

**Entwicklung und Charakterisierung eines iPSZ basierten
Differenzierungsprotokolls zu olfaktorischen Rezeptorneuronen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
und
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

Stefanie Raab
aus Ulm, Deutschland

März - 2017

Tag der mündlichen Prüfung: 30.05.2017

Dekan der Math.-Nat. Fakultät: Prof. Dr. W. Rosenstiel
Dekan der Medizinischen Fakultät: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Liebau
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jörg Strotmann

Prüfungskommission:
Prof. Dr. Stefan Liebau
Prof. Dr. Jörg Strotmann
PD Dr. Eva Küppers
PD Dr. Meltem Avci-Adali

Erklärung:

Ich erkläre, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Entwicklung und Charakterisierung eines iPSZ basierten Differenzierungsprotokolls zu olfaktorischen Rezeptorneuronen“

selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, den 31.05.2017

Danksagungen

Zunächst einmal möchte ich mich bei Stefan Liebau für die Realisierung der Doktorarbeit bedanken. Er hat es mir ermöglicht nicht nur das Forschungsthema der Doktorarbeit nach dem Umzug nach Tübingen frei zu wählen, sondern bestärkte mich darin, in die „unendlichen Weiten“ des noch unerforschten Gebietes des humanen olfaktorischen Systems Licht zu bringen und sich mutig auf ein solches Wagnis einzulassen. Es war mir jederzeit möglich meine eigenen Ideen und Forschungsansätze in diese Arbeit einzubringen. Es stand immer eine Tür für wissenschaftliche Diskussionen offen und ich war nie eingeschränkt in methodischen oder experimentellen Versuchsansätzen. Außerdem möchte ich mich für die vielen Möglichkeiten bedanken auf nationale und internationale Kongresse gehen zu können und so die Anatomen und die Gruppe der olfaktorischen Forscher kennen zu lernen.

Auch ein großer Dank an Jörg Strotmann für die durchgehende Begleitung meiner Doktorarbeit und die gute Kooperation. Die Diskussionen und Vorschläge für weitere Versuche und Projekte meiner Arbeit waren sehr hilfreich. Durch die räumliche Nähe zu Hohenheim hat man sich nicht so ganz alleine auf dem Feld der olfaktorischen Forschung gefühlt.

Ein ganz besonderer Dank gilt Moritz, der nicht nur mit mir zusammen dieses Projekt gegründet hat und auch seine Doktorarbeit darüber verfasst, sondern auch alle Versuche und Ergebnisse zusammen mit mir bis ins kleinste Detail diskutiert hat. Alleine wären diese Doktorarbeiten und das gesamte Projekt nie so erfolgreich geworden. Nicht nur durch seine wissenschaftliche Fachkompetenz unterstützt er mich in meiner täglichen Arbeit, sondern steht auch privat als mein Lebenspartner voll an meiner Seite. Wir beide sind ein super Team!

Natürlich sind auch die Leute zu erwähnen, mit denen ich meine Zeit in der Zellkultur, im Labor und beim Essen verbringe: Kevin, Jasmin, Leo, Maira, Clara und die vielen medizinischen und zahnmedizinischen Doktoranden und Praktikanten. Vielen Dank für die Unterstützung und die Freundschaften. Ohne technische und fachkompetente Unterstützung durch Sabine wäre es sehr schwierig geworden, die Doktorarbeit und die parallel dazu laufenden Forschungsarbeiten an diversen anderen Projekten fortzuführen.

Auch einen großen Dank an alle Leute des Instituts für Neuroanatomie für die sehr offene und freundliche Aufnahme von uns „Ulmern“ und die Begleitung auf dem Weg zur Promotion und weiter. Sehr gefallen haben mir die gemeinsamen Ausflüge und diversen Feiern bei denen man sich auch privat näher kennen gelernt hat.

Auch auf die Unterstützung meiner gesamten Familie konnte ich mich jeder Zeit verlassen. Sie stand die gesamte Zeit hinter mir und hielt mir den Rücken frei, damit ich mich auf die Doktorarbeit konzentrieren konnte.

Und zuletzt muss noch Fuchur, unserem Neuroanatomie-Haustier gedankt werden. Durch dich haben wir gelernt, dass Darwins Begriff „Survival of the Fittest“ auch für Axolotl gilt ;)

Zusammenfassung

Das Riechsystem ist einzigartig in unserem Organismus, da etwa fünf Prozent unserer Gene dem olfaktorischen System, vor allem den jeweiligen Odorant-Rezeptoren der Rezeptorneurone, zugeordnet werden können. Jedes Gen detektiert für einen anderen Rezeptor, jedes Rezeptorneuron exprimiert dabei nur einen einzigen Rezeptortyp und jeder Rezeptor reagiert auf eine andere Kombination und Intensität von Duftstoffen. Bisher sind nur sehr wenige Zuordnungen zwischen Duftstoff und Rezeptor bekannt. Dies ist nur einer von vielen Punkten, der widerspiegelt, wie wichtig der Riechsinn für den Menschen ist. Auf den ersten Blick erscheint er als Sinn eher untergeordnet, jedoch nimmt er unterbewusst einen sehr großen Stellenwert ein. Zudem ist der primäre (Seh-) Sinn weit besser untersucht und spielt in der aktuellen Forschungslandschaft eine deutlich höhere Rolle. Deshalb widmet sich diese Doktorarbeit einem noch rudimentär in der Forschung beleuchteten Sinnessystem unseres Körpers. Hierbei soll ein olfaktorisches Differenzierungsprotokoll, ausgehend von pluripotenten Stammzellen entwickelt und anschließend näher charakterisiert werden. Das Ziel ist es ein System zu entwickeln, mit dem man die *in vivo* Bedingungen des olfaktorischen Systems leicht zugänglich nachahmen kann und weitere Forschungsfragen damit beantworten kann. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden dafür folgende Arbeitsschritte experimentell bearbeitet:

I. Generierung von induziert pluripotenten Stammzellen aus humanen Keratinozyten

Es wurden von drei unterschiedlichen, freiwilligen Spendern Haarproben entnommen und kultiviert. Daraus konnten primäre Keratinozyten gewonnen werden, die erfolgreich zu iPSZ lentiviral reprogrammiert wurden. Die generierten Stammzellen sind pluripotent und können in alle drei Keimblätter differenzieren. Sie bilden somit die Grundlage für die Etablierung des olfaktorischen Differenzierungsprotokolls.

II. Etablierung eines Differenzierungsprotokolls zur Gewinnung von olfaktorischen Rezeptorneuronen

Die generierten iPSZ dienen als Ausgangsmaterial für die Entwicklung eines gerichteten, olfaktorischen Differenzierungsprotokolls. Hierbei stand die Anreicherung von *OMP* positiven Neuronen in der neuronalen Mischkultur im Fokus. Dies wurde durch die gezielte Verbesserung eines neuro-ektodermalen Protokolls durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren zu bestimmten Differenzierungsstadien erreicht. Zusätzliche Variationen in den Zeitpunkten und Zeitabständen der einzelnen Differenzierungsschritte führte ebenso zu einer höheren Ausbeute an *OMP* positiven Zellen. Es konnte im Neuronen Stadium an Tag 74 eine 58-fach signifikant erhöhte *OMP* Expression im Vergleich zu Stammzellen gemessen werden.

III. Charakterisierung des gerichteten Protokolls anhand von detaillierten Genexpressionsanalysen

Im letzten Arbeitsschritt wurde das entwickelte Protokoll mithilfe einer detaillierten Genexpressionsanalyse näher charakterisiert. Dabei wurden zu verschiedenen Differenzierungsstadien Markergene untersucht, die spezifisch für die jeweilige embryonale olfaktorische Entwicklung sind. Zusätzlich wurde die Marker Expression auch auf Proteinebene überprüft. Es konnte so ein Schema erstellt werden, das die einzelnen Differenzierungsstadien mit den olfaktorischen Entwicklungsschritten *in vivo* in direkten Zusammenhang bringt. Signalkaskaden, die in der olfaktorischen Entwicklung und Neurogenese auftreten stimmen teilweise mit denen Verlaufskurven *in vitro* überein. Insgesamt lässt sich zusammengefasst sagen, dass das generierte Differenzierungsprotokoll zu großen Teilen die embryonale olfaktorische Entwicklung *in vitro* widerspiegelt.

Summary

The olfactory system is unique in our organism, as 5 % of genes are allocated to the olfactory system, especially to the receptors of the receptor neurons. Each gene encodes for a single receptor, while each neuron expresses only one single receptor subtype and each receptor reacts on different combinations and intensities of odors. Up to now, there are only few odor-receptor correlations known. This fact represents just one of many missing informations about the human olfactory system. On first glance, the sense of smell seems to subordinate among our senses, such as our visual system but it plays a very important role for our subconscious behaviour. Additionally, the visual sense has a much more important role in the actual research topics. That is why this PhD thesis deals with this underrepresented topic in the human sensory research field.

The goal is to develop and characterize a differentiation protocol based on human induced pluripotent stem cells (iPSCs). With this system, we can mimic the *in vivo* development of the olfactory lineage and answer open questions correlated to the olfactory system. In the framework of this PhD project, the following steps were performed experimentally:

I. Generation of keratinocyte-derived induced pluripotent stem cells

Hair roots were plucked and cultivated from three voluntary donors. Primary keratinocytes could be isolated and were successfully reprogrammed to iPSCs. The generated stem cells are pluripotent and have the capability to differentiate into all three germ layers. iPSCs will form the basis for the establishment of a differentiation protocol for olfactory neurons.

II. Establishment of a differentiation protocol for the generation of olfactory receptor neurons

The generated iPSCs served as a starting material for the development of a directed olfactory differentiation protocol. The main goal was the enrichment of OMP positive neurons in the mixed neuronal culture. This was achieved by the focused improvement of a neuro-ectodermal differentiation protocol. The addition of specific growth factors and cytokines and the variations of time intervals at specific time points of the differentiation process also enhanced the yield of OMP positive cells. At day 74 in the neuron-stage a 58fold higher expression of *OMP* was detected in comparison to iPSCs.

III. Characterization of the directed protocol based on detailed gene expression analysis

In the last step we thoroughly characterized the developed differentiation protocol using a detailed gene expression analysis. Specific marker genes for the respective embryonic olfactory development were analysed at different time points of the protocol. Also on protein level, the expression of these markers was investigated. Thus, a scheme could be created which directly correlates the single differentiation stages with the olfactory developmental steps. Signalling cascades, which appear in the olfactory development and neurogenesis, are at least in part identical with the *in vitro* time series curves. Overall, the generated differentiation protocol resembles the embryologic olfactory differentiation in close proximity.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	III
Zusammenfassung	IV
Summary	V
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1. Einleitung	1
1.1. Generierung von induzierten Stammzellen	1
1.1.1. Reprogrammierung	2
1.1.2. Reprogrammierung von Keratinozyten	3
1.1.3. Humane induziert pluripotente Stammzellen	4
1.2. Differenzierung von induzierten Stammzellen zu Neuronen	5
1.3. Das olfaktorische System	6
1.3.1. Embryonale Entwicklung des olfaktorischen Systems	6
1.3.2. Wichtige Wachstumsfaktoren während der Entwicklung des olfaktorischen Systems	8
1.3.3. Aufbau des olfaktorischen Epithels	9
1.3.3.1. Basalzellen und ihre spezifischen Marker	10
1.3.3.2. Vorläuferzellen und ihre spezifischen Marker	11
1.3.3.3. Olfaktorische Rezeptorneurone und ihre spezifischen Marker	14
1.3.3.4. Weitere Zellen des olfaktorischen Epithels und ihre spezifischen Marker	17
1.3.3.5. Adulte Neurogenese im olfaktorischen Epithel	19
1.4. Zielstellung der Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Material	22
2.1.1. Zellkultur	22
2.1.1.1. Zellkultur von Ammenzellen und Lentivirusproduzierenden Zellen	22
2.1.1.2. Zellkultur von primären Keratinozyten	22
2.1.1.3. Zellkultur während der Reprogrammierung	22
2.1.1.4. Zellkultur von induziert pluripotenten Stammzellen	22
2.1.1.5. Zellkultur von <i>in vitro</i> generierten olfaktorischen Rezeptorneuronen	23
2.1.2. Software und Internetressourcen	24
2.1.3. Oligonukleotide	25
2.1.4. Vektoren	26
2.1.5. Antikörper	26
2.1.6. Gebrauchsfertige Reaktionslösungen	28

2.1.7. Chemikalien	28
2.1.8. Zellkulturzusätze und Zytokine.....	29
2.1.9. Geräte.....	30
2.1.10. Verbrauchsmaterialien	31
2.2. Methoden.....	32
2.2.1. Zellkultur.....	32
2.2.1.1. Kultivierung und Inaktivierung von Ammenzellen, Gewinnung von konditioniertem Medium	32
2.2.1.2. Produktion von Lentiviren.....	32
2.2.1.3. Kultivierung von Keratinozyten	32
2.2.1.4. Reprogrammierung	33
2.2.1.5. Kultivierung von induziert pluripotenten Stammzellen	33
2.2.1.6. Charakterisierung von induziert pluripotenten Stammzellen.....	33
2.2.1.7. Alkalische Phosphatase Färbung.....	34
2.2.1.8. Differenzierung von induziert pluripotenten Stammzellen zu Neuronen.....	34
2.2.2. RNA-Methoden.....	35
2.2.2.1. Zellpellet und RNA-Isolation.....	35
2.2.2.2. Quantitative Reverse Transkriptase PCR.....	35
2.2.3. Genexpressionsanalyse	35
2.2.4. Immunfluoreszenz.....	36
3. Ergebnisse.....	37
3.1. Generierung und Charakterisierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen ...	37
3.1.1. Reprogrammierung von Keratinozyten.....	37
3.1.2. Expression der Viruskassette nimmt während der Reprogrammierung ab.....	38
3.1.3. Expression der Pluripotenzfaktoren nimmt mit der Reprogrammierung zu	39
3.1.4. Induziert pluripotente Stammzellen	40
3.1.5. Generierte Stammzellen sind pluripotent.....	40
3.1.6. Generierte Stammzellen können in alle drei Keimblätter differenzieren	41
3.1.7. Generierte Stammzellen sind AP positiv	43
3.2. Generierung eines Differenzierungsprotokolls zu ORN	44
3.2.1. Ektodermales Differenzierungsprotokoll als Basis?	44
3.2.1.1. Detektion von Markern der späten Neuralplatte im Rosetten Stadium.....	44
3.2.1.2. Analyse von PPR Markern im Rosetten Stadium.....	47
3.2.1.3. Abgrenzung von anteriorer zu posteriorer Plakode während der Differenzierung .	50
3.2.1.4. Detektion von Plakodenmarkern während der Differenzierung.....	52
3.2.1.5. Zusammenfassung: Eignet sich das ektodermale Protokoll als Basis für eine Differenzierung zu ORN?	53

3.2.2. OMP Detektion in ektodermalen Protokoll.....	54
3.2.3. Zugabe von BMP4 erhöht die OMP Ausbeute in den Neuronen	55
3.2.4. Zugabe von 4 Faktoren in der späten Differenzierung erhöht die OMP Expression.....	57
3.2.5. Das gerichtete cPM4E Protokoll zeigt eine höhere Expression von olfaktorischen Markergenen	61
3.2.5.1. Analyse von frühen olfaktorischen Markern im cPM4E und ungerichteten Protokoll	61
3.2.5.2. Analyse von späten olfaktorischen Markern im cPM4E und ungerichteten Protokoll	62
3.2.6. Zusammenfassung: Vergleich der zwei Protokolle zu unterschiedlichen Stadien in der Differenzierung.....	64
3.2.7. Variation im GDF11/FST Signalweg kann die Ausbeute an OMP erhöhen	67
3.3. Gesamtanalyse des gerichteten, olfaktorischen Differenzierungsprotokolls	69
3.3.1. Analyse von iPSZ.....	69
3.3.1.1. Genexpressionsanalyse von iPSZ.....	69
3.3.1.2. Proteinanalyse von iPSZ	70
3.3.2. Analyse von EBs und neuralen Rosetten	71
3.3.2.1. Vergleichende Genexpressionsanalyse von EBs und Rosetten während der olfaktorischen Differenzierung.....	71
3.3.2.2. Proteinanalyse von Rosetten während der olfaktorischen Differenzierung.....	72
3.3.3. Analyse von neuralen Stammzellen	73
3.3.3.1. Vergleichende Genexpressionsanalyse von Rosetten und neuralen Stammzellen während der olfaktorischen Differenzierung	73
3.3.3.2. Proteinanalyse von neuralen Stammzellen während der olfaktorischen Differenzierung.....	74
3.3.4. Analyse von Neuronen	75
3.3.4.1. Vergleichende Genexpressionsanalyse von neuralen Stammzellen und frühen Neuronen während der olfaktorischen Differenzierung.....	75
3.3.4.2. Vergleichende Genexpressionsanalyse von frühen und späten Neuronen während der olfaktorischen Differenzierung	77
3.3.4.3. Proteinanalyse von Neuronen am Ende der olfaktorischen Differenzierung	78
3.3.5. Genexpressionsprofilanalysen im olfaktorischen Differenzierungsprotokoll	79
3.3.5.1. OMP Genexpressionsanalyse während der Differenzierung	79
3.3.5.2. Genexpressionskaskade ASCL1 → NGN1 → NEUROD1 → NCAM1.....	80
3.3.5.3. Genexpressionskaskade TUBB3 → CALB2 → OMP.....	81
3.3.5.4. Genexpressionskaskade SOX2 → TUBB3 → ATF5 → OMP.....	82
3.3.5.5. Genexpressionskaskade SOX2 → ASCL1 → KIT → OMP.....	83
4. Diskussion.....	85

