neuralen Stammzellen bevorsteht. Im Stadium der Rosetten konnten PPR-Zellen detektiert werden (Raab, 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurde die gesamte Differenzierung adhärent durchgeführt, wodurch die Stadien der embryonalen Körper und neuralen Rosetten nicht durchlaufen wurden. In der embryonalen Entwicklung erfolgt die Differenzierung von Zellen niemals nur in einer Ebene, es ist immer auch eine dreidimensionale Komponente vorhanden. Man könnte bei der adhärennten Differenzierung auch von einer 2D-Differenzierung sprechen; analog wäre eine reine Differenzierung von Zellen in Suspension eine 3D-Differenzierung. Obwohl das Stadium embryonaler Körper und neuraler Rosetten *in vitro* nicht durchlaufen wird und sich die embryonale Entwicklung *in vivo* hinsichtlich der räumlichen Dimensionen deutlich von der adhärennten Differenzierung unterscheidet, gibt es keinen Anhaltspunkt dafür, dass eine Differenzierung und Weiterentwicklung der Zellen ausblieben. Bei der durchgeführten adhärennten Differenzierung handelt es sich lediglich um eine weniger fehleranfällige Art der Kultivierung.

Ausgehend vom Stadium der hiPSZ wird in OAPP2 und OAPP3 durch die Verwendung der Zusätze SB und BMP4 die Entwicklung zu nicht-neuronalem Ektoderm induziert. Anschließend wird die Entwicklung zur PPR und olfaktorischer Plakode angestrebt. Die Entwicklung der Plakoden erfolgt über das Stadium der PPR (Saint-Jeannet and Moody, 2014, Moody and LaMantia, 2015, Bailey and Streit, 2006, Baker and Bronner-Fraser, 2001, Bhattacharyya and Bronner-Fraser, 2008). Um die

PPR bilden zu können wird ein diffiziles Zusammenspiel von FGF, BMP, Wnt und RA benötigt (Litsiou et al., 2005). Ein früher BMP-Puls mit anschließender Erniedrigung ist für die Entwicklung der PPR nötig (Dincer et al., 2013). In OAPP3 wird dieser BMP-Puls durch die Zugabe von BMP4 bis zu Tag 2 der Differenzierung umgesetzt. Die anschließende Erniedrigung des BMP-Spiegels erfolgt durch den Dorsomorphin-Zusatz von Tag 2 bis zum Tag 4 der Differenzierung. In OAPP2 wurde durch die Zugabe von Dorsomorphin ab Tag 0 der Differenzierung zunächst der BMP-Puls unterdrückt und anschließend ab Tag 3 durch die Zugabe von BMP ausgeführt. Diese Reihenfolge widerspricht der in der Literatur vorherrschenden Meinung (Dincer et al., 2013, Luo et al., 2001, Bhat et al., 2013). OAPP2 wurde durch eine Kombination von OPP und APP2 erzeugt, welche beide gute Ergebnisse lieferten. FGF erhöht die Expression PPR-spezifischer Gene (Grocott et al., 2012). Anti-Wnt-Faktoren sorgen für die Begrenzung der PPR auf einen bestimmten Bereich des Ektoderms (Moody and LaMantia, 2015). Ab Tag 5 der Differenzierung werden deshalb FGF2 und IWR1e als Zusätze verwendet. Untersuchungen haben gezeigt, dass für die regelrechte Entwicklung des olfaktorischen Systems und Förderung der Entwicklung der olfaktorischen Plakode FGF8 benötigt wird (LaMantia et al., 2000, Tucker et al., 2010, Bhasin et al., 2003, Kawauchi et al., 2005). Da sowohl PPR als auch olfaktorische Plakode gezielt induziert werden sollten, wird ab Tag 8 bei OAPP2 und OAPP3 FGF8 zugesetzt. Während der gesamten Zeitspanne der Differenzierung wird SB als Zusatz verwendet. SB inhibiert den TGF β -Signalweg, ohne jedoch Rezeptoren für BMP zu hemmen. Dadurch wird die Selbsterneuerung von hiPSZ gehemmt und die Differenzierung gefördert (James et al., 2005).