4.1. iPSZ als Basis für die Differenzierung	85
4.1.1. Generierung von iPSZ aus somatischen Zellen.....	85
4.1.2. Keratinozyten als primäre Zelllinie.....	86
4.1.3. iPSZ als Basis für die olfaktorische Differenzierung	87
4.1.4. Zusammenfassung iPSZ als Basis für die Differenzierung	87
4.2. Das gerichtete, olfaktorische Differenzierungsprotokoll	88
4.2.1 Verbesserungen, die das ungerichtete zu einem gerichteten Protokoll machen.....	88
4.2.2. Das gerichtete ist Protokoll effizienter als das ungerichtete	94
4.2.3. Zusammenfassung: Das gerichtete, olfaktorische Differenzierungsprotokoll	95
4.3. Verlaufsanalysen in der gerichteten Differenzierung	96
4.3.1. Spiegelt das Differenzierungsprotokoll die frühe olfaktorische Entwicklung wieder? ...	96
4.3.2. Entsprechen einzelne Differenzierungsschritte den embryonalen Entwicklungsstufen?	101
4.3.2.1. Charakterisierung von neuralen Rosetten	101
4.3.2.2. Charakterisierung von neuralen Stammzellen	102
4.3.2.3. Charakterisierung von Neuronen	103
4.3.3. Analyse der Signalkaskaden	105
4.3.3.1. Signalkaskade ASCL1 → NGN1 → NEUROD1 → NCAM1.....	106
4.3.3.2. Signalkaskade TUBB3 → CALB2 → OMP.....	107
4.3.3.3. Signalkaskade SOX2 → TUBB3 → ATF5 → OMP.....	107
4.3.3.4. Signalkaskade SOX2 → ASCL1 → KIT → OMP.....	108
4.3.4. Zusammenfassung: Verlaufsanalysen in der gerichteten Differenzierung	109
5. Ausblick.....	110
5.1. Weitergehende, zeitnahe Versuche	110
5.1.1. Genauere Charakterisierung der generierten OMP positiven Neurone	110
5.1.2. Anreicherung der OMP positiven Zellen	110
5.2. Weitergehende, zeitlich weiter entfernte Versuche.....	111
5.2.1. Generierung von Patienten-spezifische Zellen und Nachspielen von Krankheits- Modellen	111
5.2.2. Versuche zur adulten Neurogenese	111
6. Literaturverzeichnis.....	112
7. Anhang.....	123
7.2. Verlaufsdiagramme von untersuchten Genen der Genexpressionsanalyse	123
7.3. Verlaufsdiagramme von nicht untersuchten Genen der Genexpressionsanalyse	131

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Menschliche Entwicklung und ihre Stammzellstadien	1
Abbildung 2: Reprogrammierung von primären somatischen Zellen, am Beispiel von Keratinozyten ..	2
Abbildung 3: Lichtmikroskopische und schematische Darstellung einer Haarwurzel mit Keratinozyten	3
Abbildung 4: Übersicht über ein neuronales Differenzierungsprotokoll	5
Abbildung 5: Entwicklung der olfaktorischen Plakode.....	7
Abbildung 6: Darstellung der paarigen Plakoden im Stadium der späten Neurulation.....	8
Abbildung 7: Beteiligung von Wachstumsfaktoren an der Plakodenentwicklung.....	9
Abbildung 8: Schematischer Aufbau des olfaktorischen Epithels.....	10
Abbildung 9: Entwicklung der Zelltypen des olfaktorischen Epithels	12
Abbildung 10: Exprimierte Marker während der Entwicklung von Basalzellen zu ORN	14
Abbildung 11: Immunhistochemie gegen das olfaktorische Markerprotein (OMP).....	16
Abbildung 12: Olfaktorisches Epithel mit schematischer Signalkaskade	17
Abbildung 13: Übersichtsdarstellung der Arbeitsabschnitte und der dazugehörigen Unterpunkte	20
Abbildung 14: Reprogrammierung von Keratinozyten	38
Abbildung 15: Abnahme der viralen Kasette während der Reprogrammierung.....	39
Abbildung 16: Expression der Pluripotenzmarker nimmt während der Reprogrammierung zu	40
Abbildung 17: Induziert pluripotente Stammzelle	40
Abbildung 18: Pluripotenzfärbung von iPSZ.....	41
Abbildung 19: Keimblatt Differenzierung von iPSZ auf RNA Ebene	42
Abbildung 20: Aus Stammzellen können sich Zellen aller drei Keimblätter entwickeln	43
Abbildung 21: Alkalische Phosphatase Färbung.....	43
Abbildung 22: Genexpression während der Entwicklung der späten Neuralplatte.....	45
Abbildung 23: Analyse der Marker für die späte Neuralplatte während der Differenzierung	46
Abbildung 24: SIX1 Expression während des Rosetten Stadiums	47
Abbildung 25: SIX4 Expression während des Rosetten Stadiums	48
Abbildung 26: EYA1 Expression während des Rosetten Stadiums.....	49
Abbildung 27: EYA2 Expression während des Rosetten Stadiums.....	50
Abbildung 28: Genexpression während der frühen Neurulation.....	50
Abbildung 29: Analyse der Marker für die frühe Neurulation während der Differenzierung.....	52
Abbildung 30: Genexpression während der späten Neurulation.....	52
Abbildung 31: Analyse der Marker für die späte Neurulation während der Differenzierung	53
Abbildung 32: OMP Expression in iPSZ im Vergleich zum ungerichteten Differenzierungsprotokoll...	55
Abbildung 33: Medium Test I zur Erhöhung der OMP Ausbeute im Differenzierungsprotokoll.....	55
Abbildung 34: Medium Test I, Genexpression in Neuronen	57
Abbildung 35: Medium Test II zur Erhöhung der OMP Ausbeute im Differenzierungsprotokoll	58
Abbildung 36: Medium Test II, Genexpression in zwei und drei Wochen alten Neuronen	60
Abbildung 37: Medium Test II: Durchlichtbilder der sechs Protokolle im Vergleich	61
Abbildung 38: Vergleich zwischen gerichtetem und ungerichtetem Protokoll im Rosetten Stadium..	62
Abbildung 39: Vergleich zwischen gerichtetem und ungerichtetem Protokoll im Neuronen Stadium	63
Abbildung 40: Netzdiagramm frühe olfaktorische Marker	65
Abbildung 41: Netzdiagramm späte olfaktorische Marker	66
Abbildung 42: Medium Test III zur Erhöhung der OMP Ausbeute in dem Differenzierungsprotokoll .	67
Abbildung 43: Medium Test III, Genexpression in vier Wochen alten Neuronen.....	68
Abbildung 44: Grundexpression von olfaktorischen Markergenen in iPSZ.....	70
Abbildung 45: Proteinexpression von olfaktorischen Markern in iPSZ.....	71
Abbildung 46: Grundexpression von olfaktorischen Markergenen in EBs und Rosetten	72

Abbildung 47: Proteinexpression von olfaktorischen Markern in Rosetten	73
Abbildung 48: Grundexpression von olfaktorischen Markergenen in Rosetten und neuralen Stammzellen	74
Abbildung 49: Proteinexpression von olfaktorischen Markern in neuralen Stammzellen	75
Abbildung 50: Grundexpression von olfaktorischen Markergenen in neuralen Stammzellen und frühen Neuronen	76
Abbildung 51: Grundexpression von olfaktorischen Markergenen in frühen und späten Neuronen ..	78
Abbildung 52: Proteinexpression von neuralen und neuronalen Subtypen in dem olfaktorischen Differenzierungsprotokoll	79
Abbildung 53: OMP und TUBB3 Genexpressionsanalyse während der Differenzierung	80
Abbildung 54: Genexpressionsanalyse Differenzierung von frühen Vorläufern zu ORN über den NEUROD1-Signalweg	81
Abbildung 55: Genexpressionsanalyse Differenzierung von späten Vorläufern zu ORN über den CALB2-Signalweg	82
Abbildung 56: Genexpressionsanalyse Differenzierung von frühen Vorläufern zu ORN über den ATF5-Signalweg.....	83
Abbildung 57: Genexpressionsanalyse Differenzierung von frühen Vorläufern zu ORN über den KIT-Signalweg.....	84
Abbildung 58: Neuronales Differenzierungsprotokoll	89
Abbildung 59: Schematische Verteilung der Marker im Stadium der neuralen Rosetten	97
Abbildung 60: Schematischer Zusammenhang zwischen der olfaktorischen Differenzierung und der embryonalen Entwicklung.....	100
Abbildung 61: Schematische Zusammenfassung der Expression von publizierten Marker in den Differenzierungsstadien	104
Abbildung 62: Schematischer Zusammenhang zwischen den olfaktorischen Markern und den Differenzierungsstadien	104
Abbildung 63: Publierte Signalkaskaden in der olfaktorischen Neurogenese	106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der Zelltypen im olfaktorischen Epithel	18
Tabelle 2: Zusätze während der neuronalen Differenzierung.....	24
Tabelle 3: Software und Internetressourcen	24
Tabelle 4: Oligonukleotide für qRT-PCR	25
Tabelle 5: Oligonukleotide für Genexpressionsanalyse	25
Tabelle 6: Vektoren	26
Tabelle 7: Primär- und Sekundärantikörper	26
Tabelle 8: gebrauchsfertige Reaktionslösungen	28
Tabelle 9: Chemikalienverzeichnis	28
Tabelle 10: In der Zellkultur verwendete Basismedien	29
Tabelle 11: Auflistung der Zusätze für die Zellkultur.....	29
Tabelle 12: Verwendete Zytokine und Wachstumsfaktoren in der Zellkultur	30
Tabelle 13: Verwendete Geräte	30
Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien	31
Tabelle 15: Verwendete Marker für Keimblattdifferenzierung und Pluripotenzfärbung	34
Tabelle 16: Medium Test I: Vergleich von fünf verschiedenen Differenzierungsprotokollen	56
Tabelle 17: Medium Test II: Vergleich von sechs verschiedenen Differenzierungsprotokollen	59
Tabelle 18: Potentielle Marker zur Charakterisierung der embryonalen Stadien	98

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
ALK	Anaplastische Lymphom Kinase
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BMP	Bone Morphogenetic Protein
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CO₂	Kohlenstoffdioxid
cPM4E	craniales Plakoden Medium mit den 4 Faktoren am Ende der Differenzierung
cPMoMN	craniales Plakoden Medium ohne Motor-Neuronen Aktivierung
d	Day
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EB	Embryoid Body (embryonale Körper)
et al.	„und andere“
etc.	et cetera
FGF	Fibroblast Growth Factor
FTDA	FGF2/TGFβ/Dorsomorphin/ActivinA
g	Erdbeschleunigung
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GBZ	Globose Basalzellen
GBZ-INP	Immediate Neuronal Precursor/unmittelbare neuronale Vorläufer
GBZ-STEM	multipotente GBZ
GBZ-TA	Transient Amplifying GBZ/vorübergehend sich ausdehnende
GDNF	Glial cell-Derived Neurotrophic Factor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
HSA	Humanes Serum Albumin
IN	direkte neuronalen Vorläuferzellen
in vitro	„im Glas“
in vivo	„im Lebendigen“
iPSZ	Induziert pluripotente Stammzellen
ITS	Insulin/Transferrin/Selenit
kDa	Kilodalton
Ker	Keratinocyten
M24E	Medium 2 mit den 4 Faktoren am Ende der Differenzierung
M2oMN	Medium 2 ohne Motor-Neuronen Aktivierung
MEF	Mouse Embryonic Fibroblasts
ml	Milliliter
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NSZ	Neurale Stammzellen
O₂	Sauerstoff
OKSM	OCT4/KLF4/SOX2/C-MYC
ORN	Olfaktorische Rezeptorneurone
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor

PNS	Peripheres Nervensystem
PPR	Präplakodale Region
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase PCR
RA	Retinsäure
REF	Rat Embryonic Fibroblasts
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
SHH	Sonic Hedgehog
TGFβ	Transforming Growth Factorβ
W	Wochen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Generierung von induzierten Stammzellen

Die menschliche Embryonalentwicklung startet mit der befruchteten Eizelle, die Zygote (Abbildung 1). Im weiteren Verlauf werden Stadien mit verschiedenen Stammzelltypen durchlaufen, die durch unterschiedliches Potential zur Differenzierung gekennzeichnet sind [1]. Die Zygote teilt sich in den nachfolgenden Stunden durch mitotische Furchungsteilung zu den sogenannten Blastomeren und bildet das totipotente Stadium der Morula (8-32 Blastomere). Die Morulazellen besitzen die Eigenschaft, sich zu einem vollständigen Organismus zu entwickeln (Totipotenz) und besitzen somit die Differenzierungskapazität zu embryonalen, extraembryonalen und Plazenta Geweben. Bereits fünf Tage nach der Befruchtung sind die Zellen soweit differenziert, dass sie nur noch pluripotente Eigenschaften besitzen. Pluripotenz beschreibt die Eigenschaft von Stammzellen in die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm differenzieren zu können [2]. Die Blastozyste setzt sich aus der pluripotenten inneren Zellmasse mit den embryonalen Stammzellen und dem Trophoblasten zusammen, der für die Ernährung der Blastozyste wichtig ist und die Anteile der fetalen Plazenta bildet. In der weiteren Differenzierung werden die Zellen immer spezifischer, verlieren ihre globale Pluripotenz und werden multipotent. Sie können nun nur noch in Zellen eines bestimmten Keimblatts differenzieren und zeigen im weiteren Verlauf der Embryogenese charakteristische Stammzeleigenschaften eines Gewebes oder Organs.

Ausgehend von somatischen Zellen kann man diese über den technischen Prozess der Reprogrammierung zurück in den Pluripotenzzustand von embryonalen Stammzellen bringen [1]. Da dieser Vorgang bewusst durch Zellmanipulation geschieht und es sich nicht um ursprünglich embryonale Stammzellen handelt, werden diese Zellen als induziert pluripotente Stammzellen (iPSZ) bezeichnet. iPSZ verfügen über ein nahezu deckungsgleiches Potential wie embryonale Stammzellen [3].

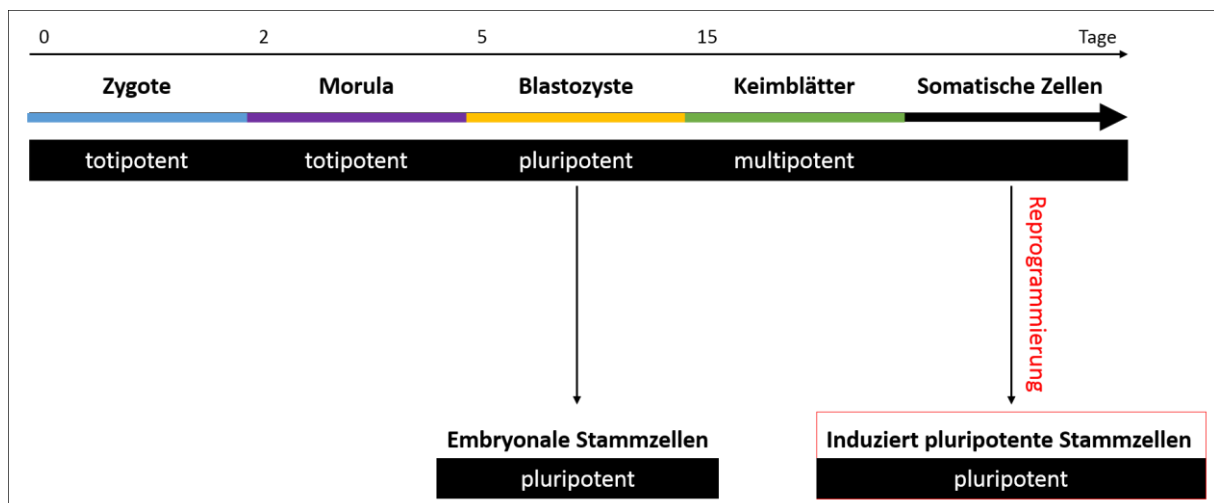


Abbildung 1: Menschliche Entwicklung und ihre Stammzellstadien

Während der humanen Entwicklung durchlaufen die Zellen verschiedene Potenzstadien. Die Blastozyste, die sich am fünften Tag der Entwicklung bildet, verfügt über pluripotente embryonale Stammzellen. Ausgehend von adulten, somatischen Zellen können induziert pluripotente Stammzellen durch den Prozess der Reprogrammierung gewonnen werden. Diese Zellen verfügen über fast identische Eigenschaften wie embryonale Stammzellen.