Da sowohl in OAPP2 als auch in OAPP3 präplakodale und plakodale Marker auf RNA- und Proteinebene exprimiert werden, spiegeln sie die frühe olfaktorische Entwicklung auf adhärentem Weg *in vitro* wider. Die Etablierung eines adhärennten Differenzierungsprotokolls zur Erzeugung von PPR und olfaktorischer Plakode als Zielstellung der Arbeit ist somit erfüllt.

4.5 Ausblick

4.5.1 Zeitnaher Ausblick

Ausgehend vom Standpunkt der bisherigen Ergebnisse könnte die Forschung an Zelldifferenzierungen unter OAPP2 und OAPP3 folgendermaßen weitergeführt werden:

- 1) Analyse auf weitere PPR- und Plakodenmarker (beispielsweise *SOX10*, *EMX2*...)
- 2) Analyse der Gesamtzahl für PPR- und Plakodenmarker gefärbte Zellen in den IF-Färbungen zur Bestimmung des prozentualen Anteils der Zellen, welche ein bestimmtes Protein exprimieren
- 3) Einzelzellanalyse der gefärbten Zellareale für die Bestimmung der RNA-Expression präplakodaler und olfaktorischer plakodaler Marker
- 4) Durchflusszytometrie von Zelldifferenzierungen zur Bestimmung des prozentualen Anteils von Zellen, welche PPR- oder olfaktorische Plakodenmarker exprimieren

Anschließend sollten die Differenzierungen länger fortgeführt werden, um die weitere Entwicklung in Richtung olfaktorischer Plakode und olfaktorisches Epithel beurteilen zu können. Ab Tag 20 der Differenzierung sollten die Zusätze RA und FGF8 verwendet werden. Länger fortgeführte Differenzierungen zeigten vielversprechende Ergebnisse beim Zusatz von RA und FGF8 ab Tag 20 der Differenzierung (Daten nicht gezeigt). Eine Analyse auf olfaktorische Plakodenmarker und Marker des olfaktorischen Epithels sollte nach Ende der länger fortgeführten Differenzierung auf RNA- und Proteinebene durchgeführt werden. Im Vergleich mit OPP, welches zu späterem Zeitpunkt an Tag 30 der Differenzierung erste neuronale Strukturen zeigte (Daten nicht gezeigt), wäre an Tag 30 der Differenzierung unter OAPP2 und OAPP3 ein Anstieg von Neuronen zu erwarten.

Bei entsprechenden Versuchsergebnissen sollten diese in Suspensionskultur mit adhärennten Zwischenschritten und in reiner Suspensionskultur überprüft werden und eventuell auftretende Unterschiede näher erörtert und untersucht werden.

4.5.2 Ein Blick in die Zukunft

Bevor eine Anwendung von Forschungsergebnissen klinische Relevanz bekommt, muss fundamentierte Grundlagenforschung betrieben werden, um ein Verständnis für die Entwicklungsabläufe zu bekommen. Das olfaktorische System befindet sich erst am Beginn der Grundlagenforschung. Die vorliegende Arbeit stellt einen Zugewinn für das Verständnis von Entwicklungsabläufen dar.

Patienten mit Anosmie können aus verschiedenen Gründen keine Gerüche wahrnehmen. Ein weit gestecktes Ziel könnte es sein, Patienten mit erworbener Anosmie ihren Geruchssinn zurückzugeben. Voraussetzung hierfür ist die Entwicklung eines Protokolls mit dem Endziel, ein funktionelles olfaktorischen Epithel *in vitro* zu generieren. Wird durch entsprechende Forschungsergebnisse die Entwicklung eines olfaktorischen Epithels möglich, so muss dessen physiologische Funktionalität beispielsweise durch Calcium-Bildgebung (*engl.* Calcium imaging) überprüft werden. Lässt sich in den Versuchen zeigen, dass das *in vitro* generierte olfaktorische Epithel über die gleichen chemischen, biologischen und physiologischen Eigenschaften wie das *in vivo* Epithel verfügt, so kann die Möglichkeit einer Transplantation des gewonnenen Epithels in Tierversuchen näher untersucht werden. Hierfür sollten als Ausgangszellen tiereigene iPSZ verwendet werden, um die Abstoßungsreaktion zu verringern.