1.1.1. Reprogrammierung

2007 erfolgte der Durchbruch in der humanen Stammzellforschung. Unabhängig voneinander publizierten drei Arbeitsgruppen eine Methode, mit der humane somatische Zellen zu induziert pluripotenten Stammzellen (iPSZ) reprogrammiert werden können [4-6]. Pluripotenz, eine Eigenschaft von embryonalen Stammzellen im Blastozysten-Stadium, kann *in vitro* durch die ektopische Überexpression von bestimmten Transkriptionsfaktoren erreicht werden. Diesen Prozess bezeichnet man als Reprogrammierung (Abbildung 2). *OCT4*, *SOX2* und *NANOG* sind die Transkriptionsfaktoren, die in pluripotenten Zellen am höchsten exprimiert werden und das Pluripotenz-Netzwerk aufrechterhalten [7-9]. Eine ektopische Überexpression von beispielsweise *OCT4* und *SOX2* zusammen mit *KLF4* und *C-MYC* führt zu Pluripotenz in adulten somatischen Zellen von einer Vielzahl von Spezies [4, 10]. Alle Gene zusammen werden technisch auch als OSKM bezeichnet und werden am häufigsten für die Generierung von iPSZ verwendet. Der gesamte Prozess der Reprogrammierung erstreckt sich über mehrere Wochen. Diese Zeitspanne variiert je nach Ausgangszelle und Reprogrammierungstechnik. Für die Generierung von iPSZ wird eine primäre Zelllinie aus dem adulten Organismus benötigt. In den ersten Publikationen zur Reprogrammierung wurden Fibroblasten aus Hautstanzen verwendet, da sie leicht zugänglich sind und sich mühelos in Kultur halten lassen [11]. Im Laufe der letzten Jahre sind immer mehr Publikationen veröffentlicht worden die zeigen, dass man aus vielen somatischen Zellen iPSZ generieren kann. Dies können z.B. Keratinozyten, Leukozyten, Hepatozyten oder Zellen aus dem Urin sein [12]. Als Transfervektor für die Überexpression der vier Transkriptionsfaktoren wurden in den Erstpublikationen gentechnisch veränderte Retroviren verwendet. Die Effizienz dieses Prozesses liegt bei ca. 0,05 % wobei der Wert je nach Ausgangsmaterial variieren kann. Dieser geringe Wert macht es generell sehr schwer, den genauen Ablauf der Reprogrammierung auf Einzelzellebene nachzuvollziehen. Durch Zugabe von bestimmten Morphogenen und Chemikalien zusammen mit der Verwendung eines Lentivirus-basierten Systems und verbesserten viralen Kassetten kann die Effizienz bis auf zehn Prozent gesteigert werden [13]. Lentiviren gehören ebenfalls zur Familie der Retroviren und besitzen im Gegensatz zu den Retroviren die Fähigkeit, mitotisch inaktive und terminal differenzierte Zellen zu infizieren. Wie es während der Reprogrammierung zur gerichteten Anpassung des Transkriptomts kommt, ist noch nicht zur Gänze geklärt. Dabei werden Genexpressionsprofile einer bestimmten Zellart weitgehend gelöscht oder verändert, so dass die Stammzelle entstehen kann. Der Prozess der genetischen Umgestaltung erfolgt dabei nicht nur direkt auf Transkriptions-Ebene, sondern greift auch stark in epigenetische Prozesse ein. Methylierung und Demethylierung von Promotoren sowie viele andere posttranskriptionale und posttranslationale Veränderungen geschehen während dieses Prozesses [14]. Jedoch ist noch nicht vollständig erforscht, wie und warum nicht alle somatischen Zellen vollständig zu iPSZ reprogrammiert werden. Diese, wenn auch eine geringe Zahl von Zellen während der Reprogrammierung stellen eventuell ein Risiko zur Tumorentstehung dar.

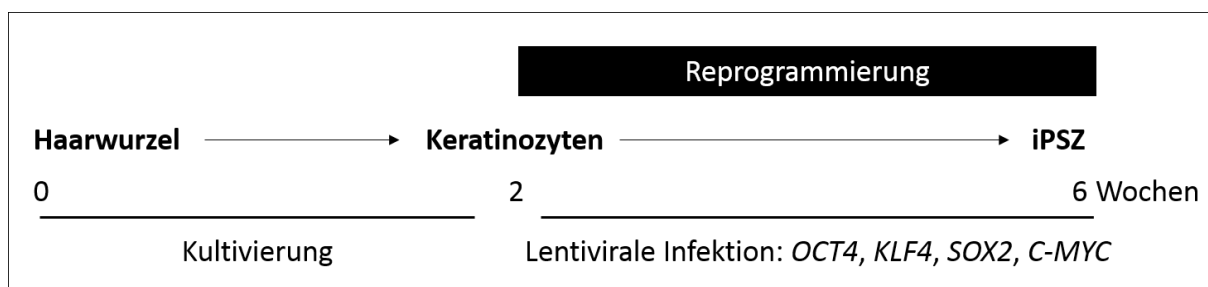


Abbildung 2: Reprogrammierung von primären somatischen Zellen, am Beispiel von Keratinozyten

Somatische Zellen, hier Keratinozyten werden aus Haarwurzeln gewonnen, kultiviert und anschließend für etwa vier Wochen reprogrammiert. Dieser Prozess wird durch die lentivirale Infektion der vier Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* und *C-MYC* erzielt. Nach Abschluss der Reprogrammierung erhält man induziert pluripotente Stammzellen (iPSZ).

1.1.2. Reprogrammierung von Keratinozyten

Im vorherigen Kapitel wurde bereits auf die Reprogrammierung von primären humanen Zellen eingegangen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden humane Haarwurzeln als Ausgangsmaterial für die Entwicklung des Differenzierungsprotokolls verwendet. Die aus der äußeren Haar-Wurzelscheide gewonnenen Keratinozyten finden als somatische Zelllinie für die Reprogrammierung in der aktuellen Forschungswelt bisher nur wenig Beachtung und sollen hier näher beschrieben werden.

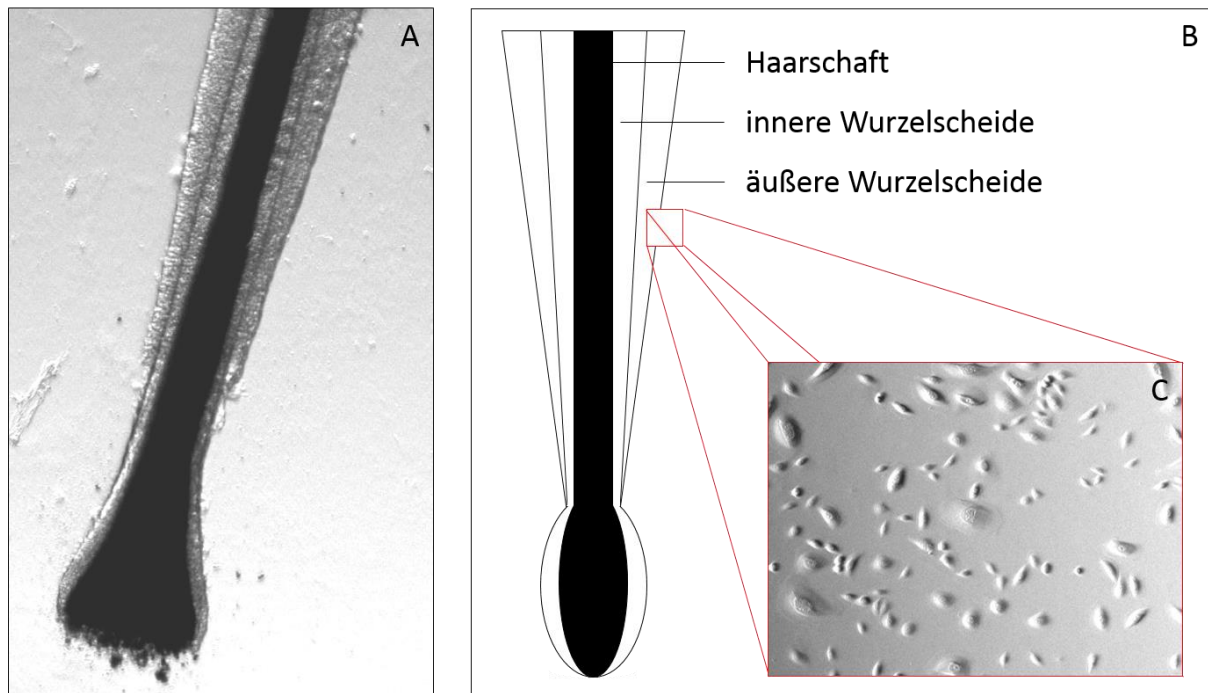


Abbildung 3: Lichtmikroskopische und schematische Darstellung einer Haarwurzel mit Keratinozyten

Die Abbildungen zeigen die lichtmikroskopische (A) und schematische (B) Darstellung einer menschlichen Haarwurzel. Keratinozyten (C) wachsen aus der äußeren Wurzelscheide der Haarwurzel aus und dienen als primäre Zelllinie zur Reprogrammierung.

Keratinozyten findet man neben der Basalschicht der Epidermis auch in der Wurzelregion von Haaren (Abbildung 3) [15]. Der große Vorteil dieser primären Zellen ist, dass die Gewinnung der Haarwurzeln nicht-invasiv und nahezu schmerzlos von freiwilligen Spendern erfolgen kann. Nach einigen Tagen in calciumfreiem Kulturmedium wachsen die Keratinozyten aus der weißen Haarwurzelscheide aus und lassen sich einige Passagen in Kultur halten [16]. Steht genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung, können Keratinozyten mit dem gentechnisch veränderten Lentivirus infiziert werden [17]. Nur erfolgreich infizierte Zellen werden zu Stammzellen reprogrammiert, während die nicht infizierten Keratinozyten durch die hohe Calciumkonzentration im Reprogrammierungsmedium absterben. Der gesamte Prozess der Reprogrammierung erstreckt sich über drei bis vier Wochen auf einer sogenannten Ammenzellschicht, die in unserem Fall aus mitotisch inaktiven murinen embryonalen Fibroblasten besteht. Nach erfolgreicher Beendigung des Prozesses können die Stammzellkolonien manuell von den Ammenzellen abgenommen und auf ein Ammenzell-freies Kultursystem gegeben werden [17].

1.1.3. Humane induziert pluripotente Stammzellen

Pluripotente Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die einen sehr kurzen Zellzyklus [18] und ein charakteristisches Genexpressionsprofil besitzen [19]. Sie haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können alle Zelltypen des Körpers bilden, mit der Ausnahme des extraembryonalen Gewebes [20]. Unter *in vitro* Bedingungen neigen humane induziert pluripotente Stammzellen dazu, spontan zu differenzieren. Dies kann durch eine gezielte Zugabe von Faktoren verhindert werden, was zusätzlich die Selbsterneuerung der Zellen fördert. Zu diesen Stoffen zählen unter anderem Insulin-Transferrin-Selen, ActivinA, FGF2, TGF β und Dorsomorphin [21].

Um eindeutig beweisen zu können, dass es sich bei den generierten Zellen um pluripotente Stammzellen handelt, sind mehrere Nachweise in Kombination wichtig. Neben immunzytochemischen Färbungen, der Detektion der spezieller Ribonukleinsäure (RNA) und epigenetischen Nachweisen kann man makroskopisch die Morphologie der Zellen begutachten [22]. SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81 sind Beispiele für Oberflächenmarker von pluripotenten Zellen, die mit zunehmender Differenzierung der Zellen verschwinden, einhergehend mit dem Verlust der Pluripotenz [23-25]. Auf epigenetischer Ebene, die post-transkriptionale oder translationale Veränderungen umfasst, können Methylierungsmuster von bestimmten Promotoren analysiert werden [26]. Hier werden insbesondere Umgestaltungen der Promotoren von Genen des Pluripotenznetzwerks herangezogen, beispielsweise Demethylierung der Promotoren von *OCT4*, *NANOG* etc. Ein weiterer Nachweis der Pluripotenz erfolgt durch die Differenzierung der iPSZ in alle drei Keimblätter, wodurch die charakteristische Eigenschaft der Stammzellen belegt werden kann [11].

Ein großer Vorteil von iPSZ liegt in der Generierung von Patienten-spezifischen Zellen. Dabei werden somatische Zellen von Patienten mit einer bestimmten genetischen Erkrankung entnommen und anschließend reprogrammiert. Die Stammzellen und differenzierten Zellen umfassen die gleiche genetische Information wie die primäre Zelllinie. Das Ziel ist es, durch die Analyse der erkrankten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen ein mögliches Verständnis für die zugrundeliegende Erkrankung zu bekommen. In einem nächsten Schritt kann versucht werden, mithilfe der differenzierten Zellen auf eine mögliche Heilung der Erkrankung hinzuarbeiten. Beispielsweise können an den Zellen präventive oder therapeutische Medikamente getestet werden. Die aktuelle Forschung befasst sich bereits intensiv mit neurodegenerativen, metabolischen oder kardiovaskulären Erkrankungen.

1.2. Differenzierung von induzierten Stammzellen zu Neuronen

Stammzellen eignen sich hervorragend als Ausgangspunkt für weitere Differenzierungen. Durch ihre unbegrenzte Teilungsfähigkeit können sie theoretisch endlos lange in Kultur gehalten werden. Da die iPSC außerdem pluripotent sind, können sie in nahezu alle Zelltypen des menschlichen Organismus differenzieren. Es gibt in der aktuellen Fachliteratur viele publizierte Protokolle für die Differenzierung in organspezifische Zelltypen, wie Cardiomyozyten [27], Hepatozyten [28] oder alveolare Epithelzellen [29]. Durch die gezielte Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen kann die Differenzierung auch in verschiedene neurale und neuronale Subtypen des Ektoderms erfolgen. Will man eine Mischung aus neuronalen Zellen (Nervenzellen und Neuroglia), eignen sich allgemeine oder ungerichtete Protokolle [30]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit steht die Differenzierung zu Neuronen im Fokus. Alle Protokolle haben eines jedoch gemein, dass immer eine Mischpopulation aus allen Neuronen entsteht. Der jeweilige Anteil an den gewünschten Zellen kann jedoch mit besonderen Zusätzen oder Verfahren begünstigt werden, wodurch der Anteil auf bis zu neunzig Prozent erhöht werden kann [31].

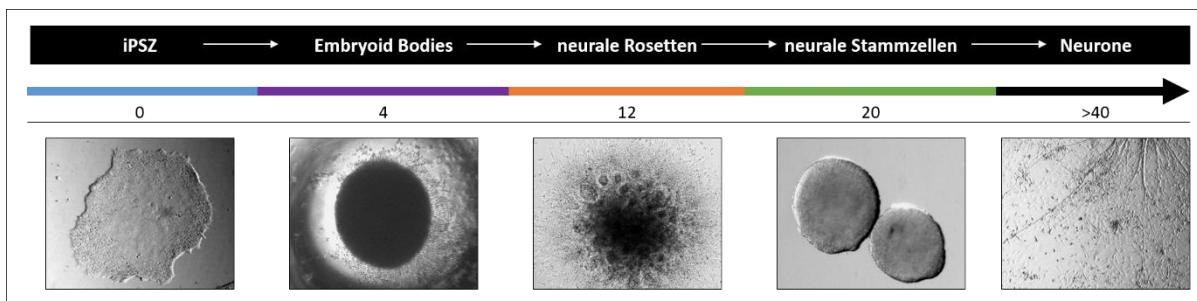


Abbildung 4: Übersicht über ein neuronales Differenzierungsprotokoll

Ausgehend von induziert pluripotenten Stammzellen (iPSZ) wird während eines neuronalen Differenzierungsprotokolls das Stadium der embryonalen Körper durchlaufen. Dem folgt das achttägige Rosetten Stadium. Nach weiteren acht Tagen bilden sich die neuronalen Stammzellen aus denen sich Neurone entwickeln.

Bei einem neuro-ektodermalen Differenzierungsprotokoll werden verschiedene, aufeinanderfolgende Stadien durchlaufen (Abbildung 4). Der Ausgangspunkt für jede Differenzierung bildet das iPSC Stadium. Embryonale Körper (engl. Embryoid Bodies - EBs) entstehen aus einer Einzelzellsuspension von Stammzellen, die in Suspensionsplatten für vier Tage kultiviert werden. EBs repräsentieren im Wesentlichen den Embryo während der Gastrulation (Entstehung der Keimblätter). Plattiert man diese anschließend wieder adhären aus, bilden sich sogenannte neurale Rosetten. Hierbei handelt es sich nicht um eine einzige Rosette, die das embryonale Neuralrohr nachbildet, sondern vielmehr um die Aneinanderlagerung von vielen einzelnen Rosetten radiär um den ausplattierten und abgesetzten EB [32]. Nimmt man die auswachsenden Zellen nach weiteren acht Tagen wieder in Suspensions-Kultur, so bilden sich sphärische Gebilde mit einem hohen Anteil an neuronalen Stammzellen (NSZ). Bei diesen Zellen handelt es sich um multipotente Stammzellen, die zu allen neuronalen Subtypen differenzieren können [33]. Am Ende des mindestens vierzig Tage andauernden Protokolls entstehen wiederum adhären auswachsende Neurone. Neben diesen definierten Schritten der Kultivierung wird zusätzlich durch die gezielte exogene Zugabe von Wachstumsfaktoren die Zellproliferation und die Differenzierung in bestimmte Zelltypen gefördert.

1.3. Das olfaktorische System

Das olfaktorische System umfasst das gesamte Sinnesorgan, ausgehend von der Aufnahme der Duftstoffe, die Verarbeitung der Odoranten über die nachgeschaltete Signalkaskade in den Rezeptorneuronen des olfaktorischen Epithels und die Umschaltung der Signale in dem primären olfaktorischen Cortex. Die Weiterverschaltung und Verarbeitung der aufgenommenen Geruchseindrücke erfolgt in dem sekundären bzw. tertiären olfaktorischen Cortex. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird auf die Entwicklung und Neurogenese des olfaktorischen Epithels näher eingegangen.

1.3.1. Embryonale Entwicklung des olfaktorischen Systems

Nach aktuellem Stand der Forschung entstehen alle sensorischen Plakoden aus einer gemeinsamen Präplakodalen Region (PPR). Bei den Sinnesplakoden handelt es sich um ein spezialisiertes, neuronales Epithel aus multipotenten Zellen außerhalb des zentralen Nervensystems [34].

Im Stadium der späten Neuralplatte findet sich gleichzeitig neben der Neuralplatte die Präplakodale Region. Die Progenitorzellen dieser Region liegen zwischen dem Oberflächenektoderm und der Neuralleiste (Abbildung 5). In diesem Stadium exprimieren die Progenitorzellen Gene, die sie multipotent und undifferenziert lassen. Wichtige Gene, um diesen präplakodalen Zustand aufrecht zu erhalten, sind unter anderem *EYA1,2* und *SIX4* [35, 36]. Im Verlauf der embryonalen Entwicklung differenziert sich die PPR in einen anterioren und posterioren Bereich. Aus der anterioren Präplakodalen Region entwickelt sich im weiteren Verlauf die Adenohypophyse, Linse und olfaktorische Plakode. Noch undifferenziert kennzeichnet sich die anteriore PPR durch die Genexpression von *GBX2*, *FOXI3* und *PAX8* aus. Aus dem posterioren Bereich, der eine hohe Genexpression von *DMRTA1*, *FOXE3* und *PAX6* aufweist, entwickelt sich zum Stadium der späten Neurulation die epibranchiale Plakode und die Ohr-Plakode. Die Trigeminal Plakode differenziert aus einem Bereich, der zwischen dem anterioren und posterioren Bereich der PPR liegt [37, 38]. Interessanterweise können alle Zellen innerhalb der PPR zu dem Zeitpunkt der späten Neuralplatte zur Linsen-Plakode differenzieren [39]. Sollen aber andere Plakoden entstehen, muss die Differenzierung zur Linse gehemmt werden. Sobald sich die zukünftigen Plakodengebiete herausgebildet haben, führen lokale Signalkaskaden dazu, dass keine weitere Differenzierung zu anderen Plakoden erfolgt, und die eigentliche spezifische Differenzierung weiter fortläuft. Somit wird für jede reife Plakode eine typische Kombination von Genen exprimiert [35, 36, 40-42].

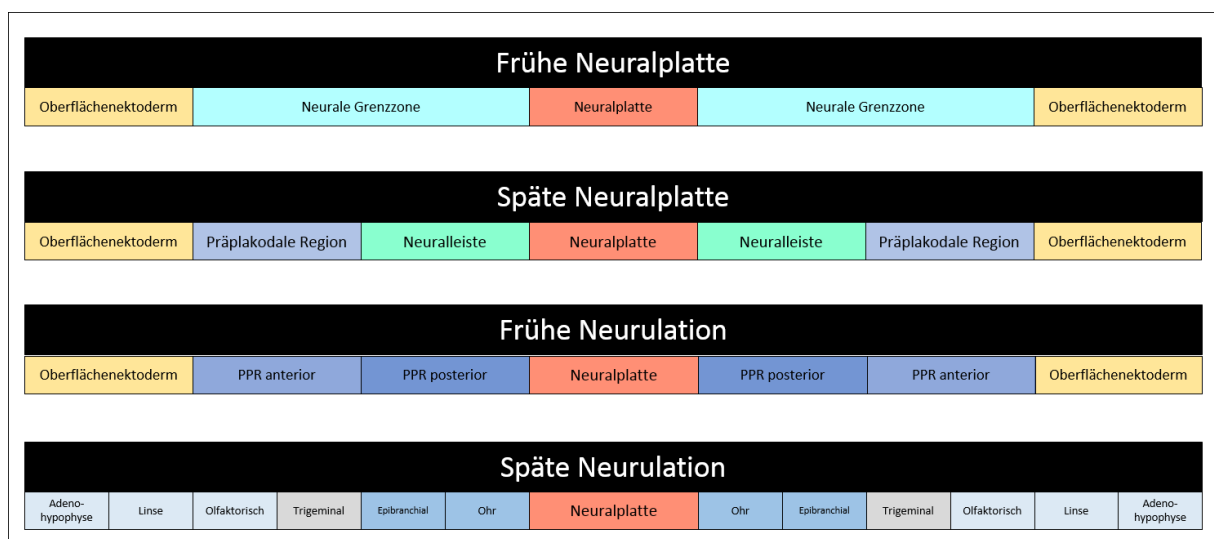


Abbildung 5: Entwicklung der olfaktorischen Plakode

Die Präplakodale Region (PPR) befindet sich im Stadium der späten Neuralplatte zwischen der Neuralleiste und des Oberflächenektoderms. In der weiteren Entwicklung bilden sich aus der Präplakodalen Region zwei abgrenzbare Bereiche heraus: die anteriore PPR und die posteriore PPR. Aus diesen spezifischen Bereichen wiederum entwickeln sich zum Zeitpunkt der späten Neurulation die eigentlichen sensorischen Plakoden. Jeder Bereich lässt sich durch spezifische Genexpressionsmuster charakterisieren.

Zum Zeitpunkt von dreißig bis vierzig Tagen nach Befruchtung weist der Embryo eine Serie von paarigen, oberflächlichen Ausstülpungen in der rostralateralen Kopfregion oberhalb der Mundöffnung auf (Fazialregion), aus denen sich die spätere Nase herausbildet [43, 44]. In der transversalen Ebene des Embryos kann man alle fünf fazialen Verdickungen erkennen (Abbildung 6). Am Ende der sechsten Woche differenziert die Nasenhöhle und bildet das Epithel des nasalen Ausgangs. Die Riechplakoden senken sich zu Riechgruben ein, das Epithel der Plakode und das angrenzende Mesenchym bilden die Nasenhöhle. Diese ektodermalen Regionen proliferieren, verdicken sich und bilden anschließend die olfaktorischen Gruben. Aus der olfaktorischen Plakode entwickeln sich olfaktorische Rezeptorneurone (ORN), Stützzellen und weitere Neurone, welche unter anderem die olfaktorischen Markerproteine Calbindin und GnRH exprimieren [45-47]. Zudem entwickeln sich adulte neurale Stammzellen (NSZ) aus der Plakode, die die ORN das gesamte Leben lang erneuern [48, 49]. Die Entwicklung des olfaktorischen Epithels führt zu einem pseudostratifiziertem Neuroepithel, das aus verschiedenen Zelltypen besteht [50]. Die innere Basalschicht besteht aus zwei Zelltypen, den Globosen und Horizontalen Stammzellen. Die Zwischenschicht enthält die sensorischen Neurone, die zur apikalen Schicht aufsteigen, je reifer sie werden. In der apikalen Schicht finden sich die reifen Neurone, sowie Zellkörper und Zellkerne der Stützzellen. Am Ende der siebten Woche wachsen Axone aus den primären Neuronen aus und dringen in den kranialen Teil des Telencephalons ein. Ein Auswachsen des Bulbus Olfactorius erfolgt, nachdem die Axone der primären olfaktorischen Rezeptorneurone dort angekommen sind und anfangen mit den sekundären Neuronen, den Mitralzellen, Synapsen zu bilden [51]. Wenn die Axone der primären ORN den Bulbus Olfactorius erreichen, lagern sich die Hüllzellen um die Axone. Die Verknöcherung des Siebbeins umrunden diese Axone und bildet die durchlöchernte Siebplatte [52, 53].

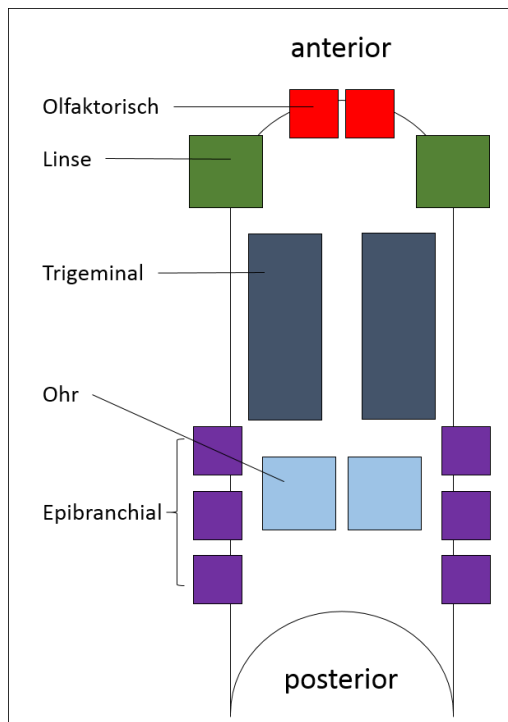


Abbildung 6: Darstellung der paarigen Plakoden im Stadium der späten Neurulation

In der Transversalebene durch den Embryo zum Zeitpunkt der späten Neurulation lassen sich die fünf kranialen Plakoden identifizieren. Man findet die olfaktorische, trigeminale und epibranchiale Plakode, sowie die Ohr- und Linsen Plakode.

1.3.2. Wichtige Wachstumsfaktoren während der Entwicklung des olfaktorischen Systems

An der Entwicklung der Präplakodalen Region und der olfaktorischen Plakode sind zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren beteiligt, darunter Retinsäure, Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) und knochenmorphogenetischen Proteine (BMP) (Abbildung 7). Diese Stoffe werden von dem sich entwickelnden olfaktorischen Epithel und dem umgebenden Mesenchym gebildet und freigesetzt [54]. Der generelle Prozess der Signalwege zwischen dem Mesenchym und dem Epithel ist nicht spezifisch im olfaktorischen System anzutreffen, man findet sie auch beispielsweise in der Entwicklung der Extremitäten, der Branchialbögen und der Entwicklung der unteren Motoneurone [55].

Von der großen Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren spielt hauptsächlich FGF8 eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung der olfaktorischen Plakode. FGF8 induziert die Expression des Präplakodale Region Markers *EYA*, was zu der Spezifizierung der Plakoden Vorläuferzellen in Richtung olfaktorische Plakode führt [56]. Zusätzlich werden vom anliegenden Mesoderm und der Neuralplatte weitere FGFs exprimiert [57-59]. Der FGF-Signalweg ist demnach entscheidend an der Bildung des olfaktorischen Epithels und der sensorischen Neurone beteiligt [60, 61]. In der frühen Entwicklung wirken BMPs zusammen mit dem Wnt-Signalweg hauptsächlich auf die Ausbildung der Neuralleistenzellen [62]. Die komplette Reduktion der BMP-Expression ist notwendig für die Differenzierung der Präplakodalen Region. Im Stadium der späten Neuralplatte werden von den Zellen der Neuralleiste BMP-Antagonisten, FGF und PDGF exprimiert. Bei der Bildung der olfaktorischen Plakode aus der anterioren PPR sind wiederum BMPs involviert. Dabei entsteht bei niedriger Konzentration und kurzer Exposition zu den BMPs bevorzugt Nasen-, anstatt Linsendifferenzierung. Unklar ist jedoch, ob BMPs direkt Einfluss auf die Plakodenvorläufer oder auf Progenitoren nimmt, die im Verlauf zu olfaktorischen Zellen werden [60]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der Retinsäure-Signalweg zwischen der Plakode und dem Mesenchym entscheidend für die molekulare und zelluläre Vielfalt im olfaktorischen Epithel ist [63, 64]. In der Publikation von Paschaki et al. 2013 konnte gezeigt werden, dass Retinsäure für die initiale Induktion der olfaktorischen Plakode nicht notwendig ist, jedoch eine wichtige Rolle in der Neurogenese innerhalb des Neuroepithels spielt. Dabei kontrolliert Retinsäure die korrekte Bildung der olfaktorischen Rezeptorneurone, indem es die Entwicklung von frühen Progenitoren zu olfaktorischen Vorläuferneuronen reguliert. Der Verlust von Retinsäure in Huhn- und Mausmodellen führt zu einer reduzierten Selbsterneuerung der

olfaktorischen Vorläufer und zu einer verringerten Differenzierungskapazität zu reifen Rezeptorneuronen. Die Kapazität zur Selbsterneuerung der olfaktorischen Neurone wird somit gehemmt, wenn das olfaktorische Epithel nicht in der Lage ist, Retinsäure zu synthetisieren [65]. Zusammenfassend kann man sagen, dass der zeitliche oder räumliche Zusammenschluss von verschiedenen Signalen darin resultiert, dass sich die Plakodenvorläufer spezialisieren. FGF-vermittelte Signale fördern dafür zunächst ein präneurales Stadium, das multipotente Neuronale-, Neuralleisten- und Plakoden- Vorläuferzellen umfasst. BMP-Signalwege fördern nicht-neurale Eigenschaften und limitieren die Größe der Neuralplatte. Durch ein sehr fein abgestimmtes Zusammenspiel der Wnt-, BMP- und FGF-Signalwege entstehen aus den multipotenten PPR Zellen die einzelnen kranialen Plakoden. Jedoch ist der genaue Mechanismus der zusammenspielenden Signalkaskaden noch nicht vollständig geklärt [56].