Mit der Möglichkeit patientenspezifische induzierte pluripotente Stammzellen erzeugen zu können eröffnen sich neue Möglichkeiten der Forschung. Ausgehend von diesen hiPSZ können mit dem richtigen Differenzierungsprotokoll auch patientenspezifische olfaktorische Rezeptorneurone erzeugt werden. Das olfaktorische System weist *in vivo* eine lebenslangen Neurogenese auf. Anhand von patientenspezi-

fischem olfaktorischen Epithel und olfaktorischen Rezeptorneuronen könnte die neuronale Regeneration weiter erforscht werden. Auf molekularer Ebene wären weitere Untersuchungen in Richtung Rezeptor-Odoranten-Bindungen möglich.

Auch könnte das gewonnene Gewebe für Medikamententests verwendet werden und die Reaktion des Körpers auf das jeweilige Medikament besser abgeschätzt werden.

5 Zusammenfassung

Der Riechsinn beeinflusst die Wahrnehmung der Umwelt und das eigene Verhalten. In der Forschung wurde dem olfaktorischen System in der Vergangenheit im Vergleich zu anderen Sinnen relativ wenig Beachtung geschenkt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der frühen Entwicklung des olfaktorischen Systems im Menschen und beschreibt die Generierung eines adhärenen Differenzierungsprotokolls für die frühe olfaktorische Entwicklung ausgehend von hiPSZ. Im Rahmen der Arbeit wurden dafür folgenden Schritte experimentell bearbeitet:

a) Überprüfung und Variation des olfaktorischen Differenzierungsprotokolls OPP

Ausgehend von hiPSZ wurde OPP als olfaktorisches Differenzierungsprotokoll für die frühe olfaktorische Entwicklung auf die Expression von PPR-Markern überprüft. An Tag 8 und 10 der Differenzierung wurde die Expression von *EYA1*, *EYA2* und *SIX1* mit der Grundexpression in hiPSZ verglichen. Es zeigte sich eine erhöhte Expression präplakodaler Marker in OPP. Die Verbesserungsfähigkeit des Protokolls wurde durch Variationen der Grundmedien und Zusätze zu bestimmten Zeitpunkten getestet.

b) Vergleich mehrerer Differenzierungsprotokolle auf olfaktorische Eignung

Zunächst wurde OPP mit dem Differenzierungsprotokoll APP1 verglichen. Die RNA-Analyse erfolgte an den Tagen 3, 5, 7, 9 und 11 für *EYA1*, *EYA2*, *SIX1*, *EBF2* und *FOXP1*. Es ergab sich eine bessere Eignung von APP1 zur Förderung der PPR. OPP schien zur Förderung der olfaktorischen Plakode besser geeignet zu sein. Im nächsten Schritt wurden OPP und APP1 mit APP2 verglichen. Bei APP2 handelt es sich um ein Differenzierungsprotokoll, welches in Studien eine erhöhte Expression von *SIX1* als PPR- und olfaktorischem plakodalem Marker aufwies.

Tag 7 wurde als repräsentativ für das Stadium der PPR und Tag 11 für das Stadium der olfaktorischen Plakode bestimmt. Die Analyse von *EYA1*, *EYA2*, *SIX1*, *EBF2* und *FOXP1* in APP1, APP2 und OPP erfolgte deswegen an den Tagen 7 und 11

der Differenzierung. Es zeigte sich, dass APP2 zur Förderung der PPR weniger gut geeignet war, für die olfaktorische Plakode aber gute Ergebnisse erzielte. Da in vorigen Versuchen OPP ebenfalls gute Ergebnisse für die olfaktorische Plakode lieferte wurde mit dem Differenzierungsprotokoll OAPP2 ein neues Differenzierungsprotokoll geschaffen, welches eine Kombination von APP2 und OPP darstellte und noch bessere Ergebnisse liefern sollte.

OPP, APP2 und OAPP2 wurden an den Tagen 7 und 11 auf die Expression von *EYA1*, *EYA2*, *SIX1*, *EBF2* und *FOXG1* überprüft. OAPP2 lieferte an Tag 11 der Differenzierung die besten Ergebnisse für die olfaktorische Plakode.