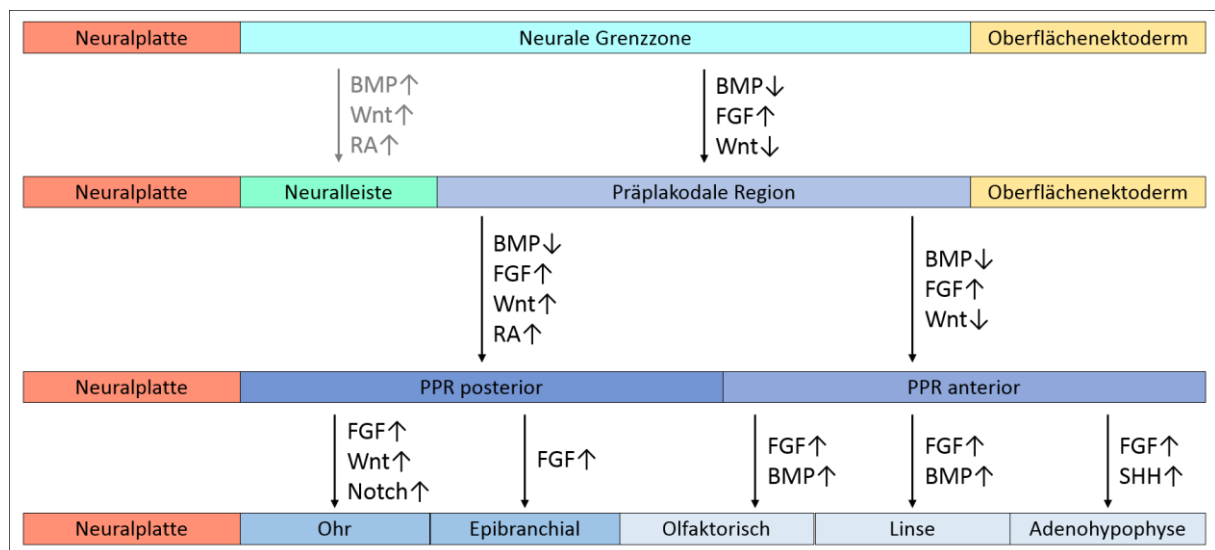


Abbildung 7: Beteiligung von Wachstumsfaktoren an der Plakodenentwicklung

Mitglieder der FGF- und BMP-Familie sind bei der Entwicklung der Präplakodalen Region aus der neuralen Grenzzone beteiligt. An der weiteren Differenzierung zu den einzelnen Plakoden, wie Ohr, Nase oder Linse sind nur wenige Morphogene involviert, jedoch ist deren zeitliche Abfolge und Konzentration dafür entscheidend, wie sich das jeweilige Gewebe weiterentwickelt. Der genaue Mechanismus, wie sich aus dem frühen, noch nicht definitiv neuronalen Gewebe die Plakoden entwickeln, ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.3.3. Aufbau des olfaktorischen Epithels

Die Riechschleimhaut der Nasenhöhle weist zwei unterschiedliche, histologisch definierte Bereiche auf. Der größte Teil der oberen Atemwege besteht aus dem respiratorischen Flimmerepithel, also Epithelzellen, die mit Kinozilien besetzt sind, und dient der Reinigung und Anfeuchtung der Atemwege. Neben dem respiratorischen Epithel findet sich das olfaktorische Epithel, der Ort an dem die Signalkaskade für den Riecheindruck stattfindet. Histologisch gesehen handelt es sich hierbei um ein mehrreihiges, hochprismatisches Säulenepithel ohne Becherzellen, das höher ist als das respiratorische Epithel [66]. Das olfaktorische Epithel besteht aus vier primären Zelltypen, die sich von basal zu lateral identifizieren lassen (Abbildung 8): Basalzellen, Stützzellen, olfaktorische Rezeptorneurone und ihre Vorläufer, sowie Bowman Drüsenzellen [67]. An der basalen Seite des Neuroepithels, der Siebplatte zugewandt, finden sich die adulten Stammzellen, aus denen durch asymmetrische Zellteilung die sensorischen Neurone hervorgehen [68]. Dies erklärt die Vorläuferzellen, die sich in unterschiedlichen Differenzierungsstadien im Epithel befinden [69]. Zur Nasenhöhle hin finden sich die reifen Rezeptorneurone, die von Stützzellen umgeben sind. Zudem

liegen in der Lamina propria Bowman Drüsenzellen, die Mukus produzieren. In den folgenden Kapiteln soll auf die einzelnen Zellpopulationen des olfaktorischen Epithels näher eingegangen werden.

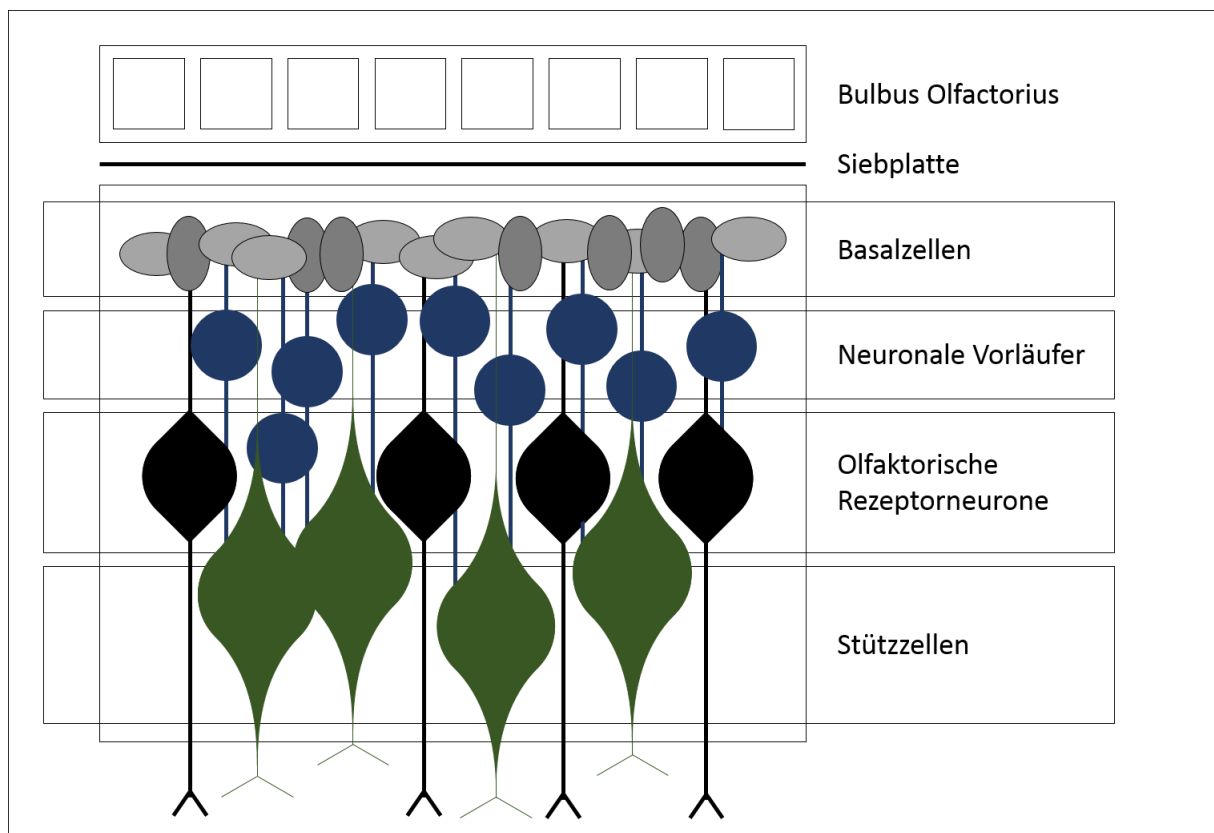


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des olfaktorischen Epithels

Basalzellen differenzieren zu neuronalen Vorläuferzellen und wandern in Richtung Nasenhöhle. Zwischen den Rezeptorneuronen befinden sich Stützzellen, die den Zellen Halt geben. Spezielle olfaktorische Drüsen sekretieren den Mukus zur Oberfläche (nicht dargestellt). Die Axone der sensorischen Neurone bündeln sich zum Nervus Olfactorius und ziehen durch die Siebplatte zu den Glomeruli im Bulbus Olfactorius (nicht gezeigt). Direkten Kontakt mit der Außenwelt haben reife olfaktorische Rezeptorneurone über ihren Zilien (Dendritische Strukturen) in der Mukosa.

1.3.3.1. Basalzellen und ihre spezifischen Marker

Olfaktorische Basalzellen befinden sich in der basalen epithelialen Schicht. Zwei Typen von adulten Stammzellen lassen sich im olfaktorischen Epithel identifizieren: Rundliche Globöse Basalzellen (GBZ) und abgeflachte Horizontale Basalzellen (HBZ).

Die Horizontalen Basalzellen liegen der Basalmembran auf, besitzen epitheliale Intermediärfilamente, sind immunreaktiv gegen Zytokeratin14, Zytokeratin5 und exprimieren keine neuronalen Marker [70]. Ein weiterer charakteristischer Marker für HBZ ist ICAM1/CD54 [71]. Es handelt sich um eher inaktive Gewebstammzellen, deren asymmetrische Teilung eine weitere HBZ und eine multipotente GBZ (GBZ-STEM) hervorbringt. Die HBZ bilden eine Art Reserve, die durch Aktivierungssignale von außen, wie einer Schädigung des olfaktorischen Epithels, aktiviert werden [72, 73]. Die Reserve-Stammzellpopulation der HBZ wird stillgelegt, wenn der Transkriptionsfaktor *P63* exprimiert wird. Umgekehrt werden sie aktiviert, wenn beschädigtes Epithel repariert werden muss und *P63* unterdrückt wird [74]. In Studien von Leung et al. 2007 und Lawi et al. 2008 konnte gezeigt werden, dass HBZ ausreichend sind um alle Zellen des olfaktorischen Epithels regenerieren zu können.

Globöse Basalzellen unterscheiden sich morphologisch und biochemisch von den Horizontalen Basalzellen. In histologischen Schnitten finden sich die GBZ apikal der HBZ, sie sind rund und

Zytokeratin negativ. Die Zellpopulation der Globöse Basalzellen beinhalten multipotente Stammzellen die proliferieren, sich assymetrisch teilen können und somit alle neurale und nicht-neurale Zellen des olfaktorischen Epithels bilden können (Abbildung 9) [75]. In frühen Experiment mit Ratten konnte durch genetische Markierung der proliferierenden Basalzellen das Schicksal dieser Zellen histologisch verfolgt werden [76]. Die Nachkommen dieser mutmaßlichen GBZs, waren HBZs, GBZs, Neurone und Stützzellen [77]. Heutige Experimente zeigen zudem, dass GBZ über die Eigenschaft der Selbsterneuerung und manche Zellen über einen langsamen Zellzyklus verfügen, was sie zu echten Gewebstammzellen macht [78]. Im Jahr 2007 wurde entdeckt, dass das Nonintegrin Laminin Receptor Precursor Protein (67LR/67 kDa Laminin Rezeptor) in olfaktorischen Stammzellen und Vorläuferzellen im olfaktorischen Epithel von Ratten exprimiert wird [79]. Ein Jahr später konnte dieses Protein als RPSA (Ribosomal Protein SA) identifiziert werden. Mithilfe von zweidimensionalem SDS-Western Blot, gefolgt von Tandem Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass es sich um das 40 kDa Laminin Rezeptor Precursor Protein handelt. Es handelt sich hierbei um einen Oberflächenrezeptor auf der Zelloberfläche von Globöse Basalzellen. RPSA eignet sich aufgrund dieser Forschungsergebnisse sehr gut als spezifischer Marker für Globöse Basalzellen, da es die meisten der GBZ, keine Stützzellen oder Horizontale Basalzellen im olfaktorischen Epithel der Ratte erkennt [80].

1.3.3.2. Vorläuferzellen und ihre spezifischen Marker

Sowohl HBZ als auch GBZ sind Gewebestammzellen im olfaktorischen Epithel. Beide können aufgrund von unterschiedlichen Stimuli zur jeweils anderen Zellart differenzieren. Aus den GBZ entwickeln sich lebenslang frühe Vorläufer Populationen (GBZ-TA). GBZ-TA werden im folgenden als Transient Amplifying/vorübergehend sich ausdehnende Zellen bezeichnet. Aus diesen Zellen gehen wiederum eine zweite Linie von Vorläuferzellen, GBZ-INP (INP: Immediate Neuronal Precursor/unmittelbare neuronale Vorläufer) hervor, die sich anschließend teilen, direkte neuronalen Vorläuferzellen bilden (IN) und anschließend zu reifen ORN differenzieren (Abbildung 9) [49, 50, 54, 81, 82]. Nach Schädigung des Gewebes wird der Notch Signalweg aktiviert und *HES1* hochreguliert. Dies bewirkt die Differenzierung der multipotenten GBZ zu Stützzellen. GBZ-STEM können auch zu den anderen nicht-neuronalen Zelltypen, wie Bowman Drüsenzellen differenzieren [67]. Die unterschiedlichen Stufen lassen sich durch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren unterscheiden, wie *ASCL1*, *SOX2*, *NGN1*, *NEUROD1*, *PAX6*, oder *P63* (Abbildung 10). So sind beispielsweise unreife Rezeptorneurone *GAP43* und *TUBB3* positiv [83, 84].

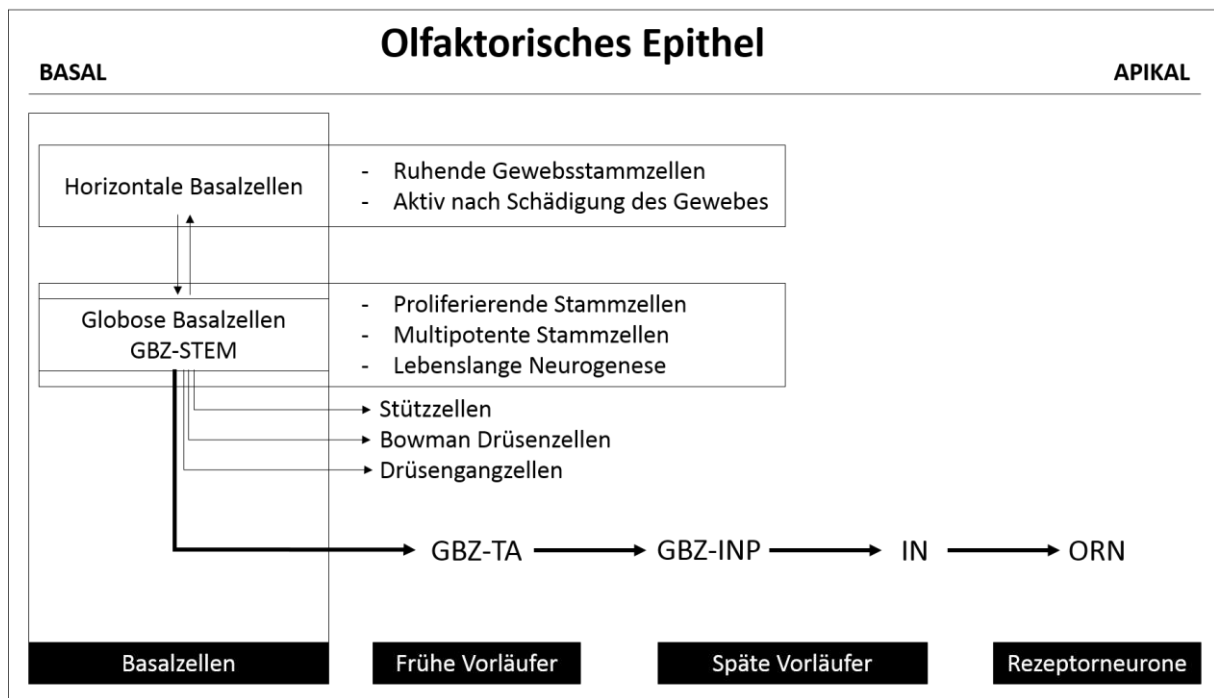


Abbildung 9: Entwicklung der Zelltypen des olfaktorischen Epithels

Im olfaktorischen Epithel findet man zwei Stammzell Populationen mit spezifischen Eigenschaften: Horizontale (HBZ) und Globöse (GBZ) Basalzellen. Aus den multipotenten, proliferierenden Basalzellen (GBZ STEM) entstehen während der Entwicklung frühe (GBZ-TA) und späte Vorläufer (GBC-INP, IN). Diese differenzieren anschließend zu reifen olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN).

ASCL1/MASH1, Neurogenin1 und NeuroD1

In der Entwicklung und Differenzierung der olfaktorischen Zelllinie findet ein Prozess der aufeinanderfolgenden Expression von proneuralen basic Helix-loop-Helix (bHLH) Genen statt. *ASCL1/MASH1* (im Weiteren nur noch als *ASCL1* bezeichnet) und *NEUROGENIN1 (NGN1)* werden von den mitotisch aktiven, frühen Progenitoren exprimiert und induzieren die Expression von weiteren bHLH Genen, wie *NEUROD1* in differenzierenden Neuronen [85]. Die früh exprimierten Faktoren *ASCL1* und *NGN1* sind als richtungsweisende Faktoren in der Selektion der Progenitorzellen involviert, welche die weiteren Vorläuferstadien erreichen und in die Differenzierung übergehen. Faktoren wie *NEUROD1*, die spät exprimiert werden, sind in der terminalen Differenzierung von postmitotischen Zellen involviert [86, 87]. In loss-of-funktion Studien konnte gezeigt werden, dass beide Gene für die Bildung von olfaktorischen Rezeptorneuronen erforderlich sind. Jedoch kann man klare Unterschiede zwischen den gentechnisch veränderten Zelllinien feststellen, was dafürspricht, dass sie voneinander abweichende Funktionen besitzen. In *ASCL1* $-/-$ Mäusen werden keine olfaktorischen Progenitoren gebildet und der Notch Signalweg ist inaktiv. Dies lässt den Schluss zu, dass *ASCL1* ein charakteristisches proneurales Gen ist und entscheidend für die frühe Entwicklung von olfaktorischen Rezeptorneuronen ist [88]. In *NGN1* $-/-$ Mäusen ist der Notch Signalweg aktiv und es werden olfaktorische Progenitoren gebildet, jedoch können diese nicht vollständig ausdifferenzieren. Zudem exprimieren die knockout Zellen nur einen kleinen Teil ihres normalen Repertoires an regulatorischen Molekülen. *NGN1* wird für die Aktivierung eines Signalweges gebraucht, der im Differenzierungsprozess zur ORN nachgeschaltet von *ASCL1* abläuft. Dabei kann *NGN1* den Verlust der richtungsweisende Funktion von *ASCL1* in einer frühen Population von sich entwickelnden Neuronen in der olfaktorischen Plakode kompensieren [85] [89]. Mutationen im *NEUROD1* Gen resultieren in Defekten im Cerebellum und Hippocampus, was auf die abnormale Differenzierung und den Untergang von cerebellären Zellen und Zellen des Gyrus dentatus zurückzuführen ist. Dies zeigt, dass *NEUROD1* für

die Differenzierung und das Überleben von bereits determinierten neuronalen Progenitoren erforderlich ist [90, 91]. Zusammenfassend kann man sagen, dass während der Differenzierung von olfaktorischen Progenitzellen folgende Expression von bHLH Genen stattfindet [92]:

ASCL1 → NGN1 → NEUROD1

Diese Ergebnisse zeigen die Vielseitigkeit von neuronalen bHLH Genen, deren Funktion vom Zeitpunkt der Expression den neuronalen Progenitoren abhängig ist, wodurch sie Einfluss auf die Determination oder Differenzierung nehmen können.