In der Literatur existierte bisher für die Zugabe von Dorsomorphin und BMP4 eine bestimmte Reihenfolge, welche mit dem getesteten Differenzierungsprotokoll OAPP2 nicht übereinstimmte. Ob dies einen Unterschied für die Expression präplakodaler und olfaktorischer plakodaler Marker macht wurde durch einen Vergleich von OAPP2 und OAPP3 untersucht. OAPP3 stellte ein Differenzierungsprotokoll dar, welches die von der Literatur bevorzugte Zugabereihenfolge von Dorsomorphin und BMP4 berücksichtigte. Die Analyse erfolgte auf RNA-Ebene an Tag 11 der Differenzierung für *EYA1*, *EYA2*, *SIX1*, *EBF2*, *FOXG1* und *MSX1*. Die Expression von *EYA1*, *EYA2*, *SIX4*, *EBF2* und *SOX2* wurden zusätzlich auf Protein-Ebene mittels einer Immunfluoreszenzfärbung für OAPP2 und OAPP3 an den Tagen 3, 9 und 11 der Differenzierung untersucht. Sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene waren OAPP2 und OAPP3 hinsichtlich der Eignung zur Förderung der Entwicklung der PPR und olfaktorischen Plakode gleichermaßen geeignet.

Mit OAPP2 und OAPP3 konnten somit Differenzierungsprotokolle etabliert werden, welche die erfolgreiche Entwicklung von hiPSZ zur PPR und olfaktorischer Plakode zur Folge haben.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Bücher

Anatomie. Band 2. S. 747 – 748. Benninghoff, Drenckhahn. Elsevier GmbH, München 2004.

Duale Reihe Anatomie. S. 73 – 83. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2010.

Gray's Anatomie für Studenten. S. 1000 – 1003. Drake, Vogl, Mitchell. Elsevier GmbH, München 2007.

Taschenlehrbuch Histologie. S. 583 – 584. Lüllmann-Rauch. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2012.

6.2 Publikationen

AASEN, T., RAYA, A., BARRERO, M. J., GARRETA, E., CONSIGLIO, A., GONZALEZ, F., VASSENA, R., BILIC, J., PEKARIK, V., TISCORNIA, G., EDEL, M., BOUE, S. & IZPISUA BELMONTE, J. C. 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*, 26, 1276-84.

ATARI, M., GIL-RECIO, C., FABREGAT, M., GARCIA-FERNANDEZ, D., BARAJAS, M., CARRASCO, M. A., JUNG, H. S., ALFARO, F. H., CASALS, N., PROSPER, F., FERRES-PADRO, E. & GINER, L. 2012. Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J Cell Sci*, 125, 3343-56.

BAILEY, A. P., BHATTACHARYYA, S., BRONNER-FRASER, M. & STREIT, A. 2006. Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity. *Dev Cell*, 11, 505-17.

BAILEY, A. P. & STREIT, A. 2006. Sensory organs: making and breaking the pre-placodal region. *Curr Top Dev Biol*, 72, 167-204.

BAKER, C. V. & BRONNER-FRASER, M. 2001. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev Biol*, 232, 1-61.

BALLY-CUIF, L., DUBOIS, L. & VINCENT, A. 1998. Molecular cloning of *Zcoe2*, the zebrafish homolog of *Xenopus Xcoe2* and mouse *EBF-2*, and its expression during primary neurogenesis. *Mech Dev*, 77, 85-90.

BAR-NUR, O., RUSS, H. A., EFRAT, S. & BENVENISTY, N. 2011. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced

- pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell*, 9, 17-23.
- BEANAN, M. J. & SARGENT, T. D. 2000. Regulation and function of Dlx3 in vertebrate development. *Dev Dyn*, 218, 545-53.
- BHASIN, N., MAYNARD, T. M., GALLAGHER, P. A. & LAMANTIA, A. S. 2003. Mesenchymal/epithelial regulation of retinoic acid signaling in the olfactory placode. *Dev Biol*, 261, 82-98.
- BHAT, N., KWON, H. J. & RILEY, B. B. 2013. A gene network that coordinates preplacodal competence and neural crest specification in zebrafish. *Dev Biol*, 373, 107-17.
- BHATTACHARYYA, S. & BRONNER-FRASER, M. 2008. Competence, specification and commitment to an olfactory placode fate. *Development*, 135, 4165-77.
- BUSHDID, C., MAGNASCO, M. O., VOSSHALL, L. B. & KELLER, A. 2014. Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science*, 343, 1370-2.
- CHEN, B., KIM, E. H. & XU, P. X. 2009. Initiation of olfactory placode development and neurogenesis is blocked in mice lacking both Six1 and Six4. *Dev Biol*, 326, 75-85.
- 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.
- COSTANZO, R. M. 1991. Regeneration of olfactory receptor cells. *Ciba Found Symp*, 160, 233-42; discussion 243-8.
- COULY, G. & LE DOUARIN, N. M. 1990. Head morphogenesis in embryonic avian chimeras: evidence for a segmental pattern in the ectoderm corresponding to the neuromeres. *Development*, 108, 543-58.
- COULY, G. F. & LE DOUARIN, N. M. 1987. Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Dev Biol*, 120, 198-214.
- COWAN, C. A., ATIENZA, J., MELTON, D. A. & EGGAN, K. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 309, 1369-73.

- 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.
- ESTERBERG, R. & FRITZ, A. 2009. *dlx3b/4b* are required for the formation of the preplacodal region and otic placode through local modulation of BMP activity. *Dev Biol*, 325, 189-99.
- ESTEVE, P. & BOVOLENTA, P. 1999. *cSix4*, a member of the six gene family of transcription factors, is expressed during placode and somite development. *Mech Dev*, 85, 161-5.
- EVANS, M. J. & KAUFMAN, M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-6.
- FELEDY, J. A., BEANAN, M. J., SANDOVAL, J. J., GOODRICH, J. S., LIM, J. H., MATSUO-TAKASAKI, M., SATO, S. M. & SARGENT, T. D. 1999. Inhibitory patterning of the anterior neural plate in *Xenopus* by homeodomain factors *Dlx3* and *Msx1*. *Dev Biol*, 212, 455-64.
- GHANBARI, H., SEO, H. C., FJOSE, A. & BRANDLI, A. W. 2001. Molecular cloning and embryonic expression of *Xenopus Six* homeobox genes. *Mech Dev*, 101, 271-7.
- GRAHAM, A. & BEGBIE, J. 2000. Neurogenic placodes: a common front. *Trends Neurosci*, 23, 313-6.
- GROCOTT, T., TAMBALO, M. & STREIT, A. 2012. The peripheral sensory nervous system in the vertebrate head: a gene regulatory perspective. *Dev Biol*, 370, 3-23.
- HAASE, A., OLMER, R., SCHWANKE, K., WUNDERLICH, S., MERKERT, S., HESS, C., ZWEIGERDT, R., GRUH, I., MEYER, J., WAGNER, S., MAIER, L. S., HAN, D. W., GLAGE, S., MILLER, K., FISCHER, P., SCHOLER, H. R. & MARTIN, U. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell*, 5, 434-41.
- HONG, C. S. & SAINT-JEANNET, J. P. 2007. The activity of *Pax3* and *Zic1* regulates three distinct cell fates at the neural plate border. *Mol Biol Cell*, 18, 2192-202.
- HU, B. Y., WEICK, J. P., YU, J., MA, L. X., ZHANG, X. Q., THOMSON, J. A. & ZHANG, S. C. 2010. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4335-40.