Calretinin

Als weiterer Marker für Vorläuferzellen in der Entwicklung von reifen sensorischen Neuronen aus olfaktorischen Basalzellen kann CALRETININ/CALBINDIN2 (*CALB2*) herangezogen werden. Calretinin codiert für ein intrazelluläres Calcium-Bindeprotein, das bei verschiedenen zellulären Funktionen eine Rolle spielt, wie z.B. dem Abpuffern von intrazellulärem Calcium und der Modulation der neuronalen Erregbarkeit. Neben diesen Aufgaben kommt Calbindin2 auch im olfaktorischen System vor. Während der embryonalen Entwicklung wird *CALB2* transient in den Zwischenstufen exprimiert bevor sie zu reifen olfaktorischen Rezeptorneuronen werden. Es kann in Neuronen zwischen dem Ende der *TUBB3* Expression (auch ein Marker für unreife Neurone) und dem Beginn der *OMP* Expression (Marker für reife ORN) detektiert werden:

TUBB3 → CALB2 → OMP

Demnach kann *Calb2* als Marker für die noch unreifen sensorischen Neurone während der olfaktorischen Neurogenese dienen. Neben diesen Ergebnissen konnte auch gezeigt werden, dass *Calb2* teilweise mit *Tubb3* oder *Omp* co-exprimiert wird, oder komplett alleine vorkam [93].

Aktivierender Transkriptionsfaktor

Der aktivierenden Transkriptionsfaktor (ATF) wird verstärkt in Gebieten mit hoher Proliferation von Neuroprogenitoren exprimiert, fördert dort die Zellexpansion der Neuroprogenitoren und inhibiert die Differenzierung von neuronalen Progenitoren zu Neuronen und Gliazellen [94]. ATF5 wird auch im direkten Bezug zum olfaktorischen System, genauer im Zusammenhang mit dem Überleben und der terminalen Differenzierung von olfaktorischen Rezeptorneuronen beschrieben [95]. Die Expression des Transkriptionsfaktors in dem olfaktorischen Epithel der Maus wurde erst vor einigen Jahren durch in situ Hybridisierung entdeckt [96]. An Tag E11,5 können bereits *Atf5* Transkripte in Zellen beobachtet werden, die die olfaktorischen Plakoden auskleiden. In der adulten Maus wird *Atf5* von einigen unreifen und allen reifen ORN exprimiert. Das Fehlen von *Atf5* führt zu einem massiven Verlust von reifen sensorischen Neuronen, was auf einen Fehler in der Differenzierung zu reifen Zellen und der Einleitung von Apoptose in ORN zurückzuführen ist.

Beta3 Tubulin

Tubuline sind Hauptbestandteile der Mikrotubuli, die Strukturkomponente des Zytoskeletts sind. Damit haben sie Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Zellstruktur, Mitose, Meiose und intrazelluläre Transportereignisse. Beta3 Tubulin (*TUBB3/TUJ1*) wird hauptsächlich im peripheren und zentralen Nervensystem während der fetalen und postnatalen Entwicklung und während der Differenzierung von neuronalen Zelltypen exprimiert [97, 98]. Immunohistochemisch wird *TUBB3* im Zellkörper, Dendriten, Axonen und Axonterminalen von unreifen Neuronen gefunden. *TUBB3* wurde bisher als ein Marker für unreife Neurone verwendet [99]. Die Expression von *TUBB3* zeigt sowohl während der embryonalen Entwicklung von olfaktorischen Rezeptorneuronen, als auch während der Neurogenese im geschädigten adulten olfaktorischen Epithel einzigartige Besonderheiten. Während man in unreifen sensorischen Neuronen eine starke Expression von *TUBB3* in den Zellkörpern findet verschwindet die *TUBB3* Expression auf dramatische Weise in eher reifen Neuronen und beschränkt sich nur noch auf

die Neuriten [84, 100]. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der *TUBB3* Expression im olfaktorischen System um ein konserviertes genetisches Programm handelt, das in der Entwicklung der embryonalen und adulten Rezeptorneurone gleichermaßen abläuft.

Neurales Zelladhäsionsmolekül

Das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) gehört zur Familie der Immunglobuline und ist unter anderem bei der Zelladhäsion, sowie Wachstum und Migration während der Entwicklung beteiligt [101]. Von den neuronalen Zelladhäsionsmolekülen gibt es viele Isoformen, wobei die Form mit einer posttranskriptionalen Veränderung durch Polysialinsäure hauptsächlich in embryonalen Gewebe und in sich entwickelnden und migrierenden Neuronen vorkommt. *NCAM* kann bereits während der frühen Entwicklung in der olfaktorischen Plakode und dem differenzierenden Epithel detektiert werden. In den späteren Stadien wird es in den Axonen der olfaktorischen Rezeptorneurone lokalisiert [102]. Frühe Versuche im olfaktorischen System der Maus zeigen, dass *Ncam* sowohl im adulten, als auch im embryonalen Stadium der Entwicklung in Globöse Basalzellen und sensorischen Neuronen exprimiert wird [103]. In einer Maus-Studie wurde die Expression der neuralen Adhäsionsmoleküle näher untersucht. Bereits im Stadium E12 - E15, noch vor dem Beginn des frühesten Auswachsens der olfaktorischen Axone kommt es im olfaktorischen Nerv und in den ORN vor. *Ncam* ist auf der Oberfläche von ORN und deren Axone zu finden. Das Expressionsmuster lässt folgern, dass *Ncam* mit der Verlängerung und Faszikulation der olfaktorischen Axone assoziiert ist [104].

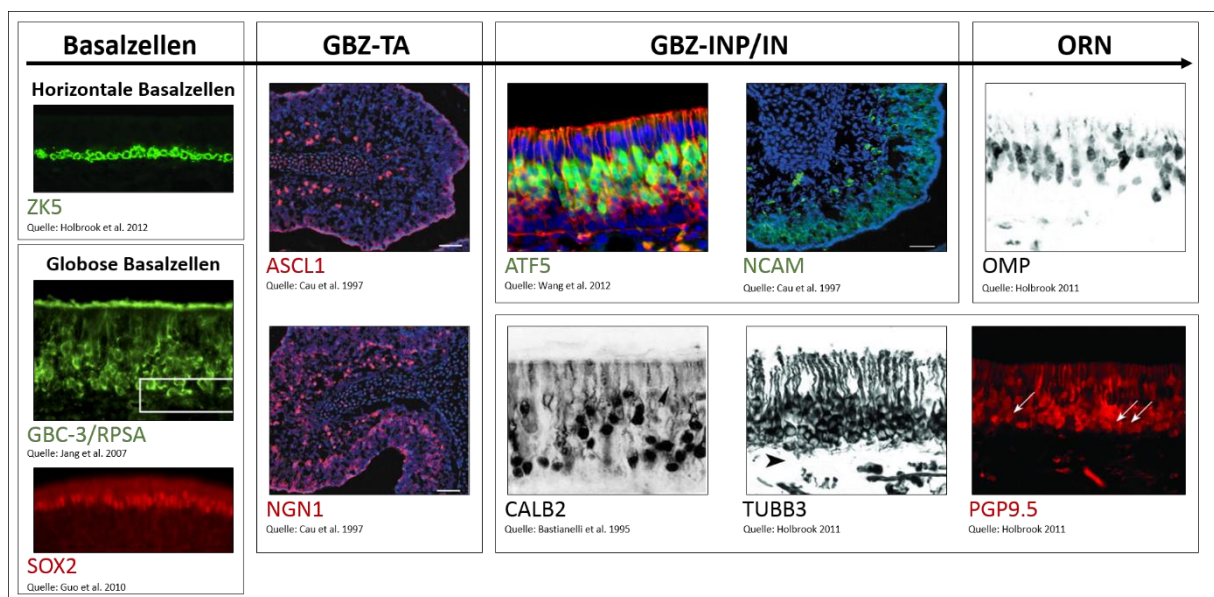


Abbildung 10: Exprimierte Marker während der Entwicklung von Basalzellen zu ORN

Die Abbildung zeigt schematisch die unterschiedlichen Stadien, die während der Differenzierung, ausgehend von den Basalzellen zu reifen olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN), durchlaufen werden. Unter jedem Entwicklungsstadium sind die spezifischen Marker mit Färbungen des olfaktorischen Epithels dargestellt. GBZ-TA ist ein frühes Vorläuferstadium, GBZ-INP und IN sind Stadien von späten olfaktorischen Progenitoren. Olfaktorische Rezeptorneurone zeichnen sich durch eine OMP und PGP9.5 Expression aus.

1.3.3.3. Olfaktorische Rezeptorneurone und ihre spezifischen Marker

Olfaktorische Rezeptorneurone (ORN) sind echte, bipolare Neurone und die einzigen Nervenzellen, die mit der einen Seite über Synapsen mit dem ZNS in Verbindung stehen und mit der anderen Seite direkten Kontakt zur Außenwelt haben. Im Gegensatz zu nahezu allen anderen neuronalen Zellen können ORN lebenslang aus basalen Stammzellen regenerieren. Insgesamt finden sich etwa dreißig bis

ein hundred Millionen sensorische Neurone in der menschlichen Riechschleimhaut. Vom Zellkörper aus zieht ein Dendrit zur Oberfläche des Epithels und endet in einer Knopf-artigen Wölbungen mit fünf bis dreißig sensorischen Zilien, die die sensorische Fläche des Riechepithels vergrößert [105]. Individuelle Odorant-Rezeptoren befinden sich in der Membran der olfaktorischen Zilien. Die bahnbrechende Arbeit von Linda B. Buck und Richard Axel, welche im Jahr 2004 mit dem Nobelpreis in Physiologie oder Medizin ausgezeichnet wurde, führte zu dem Verständnis, dass jedes ORN nur einen von etwa eintausend olfaktorischen Rezeptoren auf den Zilien exprimiert [106, 107]. Bei den Odorant-Rezeptoren handelt es sich genauer um ein sieben-Transmembran G-Protein gekoppeltes Rezeptorprotein, das sich durch die Membran des Rezeptorneurons zieht. Dieser Rezeptor wird bei der Bindung eines spezifischen Odoranten aktiviert und löst eine nachfolgende Signalkaskade aus, die in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Die Aktionspotentiale werden über dünne, unmyelinisierte Axone weitergeleitet, die sich in der Lamina propria zu größeren Axonbündeln (Faszikeln) zusammenlagern und die Fila Olfactoria bilden. Die Gesamtheit der Fila Olfactoria werden als Riechnerv/Nervus Olfactorius oder als erster Hirnnerv bezeichnet.

Es gibt einige Besonderheiten der olfaktorische Rezeptorneurone, die hier nochmals hervorgehoben werden sollen:

- **Sie sind die einzigen Nervenzellen, die in direktem Kontakt mit der Außenwelt stehen.**
- **Sie haben nur eine begrenzte Lebensdauer und werden zeitlebens aus Basalzellen nachgebildet.**
- **Bei Degeneration des olfaktorischen Epithels kommt es zur vermehrten Proliferation der Stammzellen und zum Ersatz der verloren gegangenen Neurone.**

Marker für reife olfaktorische Rezeptorneurone:

In der Literatur sind nur sehr wenige Marker für reife sensorische Neurone des Riechepithels bekannt. Der häufigste und anerkannteste Marker mit dem diese Neurone in Gewebeschnitten und *in vivo* immunologisch detektiert werden können ist das olfaktorische Markerprotein (OMP) (Abbildungen 10,11) [108, 109]. Es kommt spezifisch in reifen, ausdifferenzierten ORN vor, jedoch nicht in unreifen Vorläuferzellen [110-112]. Die *OMP* Expression ist während der Entwicklung reguliert. Beginnend mit dem embryonalen Tag 14 erreicht es sein Maximum im adulten Organismus am postnatalen Tag dreißig und überschneidet sich dabei mit der Bildung der Synapsen zu den nachgeschalteten Neuronen im Bulbus Olfactorius [110, 113]. Die *OMP* Proteinexpression findet man im Zytoplasma, Dendriten und Axonen der Rezeptorneuronen. Obwohl es sich bei *OMP* um ein phylogenetisch hoch konserviertes Protein handelt, ist seine genaue Funktion immer noch unklar. Es wird vermutet, dass *OMP* in die Odorant-vermittelte Signalkaskade einwirkt, indem es die cAMP Kinetik reguliert [114]. Der Verlust von *OMP* führt zu fehlerhaft projizierten olfaktorischen Axonen im Bulbus Olfactorius [115]. Weitere Studien zeigen bei genetischer Manipulation und Deletion von *OMP* eine geringere Reaktionskinetik in der Antwort auf Odorantstimuli, gemessen mit Elektroolfaktogrammen, Einzelzelleableitungen von elektrischen Potentialen und Darstellungen der Calciumströme [116, 117]. In Verhaltenstests zeigen die *OMP* -/- Tiere eine reduzierte Sensitivität gegenüber Odoranten und eine veränderte Odor Diskriminierung [118, 119].

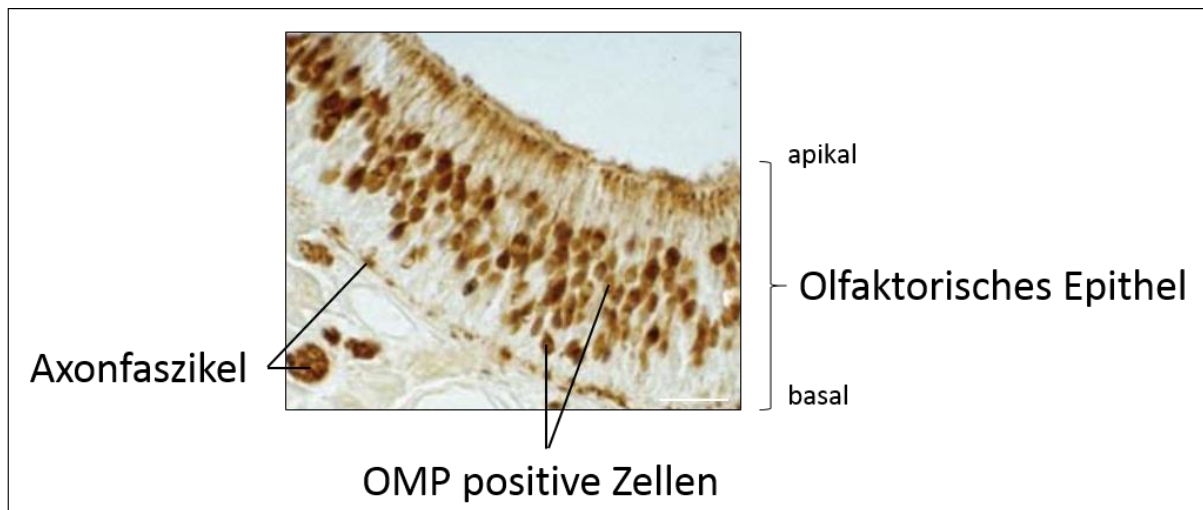


Abbildung 11: Immunhistochemie gegen das olfaktorische Markerprotein (OMP)

Zur spezifischen immunologischen Detektion von reifen olfaktorischen Rezeptorneuronen innerhalb des Reichepithels wurde der Gewebeschnitt mit einem Antikörper gegen das olfaktorische Markerprotein (OMP) inkubiert. Quelle: Handbook of Olfaction and Gustation, Richard L. Doty, Dritte Auflage 2015, Kapitel 4.