- IKEDA, K., OOKAWARA, S., SATO, S., ANDO, Z., KAGEYAMA, R. & KAWAKAMI, K. 2007. Six1 is essential for early neurogenesis in the development of olfactory epithelium. *Dev Biol*, 311, 53-68.
- JAMES, D., LEVINE, A. J., BESSER, D. & HEMMATI-BRIVANLOU, A. 2005. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*, 132, 1273-82.
- KAWAUCHI, S., SANTOS, R., KIM, J., HOLLENBECK, P. L., MURRAY, R. C. & CALOF, A. L. 2009. The role of foxg1 in the development of neural stem cells of the olfactory epithelium. *Ann N Y Acad Sci*, 1170, 21-7.
- KAWAUCHI, S., SHOU, J., SANTOS, R., HEBERT, J. M., MCCONNELL, S. K., MASON, I. & CALOF, A. L. 2005. Fgf8 expression defines a morphogenetic center required for olfactory neurogenesis and nasal cavity development in the mouse. *Development*, 132, 5211-23.
- KIM, J. B., GREBER, B., ARAUZO-BRAVO, M. J., MEYER, J., PARK, K. I., ZAEHRES, H. & SCHOLER, H. R. 2009. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature*, 461, 649-3.
- KLINGENSTEIN, M., RAAB, S., ACHBERGER, K., KLEGER, A., LIEBAU, S. & LINTA, L. 2016. TBX3 Knockdown Decreases Reprogramming Efficiency of Human Cells. *Stem Cells Int*, 2016, 6759343.
- KOBAYASHI, M. 2000. [Six family genes as key factors in the sensory organ formation]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 45, 2775-81.
- KOEHLER, K. R. & HASHINO, E. 2014. 3D mouse embryonic stem cell culture for generating inner ear organoids. *Nat Protoc*, 9, 1229-44.
- KOEHLER, K. R., NIE, J., LONGWORTH-MILLS, E., LIU, X. P., LEE, J., HOLT, J. R. & HASHINO, E. 2017. Generation of inner ear organoids containing functional hair cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 35, 583-589.
- 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.
- LAMANTIA, A. S., BHASIN, N., RHODES, K. & HEEMSKERK, J. 2000. Mesenchymal/epithelial induction mediates olfactory pathway formation. *Neuron*, 28, 411-25.

- LASSITER, R. N., STARK, M. R., ZHAO, T. & ZHOU, C. J. 2014. Signaling mechanisms controlling cranial placode neurogenesis and delamination. *Dev Biol*, 389, 39-49.
- LEVI, G., PUCHE, A. C., MANTERO, S., BARBIERI, O., TROMBINO, S., PALEARI, L., EGEO, A. & MERLO, G. R. 2003. The Dlx5 homeodomain gene is essential for olfactory development and connectivity in the mouse. *Mol Cell Neurosci*, 22, 530-43.
- LINTA, L., STOCKMANN, M., KLEINHANS, K. N., BOCKERS, A., STORCH, A., ZAEHRES, H., LIN, Q., BARBI, G., BOCKERS, T. M., KLEGER, A. & LIEBAU, S. 2012. Rat embryonic fibroblasts improve reprogramming of human keratinocytes into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*, 21, 965-76.
- 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.
- LLERAS-FORERO, L., TAMBALO, M., CHRISTOPHOROU, N., CHAMBERS, D., HOUART, C. & STREIT, A. 2013. Neuropeptides: developmental signals in placode progenitor formation. *Dev Cell*, 26, 195-203.
- LOH, Y. H., AGARWAL, S., PARK, I. H., URBACH, A., HUO, H., HEFFNER, G. C., KIM, K., MILLER, J. D., NG, K. & DALEY, G. Q. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*, 113, 5476-9.
- LONGWORTH-MILLS, E., KOEHLER, K. R. & HASHINO, E. 2016. Generating Inner Ear Organoids from Mouse Embryonic Stem Cells. *Methods Mol Biol*, 1341, 391-406.
- LUO, T., MATSUO-TAKASAKI, M., LIM, J. H. & SARGENT, T. D. 2001. Differential regulation of Dlx gene expression by a BMP morphogenetic gradient. *Int J Dev Biol*, 45, 681-4.
- MALLAMACI, A., IANNONE, R., BRIATA, P., PINTONELLO, L., MERCURIO, S., BONCINELLI, E. & CORTE, G. 1998. EMX2 protein in the developing mouse brain and olfactory area. *Mech Dev*, 77, 165-72.
- MARTIN, G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 7634-8.
- MCLARREN, K. W., LITSIOU, A. & STREIT, A. 2003. DLX5 positions the neural crest and preplacode region at the border of the neural plate. *Dev Biol*, 259, 34-47.