Neben dem am häufigsten genutzten Protein OMP zur Detektion von reifen olfaktorischen Neuronen bietet sich auch das trimere G-Protein GOLF/GNAL an [120]. Dieses Gen codiert für eine spezifische G-Protein alpha Untereinheit, welche die Initiation der Signaltransduktion von Odoranten im olfaktorischen Epithel vermittelt (Abbildung 12). Im Jahr 1989 isolierten Jones und Reed [121] das Guanidin Nukleotid-Bindeprotein aus olfaktorischen Zilien und kamen dabei zu dem Schluss, dass es sich bei den Odorantrezeptoren um G-Protein gekoppelte Rezeptoren handeln muss. Das Protein weist eine Sequenzübereinstimmung von 88 Prozent mit cAMP-abhängigen G-Proteinen auf. Neben dem GOLF Protein wurden auch andere G-Proteine in olfaktorischen Rezeptorneuronen identifiziert, jedoch kommen diese hauptsächlich in den Axonen vor sind nicht an Signaltransduktionen beteiligt [122]. Die mRNA von *GOLF* konnte ausschließlich im Neuroepithel der Nase und nicht in anderen getesteten Geweben nachgewiesen werden. Auch zeigte sich, dass innerhalb des Epithels *GOLF* nur von den sensorischen Neuronen exprimiert wird [121]. In Versuchen mit Mäusen, die homozygot kein *Golf* exprimieren, konnte eine reduzierte elektrophysiologische Antwort auf die Stimulation von ORN mit Odoranten beobachtet werden. Neben dieser tiefgreifenden Beeinträchtigung in der Reaktion auf Odoranten sind die Jungtiere nicht in der Lage zu säugen und sterben bereits wenige Tage nach der Geburt. Auch zeigen die Muttertiere ein nur unzureichendes Versorgungs-Verhalten [123]. Aufgrund der Spezifität und der gravierenden Folgen bei Verlust von *GOLF* im olfaktorischen System bietet sich dieses Gen als Marker für reife olfaktorische Rezeptorneurone an.

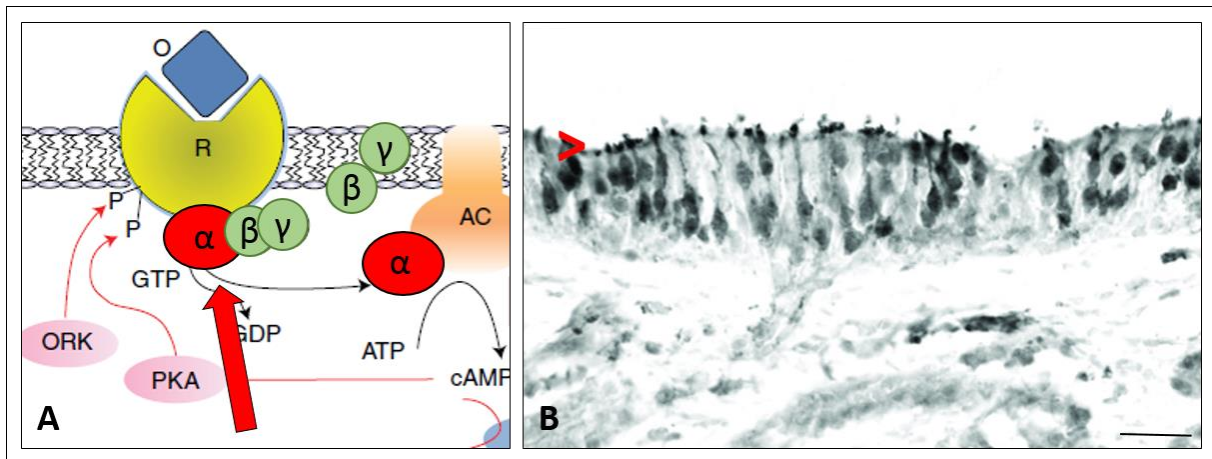


Abbildung 12: Olfaktorisches Epithel mit schematischer Signalkaskade

Abbildung A zeigt schematisch die ablaufende Signalkaskade in der Zilienmembran von Rezeptorneuronen mit Fokus auf das olfaktorische G-Protein (roter Pfeil). Das Duftmolekül/Odorant (O) bindet an den Rezeptor (R) und löst damit eine nachgeschaltete Signalkaskade aus, bei der sich das G α -Protein absplattet und zur Adenylatzyklase (AC) wandert. In Abbildung B wird die spezifische Färbung des olfaktorischen Epithels gegen das G α -Protein (>) gezeigt. Quelle: (A) Handbook of Olfaction and Gustation, Richard L. Doty, Dritte Auflage 2015, Kapitel 4. (B) Holbrook et al. 2011.

1.3.3.4. Weitere Zellen des olfaktorischen Epithels und ihre spezifischen Marker

Stützzellen:

Bei Stützzellen handelt es sich um säulenförmige Epithelzellen, die das gesamte Riechepithel durchziehen. An der basalen Seite sind die Stützzellen mit der Basallamina verankert [124, 125] und an der apikalen Seite umhüllen sie mit ihren schlanken und kurzen Mikrovilli die Dendriten der Rezeptorneurone. Die Funktion der Zellen liegt in der Umwandlung von Fremdstoffen und der Beseitigung von Zelltrümmern der untergegangenen Neurone. Sie besitzen ähnliche Funktion wie Gliazellen im ZNS, indem sie den Neuronen strukturellen Halt geben, die neuronalen Dendriten elektrisch isolieren, neuronale Differenzierungsprozesse beeinflussen und durch Sekretion und Absorption von Molekülen die Zusammensetzung des Mukus beeinflussen können. Der Ursprung der Stützzellen ist nicht genau geklärt, experimentell konnte bereits gezeigt werden, dass sie sowohl von der Plakode als auch von der Neuralleiste abstammen [75, 126]. Zur spezifischen Detektion von Stützzellen werden folgende Marker verwendet: SUS1 [127], SUS4 [128], Zytokeratin18 (KRT18) und E-Cadherin (E-CAD) [66].

Hüllzellen:

Hüllzellen sind spezielle olfaktorische Gliazellen, die ursprünglich aus der Neuralleiste entstehen und die kleinen olfaktorischen Axone zu Faszikeln zusammenfassen [129, 130]. Sie finden sich in der Lamina propria des olfaktorischen Epithels und umwickeln die marklosen Axone der Rezeptorneurone bis zum Bulbus Olfactorius wo sie mit den nachgeschalteten Axonen Synapsen ausbilden. Hüllzellen werden aus adulten Stammzellen gebildet und haben eine wichtige Funktion in der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Axone durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen. In mehreren Versuchen konnte gezeigt werden, dass Hüllzellen das Axonwachstum fördern und das Neuwachstum von verletzten peripheren und zentralen Axonen in verschiedenen Nervenverletzungsmodellen ermöglichen [131-133]. Da sie eine starke Ähnlichkeit mit Gliazellen des ZNS haben, zeigen sie eine positive Immunantwort gegen GFAP und S-100 [134]. Ein spezifischerer Marker für die olfaktorischen Hüllzellen ist p75NTR/NGFR [135].

Mikrovillizellen:

Mikrovillizellen sehen Neuronen ähnlich, befinden sich im apikalen Bereich des Riechepithels und etwa alle fünfzehn Rezeptorneurone findet man eine Mikrovillizelle. Diese epithelialen Zellen haben ein dünnes, unmyelinisiertes Axon, das aus dem basalen Zellkörper hervorgeht, der sich in der Basallamina befindet. Am apikalen Fortsatz finden sich die Mikrovilli. Die Funktion und die Zelllinie, von der sie abstammen, ist nicht bekannt [136]. Generell lassen sich zwei Subtypen unterscheiden: die kleinen Mikrovillizellen Typ I besitzen sehr starre Mikrovilli und sind den Bürstenzellen des Magen-Darm-Traktes sehr ähnlich. Möglicherweise haben sie chemorezeptive Funktionen, jedoch ist die exakte Funktion dieser Zellen im olfaktorischen Epithel ist noch nicht zur Gänze bekannt [137]. Die Bedeutung von der Mikrovillizellen Typ II, dessen Mikrovilli weniger steif sind, ist noch nicht geklärt. Bisher sind für Mikrovillizellen die unspezifischen Marker SUS1 [127] und SUS4 [128] sowie der spezifische Marker TRPM5 [138] bekannt.

Bowman Drüsenzellen:

Im olfaktorischen Epithel finden sich kleine, vorwiegend seröse Bowman Drüsen, die den Mukus bilden [67]. Neben Enzymen wie Lysozym, Lactoferrin und Immunglobulin A zur Immunabwehr befinden sich zusätzlich Odorant Bindeproteine im Mukus, die an die Duftstoffe binden und sie zu den Transmembranrezeptoren transportieren [139]. Die Drüsen bestehen aus einzelnen Drüsenzellen und Zellen, die die Ausführungsgänge bilden. Dabei handelt es sich um vier bis fünf eher schlanke Zellen, die den Ausführungsgang begrenzen und parallel zu diesem verlaufen. Die Zellen des Ausführungsganges, die zur Oberfläche in den Mukus hinein ragen tragen ebenfalls Mikrovilli. Zur Detektion von spezifischen olfaktorischen Drüsenzellen werden Marker, wie KRT18, PAX6 oder SOX2 genutzt [66].

Tabelle 1: Auflistung der Zelltypen im olfaktorischen Epithel

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Zelltypen im olfaktorischen Epithel mit ihren Markern.

Zelltyp	Marker	Publikationen
Horizontale Basalzellen (HBZ)	ICAM1/CD54; P63; SOX2; ZK5, 14, 17	Carter et al. 2002; Fletcher et al. 2011; Holbrook et al. 1995, 2011; Iwai et al. 2008; Jang et al. 2007; Leung et al. 2007; Ohnishi et al. 2003; Suzuki et al. 2013
Globöse Basalzellen (GBZ)	ASCL1; GBC3/RPSA; NEUROD1; NGN1; SOX2	Caggiano et al. 1994; Cau et al. 2002; Chen et al. 2004; Goldstein, Schwob 1996; Holbrook et al. 2011; Jang et al. 2007; Nelson et al. 2008; Packard et al. 2011
Unreife olfaktorische Rezeptorneurone	ATF5; CALB2; GAP43; NCAM/CD56; PGP9.5; TUBB3	Angelastro et al. 2003; Paz et al. 1995; Roskams et al. 1989; Verhaagen et al. 1989; Wei et al. 2013
Reife olfaktorische Rezeptorneurone	GOLF; NCAM/CD56; OMP; PGP9.5; TUBB3	Danciger et al 1989; Holbrook et al. 2011; Jones et al. 1989; Paz et al. 1995; Roskams et al. 1989
Stützzellen	E-CAD; HES1; PAX6; SUS1,4; SOX2; ZK18	Hempstead et al. 1983; Holbrook 2011; Jang et al. 2007
Bowman Drüsenzellen	E-CAD; PAX6; SOX2; KRT18	Davis et al. 1996; Hempstead et al. 1983; Holbrook et al. 2011
Hüllzellen	GFAP; P75NTR/NGFR; S-100	Au, Roskams 2003; Barnett et al. 2004; Doucette et al. 1984; Ramon-Cueto et al. 1992
Mikrovillizellen Typ I und II	SUS1,4; TRPM5	Hempstead et al. 1983; Goldstein, Schwob 1996; Lin et al. 2008

1.3.3.5. Adulte Neurogenese im olfaktorischen Epithel

Eine heutzutage gebräuchliche Definition von adulter Neurogenese beschreibt den seltenen Vorgang der Neubildung von reifen, sich nicht mehr mitotisch teilenden Neuronen im Gehirn. Hierbei werden die Nervenzellen aus adulten neuralen Stammzellen nachgebildet. Neurale Stammzellen können sich wahrscheinlich unendlich lange teilen und bilden bei einer asymmetrischen Teilung Stammzellen und Tochterzellen, die weiter differenzieren. Bisher wurden vier Bereiche im Gehirn identifiziert, in denen auch im adulten Körper eine Neurogenese stattfindet. Im Gehirn finden im Gyrus dentatus des Hippocampus [140], in der Subventrikulären Zone der lateralen Ventrikel [141, 142] und in bestimmten Teilen des Cortex [143] eine Neubildung der Nervenzellen statt. Zudem kann man im olfaktorischen System gleich an zwei Stellen adulte Neurogenese beobachten: Zum einen werden die Hüllzellen, die die Fila olfactoria umgeben, aus Stammzellen des lateralen Ventrikels immer wieder neu nachgebildet und zum anderen entstehen lebenslang reife olfaktorische Rezeptorneurone über Vorläuferstufen aus adulten multipotenten Stammzellen [69, 144]. Unter physiologischen Bedingungen werden die Neurone alle sechzig Tage ersetzt. Das olfaktorische System ist in der Lage, sich nach Verletzungen wieder zu erholen. Die Neurogenese bleibt bestehen, wenn Populationen von Progenitoren und Basalzellen intakt sind. Die multipotenten Globose Basalzellen können individuell zu Stützzellen, Horizontalen Basalzellen und zu Neuronen differenzieren [49]. Diese spezielle Eigenschaft der Rezeptorneurone macht das gesamte olfaktorische System zu einem dauerhaft frei zugänglichen Bereich zur Erforschung der adulten Neurogenese im humanen Nervensystem [145].

1.4. Zielstellung der Arbeit

Dem humanen olfaktorischen System wurde in der Forschung bisher nur sehr wenig Beachtung geschenkt. Jedoch ist dieses Organ einmalig, da olfaktorische Rezeptorneurone die einzigen Neurone im gesamten Organismus sind, die direkt mit dem zentralen Nervensystem und gleichzeitig mit der Außenwelt in Kontakt stehen. Zusätzlich besticht das System durch seine Fähigkeit zur adulten Neurogenese, wobei sich die Neurone das gesamte Leben lang erneuern können. Diese unbegrenzt teilungsfähigen Neurone *in vitro* zu kultivieren ermöglicht es eine Vielzahl von Fragestellungen, wie der grundlegenden Erforschung der embryonalen Entwicklung des olfaktorischen Systems, oder der adulten Neurogenese zu beantworten. Dafür soll ein Protokoll entwickelt werden, an dessen Ende eine relevante Anzahl an olfaktorischen Rezeptorneurone entsteht.

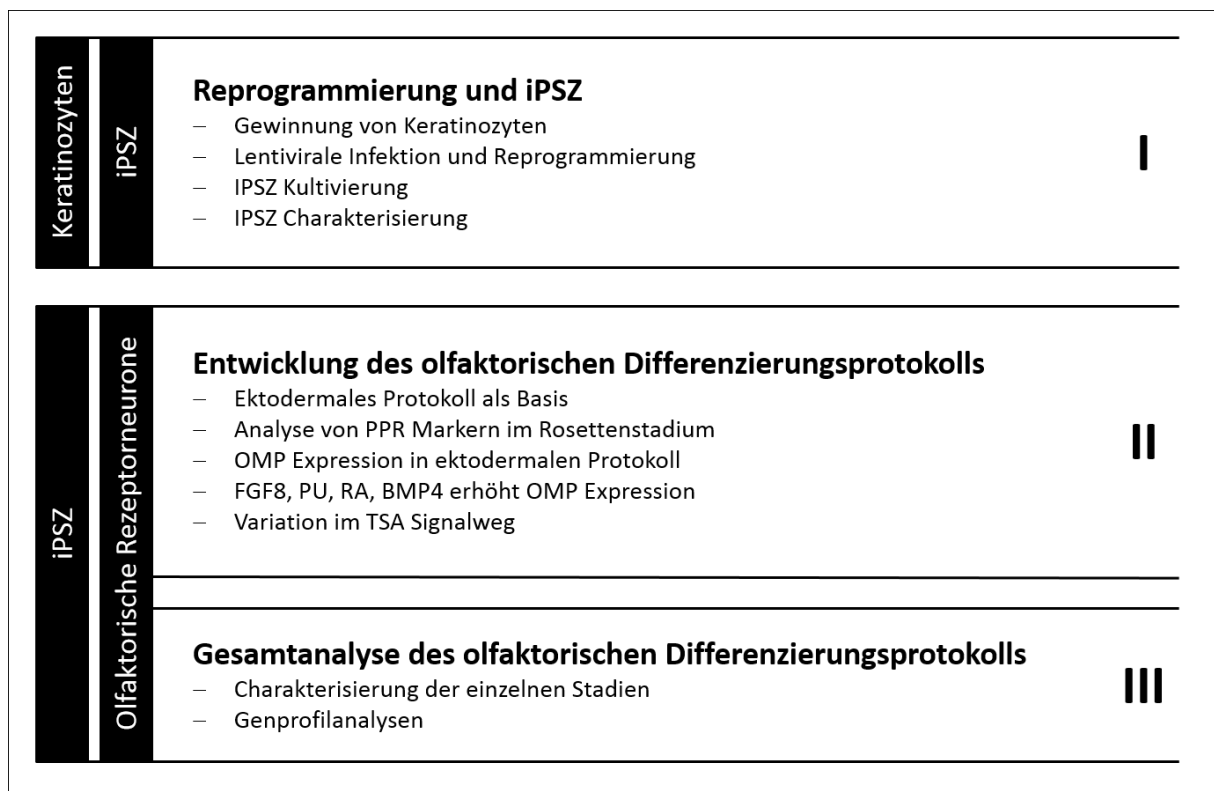


Abbildung 13: Übersichtsdarstellung der Arbeitsabschnitte und der dazugehörigen Unterpunkte

Der erste Abschnitt beschreibt die Gewinnung von iPSZ aus primären Keratinozyten (I), gefolgt von der Entwicklung des olfaktorisch gerichteten Differenzierungsprotokolls ausgehend von den generierten iPSZ (II). Abschließend wird das etablierte Differenzierungsprotokoll und dessen einzelne Stadien in einer detaillierten Genexpressionsanalyse näher charakterisiert und diskutiert (III).