- MOODY, S. A. & LAMANTIA, A. S. 2015. Transcriptional regulation of cranial sensory placode development. *Curr Top Dev Biol*, 111, 301-50.
- ODA, Y., YOSHIMURA, Y., OHNISHI, H., TADOKORO, M., KATSUBE, Y., SASAO, M., KUBO, Y., HATTORI, K., SAITO, S., HORIMOTO, K., YUBA, S. & OHGUSHI, H. 2010. Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem*, 285, 29270-8.
- PANDUR, P. D. & MOODY, S. A. 2000. Xenopus Six1 gene is expressed in neurogenic cranial placodes and maintained in the differentiating lateral lines. *Mech Dev*, 96, 253-7.
- PATTHEY, C., SCHLOSSER, G. & SHIMELD, S. M. 2014. The evolutionary history of vertebrate cranial placodes--I: cell type evolution. *Dev Biol*, 389, 82-97.
- PIEPER, M., EAGLESON, G. W., WOSNIOK, W. & SCHLOSSER, G. 2011. Origin and segregation of cranial placodes in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, 360, 257-75.
- PINTO, J. M. 2011. Olfaction. *Proc Am Thorac Soc*, 8, 46-52.
- RAAB, S.(2017) Entwicklung und Charakterisierung eines iPSZ basierten Differenzierungsprotokolls zu olfaktorischen Rezeptorneuronen. Naturwissenschaftliche Dissertationsschrift, Universität Tübingen
- RAAB, S., KLINGENSTEIN, M., LIEBAU, S. & LINTA, L. 2014. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells International*, 2014, 12.
- SAINT-JEANNET, J. P. & MOODY, S. A. 2014. Establishing the pre-placodal region and breaking it into placodes with distinct identities. *Dev Biol*, 389, 13-27.
- SCHLOSSER, G. 2006. Induction and specification of cranial placodes. *Dev Biol*, 294, 303-51.
- SCHLOSSER, G. 2014. Early embryonic specification of vertebrate cranial placodes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 3, 349-63.
- SCHLOSSER, G. & AHRENS, K. 2004. Molecular anatomy of placode development in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, 271, 439-66.
- SHI, Y., DESPONTS, C., DO, J. T., HAHM, H. S., SCHOLER, H. R. & DING, S. 2008. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 3, 568-74.

- SJODAL, M., EDLUND, T. & GUNHAGA, L. 2007. Time of exposure to BMP signals plays a key role in the specification of the olfactory and lens placodes ex vivo. *Dev Cell*, 13, 141-9.
- SJODAL, M. & GUNHAGA, L. 2008. Expression patterns of Shh, Ptc2, Raldh3, Pitx2, Isl1, Lim3 and Pax6 in the developing chick hypophyseal placode and Rathke's pouch. *Gene Expr Patterns*, 8, 481-5.
- SOLOMON, K. S. & FRITZ, A. 2002. Concerted action of two dlx paralogs in sensory placode formation. *Development*, 129, 3127-36.
- STRECKFUSS-BOMEKE, K., WOLF, F., AZIZIAN, A., STAUSKE, M., TIBURCY, M., WAGNER, S., HUBSCHER, D., DRESSEL, R., CHEN, S., JENDE, J., WULF, G., LORENZ, V., SCHON, M. P., MAIER, L. S., ZIMMERMANN, W. H., HASENFUSS, G. & GUAN, K. 2013. Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes, and skin fibroblasts. *Eur Heart J*, 34, 2618-29.
- STREIT, A. 2002. Extensive cell movements accompany formation of the otic placode. *Dev Biol*, 249, 237-54.
- STREIT, A. 2004. Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes. *Dev Biol*, 276, 1-15.
- STREIT, A. 2007. The preplacodal region: an ectodermal domain with multipotential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia. *Int J Dev Biol*, 51, 447-61.
- STREIT, A. 2008. The cranial sensory nervous system: specification of sensory progenitors and placodes. *StemBook*. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute. Copyright: (c) 2008 Andrea Streit.
- SUKOYAN, M. A., VATOLIN, S. Y., GOLUBITSA, A. N., ZHELEZOVA, A. I., SEMENOVA, L. A. & SEROV, O. L. 1993. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Mol Reprod Dev*, 36, 148-58.
- TADA, M., TAKAHAMA, Y., ABE, K., NAKATSUJI, N. & TADA, T. 2001. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol*, 11, 1553-8.
- TAKAHASHI, K., OKITA, K., NAKAGAWA, M. & YAMANAKA, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*, 2, 3081-9.

- TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.
- TAKAI, A., INOMATA, H., ARAKAWA, A., YAKURA, R., MATSUO-TAKASAKI, M. & SASAI, Y. 2010. Anterior neural development requires Del1, a matrix-associated protein that attenuates canonical Wnt signaling via the Ror2 pathway. *Development*, 137, 3293-302.
- TCHIEU, J., ZIMMER, B., FATTAHI, F., AMIN, S., ZELTNER, N., CHEN, S. & STUDER, L. 2017. A Modular Platform for Differentiation of Human PSCs into All Major Ectodermal Lineages. *Cell Stem Cell*, 21, 399-410 e7.
- TUCKER, E. S., LEHTINEN, M. K., MAYNARD, T., ZIRLINGER, M., DULAC, C., RAWSON, N., PEVNY, L. & LAMANTIA, A. S. 2010. Proliferative and transcriptional identity of distinct classes of neural precursors in the mammalian olfactory epithelium. *Development*, 137, 2471-81.
- WILMUT, I., SCHNIEKE, A. E., MCWHIR, J., KIND, A. J. & CAMPBELL, K. H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810-3.
- WODA, J. M., PASTAGIA, J., MERCOLA, M. & ARTINGER, K. B. 2003. Dlx proteins position the neural plate border and determine adjacent cell fates. *Development*, 130, 331-42.
- YANG, L., ZHANG, H., HU, G., WANG, H., ABATE-SHEN, C. & SHEN, M. M. 1998. An early phase of embryonic Dlx5 expression defines the rostral boundary of the neural plate. *J Neurosci*, 18, 8322-30.
- ZHOU, T., BENDA, C., DUZINGER, S., HUANG, Y., LI, X., LI, Y., GUO, X., CAO, G., CHEN, S., HAO, L., CHAN, Y. C., NG, K. M., HO, J. C., WIESER, M., WU, J., REDL, H., TSE, H. F., GRILLARI, J., GRILLARI-VOGLAUER, R., PEI, D. & ESTEBAN, M. A. 2011. Generation of induced pluripotent stem cells from urine. *J Am Soc Nephrol*, 22, 1221-8.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie der Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Stefan Liebau durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Stefanie Klingenstein und Dr. Moritz Klingenstein.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Stefanie Klingenstein und Dr. Moritz Klingenstein von mir eigenständig durchgeführt. Die Methode Fluidigm wurde durch Sabine Conrad durchgeführt. Die verwendeten hiPSZ für die Versuchsreihen stammten aus dem Bestand der Arbeitsgruppe Liebau; die Reprogrammierung von Keratinozyten zum Erlernen der Methode wurde parallel zu den Versuchsreihen durchgeführt.

Die Auswertung der Versuche erfolgte nach Anleitung durch Dr. Stefanie Klingenstein und Dr. Moritz Klingenstein durch mich.

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

Tübingen, den

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Liebau für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Betreuung bedanken. Er war für wissenschaftliche Diskussionen immer zur Stelle und ermöglichte mir mich selbst durch seine kritische Betrachtung in wissenschaftlicher Hinsicht und im wissenschaftlichen Arbeiten zu verbessern.

Ein weiterer großer Dank geht an Frau Dr. Stefanie Klingenstein und Herrn Dr. Moritz Klingenstein, die mich während meiner Zeit in der Anatomie begleitet, eingearbeitet und in jeglicher Hinsicht hervorragend betreut haben. Sie hatten immer ein offenes Ohr für Fragen oder Probleme und waren immer bereit, wenn man sie gebraucht hat. Danke auch an alle anderen Mitarbeiter der AG Liebau, mit denen ich einen Großteil meiner Laborzeit verbracht und so einige schöne Ausflüge gemacht habe. Vielen Dank auch an Sabine, die nie müde wurde Fragen zu beantworten.

Während der gesamten Zeit hat mich meine Familie nach Kräften unterstützt. Danke an meinen Vater, der mich schon immer im wissenschaftlichen Arbeiten bestärkt hat, an Tina und meine Brüder.

Ein großer Dank gilt meinem Freund Adrian, der mich seelisch immer unterstützt und mir den Rücken freigehalten hat, auch wenn er mich vor allem in der Endphase öfters mal entbehren musste.

Danke meinen Freunden in der Heimat und in Tübingen, die es mir nicht übelgenommen haben, wenn die Zeit zusammen manchmal ein wenig knapp wurde.

Zuletzt danke ich allen, die mich unterstützt, gefördert, oder einfach nur mitgefiebert haben.