Die inhaltliche Auseinandersetzung mit der Arbeit erfolgt in drei Arbeitsabschnitten, die schematisch in Abbildung 13 zusammenfasst sind.

I. Generierung von humanen Stammzellen aus Keratinozyten

Die Basis dieser gesamten Doktorarbeit bilden Keratinozyten, primäre humane Zellen. Ausgehend von diesen Zellen wird das gesamte Differenzierungsprotokoll, mit dem Ziel eine große Anzahl von *OMP* positiven Zellen zu generieren, etabliert. Dafür müssen zunächst Keratinozyten aus humanen Haarwurzeln isoliert und kultiviert werden. Für die Generierung von pluripotenten Stammzellen werden die kultivierten Keratinozyten mit einem Lentivirus infiziert, wodurch die Zellen ihre charakteristischen Gewebeeigenschaften verlieren und pluripotent werden. Dieser Prozess wird als

Reprogrammierung bezeichnet. Die gewonnenen Stammzellen werden anschließend auf ihre charakteristischen Stammzeleigenschaften hin untersucht. Zeigen die iPSZ alle erforderlichen Anforderungen, können sie als Ausgangspunkt für die eigentliche Entwicklung des Differenzierungsprotokolls herangezogen werden.

II. Entwicklung eines Differenzierungsprotokolls zu olfaktorischen Rezeptorneuronen

Ausgehend von einem ungerichteten, neuro-ektodermalen Protokoll wird das gerichtete, olfaktorische Protokoll entwickelt. Zunächst musste überprüft werden, ob dieses sich als Ausgangspunkt überhaupt eignet. Olfaktorische Rezeptorneurone (ORN) durchlaufen, anders als zerebrale Neurone, nicht das Neuralrohr, sondern eine benachbarte Struktur, die Präplakodale Region (PPR). Das Vorhandensein von PPR Markern ist die Grundlage für die weitere Entwicklung des Differenzierungsprotokolls in Richtung olfaktorische Linie. Als weitere Voraussetzung für die Verbesserung des ungerichteten Protokolls ist die Analyse der *OMP* Grundexpression. Erfüllt das ungerichtete, neuro-ektodermale Protokoll alle Anforderungen, wird durch gezielte Zugabe und Weglassen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren versucht, eine erhöhte *OMP* Expression im Neuronen-Stadium zu erzielen, was primär auf die Anwesenheit von ORN schließen lässt.

III. Charakterisierung der einzelnen Differenzierungsstadien und Verlaufsprofile mithilfe einer detaillierten Genexpressionsanalyse

Im letzten Arbeitsschritt wird das generierte Protokoll zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierung anhand von Markergenen charakterisiert. Große Datensätze aus quantitativer RT-PCR geben einen detaillierten Einblick in die Genexpression während des gesamten Differenzierungsverlaufs. Dabei wird auf die einzelnen Differenzierungsstadien und auf die Verlaufsdiagramme olfaktorischer Signalkaskaden näher eingegangen. Die Daten können Hinweise darauf geben, ob bereits publizierte Ergebnisse in Mausexperimenten auch in der *in vitro* Differenzierung nachvollzogen werden können

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkultur

2.1.1.1. Zellkultur von Ammenzellen und Lentivirusproduzierenden Zellen

In dieser Arbeit wird die Lenti-X 293T Zelllinie verwendet, bei der sich um einen Subklon der transformierten humanen Nierenzelllinie, HEK 293 handelt. Diese Zellen lassen sich leicht transfizieren und zeigen eine hohe Proteinexpression der lentiviralen Partikel. Embryonale CD1 Mausfibroblasten E 14,5 (MEF) (Stemcell Technologies) werden zur Gewinnung von konditioniertem Medium kultiviert. Als Ammenzellen für die Reprogrammierung von humanen Keratinozyten werden Rattenfibroblasten (REF) Zellen verwendet.

Für die Kultivierung von MEF, REF und Lenti-X Zellen wird folgendes Medium verwendet:

DMEM (4,5 g/l D-Glucose + L-Glutamin, - Pyruvat)

- + 10 % Fötale Kälberserum
- + 1 % Antibiotikum-Antimykotikum
- + 1 % Nicht essentielle Aminosäuren
- + 1 % GlutaMAX™

2.1.1.2. Zellkultur von primären Keratinozyten

Keratinozyten werden als primäre Zelllinie direkt von Haarspendern gewonnen und werden in dem nachfolgenden Kulturmedium gehalten:

EpiLife®

- + HKGS
- + Rock Inhibitor

2.1.1.3. Zellkultur während der Reprogrammierung

Das Medium für die Reprogrammierung von infizierten Keratinozyten besteht aus folgenden Bestandteilen:

Knockout™ DMEM

- + 20 % Serum Replacement
- + 1 % GlutaMAX™, Nicht essentielle Aminosäuren, Antibiotikum-Antimykotikum
- + 50 mM β -Mercaptoethanol
- + 50 μ g/ml Vitamin C
- + 10 nM Y-27632 2HCl
- + 10 ng/ml FGF2

2.1.1.4. Zellkultur von induziert pluripotenten Stammzellen

Für die Kultivierung von iPSZ unter Ammenzellfreien Bedingungen wird ein spezielles Medium verwendet, mit dem Namen „FTDA“ [21]:

DMEM/F-12, GlutaMAX™

- + 1 % Chemisch definiertes Lipidkonzentrat
- + 1 % Humanes Serumalbumin
- + 1 % Antibiotikum-Antimykotikum
- + 0,1 % ITS Premix
- + 5 ng/ml ActivinA
- + 10 ng/ml FGF2
- + 0,5 ng/ml TGF β
- + 0,05 nM Dorsomorphin

2.1.1.5. Zellkultur von *in vitro* generierten olfaktorischen Rezeptorneuronen

Für die Generierung von Neuronen aus iPSZ wird im ersten Schritt, der Bildung von embryonalen Körpern, folgendes Medium für 24 Stunden benutzt:

hESC Embryonic Stem Cell Media

- + Animal-Free Growth Factor Component
- + 1 % Antibiotikum-Antimykotikum
- + 10 nM Blebbistatin
- + 10 nM Y-27632 2HCl

In den folgenden Tagen der embryonalen Körperbildung und der weiteren Differenzierung zu olfaktorischen Rezeptorneuronen wird ein Grundmedium verwendet, zu dem je nach Differenzierungsschritt unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Zytokine zugegeben werden (siehe Tabelle 2).

Grundmedium für Differenzierung:

DMEM/F-12, GlutaMAX™

- + 1 % Antibiotikum-Antimykotikum
- + 2 % B-27 Supplement
- + 2 % Hormonmix

Der zugegebene Hormonmix (100 %) setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

4,14 ng/ml Natrium Selenit

5,03 ng/ml Progesteron

80 µg/ml Holotransferrin

20 µg/ml Insulin

7,72 µg/ml Putrescin

Tabelle 2: Zusätze während der neuronalen Differenzierung

Stadium der Differenzierung	Anzahl Tage	Zusatz		Endkonzentration
		olfaktorisch	ungerichtet	
Embryonale Körper	3	Dorsomorphin	Dorsomorphin	2 µM
		SB431542	-	10 µM
Rosetten	7	Dorsomorphin	Dorsomorphin	2 µM
		FGF2	FGF2	20 ng/ml
		SB431542	-	10 µM
Neurale Stammzellen	3	-	Dorsomorphin	2 µM
		Blebbistatin	Blebbistatin	10 µM
		EGF	EGF	50 ng/ml
		FGF2	FGF2	20 ng/ml
		Y-27632	Y-27632	10 µM
	7	-	Dorsomorphin	2 µM
		BMP4	-	5 ng/ml
		FGF8	-	100 ng/ml
		Purmorphamin	-	1 nM
		RA	-	0,1 µM
Neurone	> 60	ActivinA	-	5 ng/ml
		BDNF	BDNF	10 ng/ml
		cAMP	cAMP	500 nM
		GDNF	GDNF	10 ng/ml
		Vitamin C	Vitamin C	50 µg/ml

2.1.2. Software und Internetressourcen

In Tabelle 3 werden die verwendeten Internetressourcen und Softwareprogramme aufgelistet.

Tabelle 3: Software und Internetressourcen

Software	Bezugsquelle
AxioVision SE64 Rel 4.9	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
StepOne Software V 2.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Internetressourcen	Homepage
NCBI PubMed Publikationsdatenbank	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

2.1.3. Oligonukleotide

Für die qRT-PCR verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland bezogen.

Tabelle 4: Oligonukleotide für qRT-PCR

Bezeichnung	Bestellnummer
Hs_ADCY3_1_SG	QT00075348
Hs_AFP_1_SG	QT00085183
Hs_AFT5_1_SG	QT00200564
Hs_ASCL1_1_SG	QT00237755
Hs_CALB2_1_SG	QT00018109
Hs_EYA1_1_SG	QT00070980
Hs_EYA2_1_SG	QT00076573
Hs_FOXA2_1_SG	QT00212786
Hs_FOXG1_1_SG	QT00245329
Hs_GAP43_1_SG	QT00023639
Hs_GNAL_1_SG	QT00023786
Hs_HMBS_1_SG	QT00014462
Hs_MYH6_1_SG	QT00030807
Hs_NANOG_1_SG	QT01025850
Hs_NCAM1_1_SG	QT00071211
Hs_NGN1_1_SG	QT00214032
Hs_OMP_1_SG	QT00237055
Hs_PAX6_1_SG	QT00071169
Hs_POU5F1_1_SG	QT00210840
Hs_RPSA_1_SG	QT00044310
Hs_SIX1_1_SG	QT00010584
Hs_SIX4_1_SG	QT00035959
Hs_SOX2_1_SG	QT00237601
Hs_T_1_SG	QT00062314
Hs_TUBB3_1_SG	QT00089775
Hs_UCHL1_1_SG	QT00092666

Die TaqMan Oligonukleotide wurden von der Firma Life Technologies, Paisley, United Kingdom synthetisiert.

Tabelle 5: Oligonukleotide für Genexpressionsanalyse

Genname	Bestellnummer
ADCY3	Hs01086502_m1
ASCL1	Hs04187546_g1
ATF5	Hs01119208_m1
CALB2	Hs00418693_m1
DMRTA1	Hs00403012_m1
EYA1	Hs00166804_m1
EYA2	Hs00193347_m1
FOXD3	Hs00255287_s1
FOXE3	Hs00846317_s1
FOXG1	Hs01850784_s1
FOXI2	Hs01942044_s1
FOXI3	Hs03645828_s1
GAP43	Hs00967138_m1

GAPDH	Hs02786624_g1
GBX2	Hs00230965_m1
GFAP	Hs00909233_m1
GNAL	Hs00181836_m1
HMBS	Hs00609296_g1
KIT	Hs00174029_m1
KRT19	Hs00761767_s1
NCAM1	Hs00941830_m1
NCAM2	Hs00189850_m1
NESTIN	Hs04187831_g1
NEUROD1	Hs01029249_s1
NGN1	Hs01029249_s1
OMP	Hs01087269_s1
PAX6	Hs00240871_m1
PAX8	Hs01015257_g1
RPSA	Hs03046712_g1
SIX4	Hs00213614_m1
SOX1	Hs01057642_s1
SOX10	Hs00366918_m1
SOX2	Hs01053049_s1
SOX9	Hs01001343_g1
TUBB3	Hs00801390_s1
UCHL1	Hs00985157_m1

2.1.4. Vektoren

Für die Generierung von lentiviralen Partikeln kamen folgende Plasmide zur Verwendung:

Table 6: Vektoren

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
psPAX2	Virusproduktion	Addgene, Cambridge, USA
pRR.L.PPT.SF.hOKSMco.idTom.pre FRT	Reprogrammierung	Warlich et al. 2011
pMD2.6	Virusproduktion	Addgene, Cambridge, USA

2.1.5. Antikörper

Folgende Primär- und Sekundärantikörper wurden für Immunfluoreszenzanalysen benutzt:

Table 7: Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper				
Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
Anti-ASCL1 (N17)	Ziege	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland	Sc-13219
Anti-ATF5	Kaninchen	1:200	Abcam, Cambridge, United Kingdom	ab60126
Anti-CALB2	Maus	1:100	Merck Milipore, Massachusetts, USA	MAB1568
Anti-CHAT	Kaninchen	1:100	Merck Milipore, Massachusetts, USA	AB143
Anti-DESMIN	Maus	1:500	Agilent, Santa Clara, USA	M0760

Anti-EYA1	Kaninchen	1:100	Protein Tech™, Manchester, UK	22658-1-AP
Anti-EYA2	Maus	1:50	Abnova, Heidelberg, Deutschland	H00002139-M04
Anti-GABA	Hühnchen	1:100	Abcam, Cambridge, United Kingdom	62669
Anti-GFAP	Maus	1:400	Merck Milipore, Massachusetts, USA	MAB360
Anti-GOLF (K19)	Kaninchen	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland	Sc-385
Anti-M-GLU	Kaninchen	1:100	Abcam, Cambridge, United Kingdom	ab76316
Anti-NCAM1	Maus	1:200	Merck Milipore, Massachusetts, USA	MAB5324
Anti-NESTIN	Maus	1:100	Abcam, Cambridge, United Kingdom	ab18102
Anti-NGN1 (M06)	Maus	1:500	Abgent, San Diego, USA	AT3025a
Anti-OLIG1	Maus	1:200	Abcam, Cambridge, United Kingdom	ab6150
Anti-OMP	Ziege	1:200	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland	544-10001
Anti-PAX6	Kaninchen	1:100	BioLegend, Fell, Deutschland	901301
Anti-RPSA	Kaninchen	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	PA5-27281
Anti-SIX1	Kaninchen	1:100	Protein Tech™, Manchester, United Kingdom	10709-1-AP
Anti-SIX4 (M09)	Maus	1:100	Abnova, Heidelberg, Deutschland	H00051804-M09
Anti-SMI	Maus	1:100	Merck Milipore, Massachusetts, USA	NE1023
Anti-SOX17	Ziege	1:500	R&D Systems, Minneapolis, USA	AF1924
Anti-TH	Hühnchen	1:100	Merck Milipore, Massachusetts, USA	ab9702
Anti-TUBB3 (K18020)	Kaninchen	1:2000	BioLegend, Fell, Deutschland	802001
StemLight™ Pluripotency Antibody Kit				
Anti- OCT-4A (C30A3)	Kaninchen	1:200	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9656
Anti- SOX2 (D6D9)	Kaninchen	1:200		
Anti- NANOG (D73G4)	Kaninchen	1:200		
Anti- SSEA4 (MC813)	Maus	1:200		
Anti- TRA-1-60	Maus	1:200		
Anti- TRA-1-81	Maus	1:200		
Sekundärantikörper				
Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
Anti-Kaninchen-IgG H%L (Alexa Fluor® 488)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	ab150073
Anti-Kaninchen-IgG H%L (Alexa Fluor® 568)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	ab175470
Anti-Kaninchen-IgG H%L (Alexa Fluor® 647)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab150075
Anti-Maus-IgG H%L (Alexa Fluor® 488)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab150105

Anti-Maus-IgG H%L (Alexa Fluor® 568)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab175472
Anti-Maus-IgG H%L (Alexa Fluor® 647)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab150107
Anti-Ziege-IgG H%L (Alexa Fluor® 488)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab150129
Anti-Ziege-IgG H%L (Alexa Fluor® 568)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab175474
Anti-Ziege-IgG H%L (Alexa Fluor® 647)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab150131
Anti-Kaninchen-IgG H%L (Alexa Fluor® 568)	Ziege	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab175471
Anti-Maus-IgG H%L (Alexa Fluor® 568)	Ziege	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab175701
Anti-Maus-IgM H%L (Alexa Fluor® 568)	Ziege	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab175702

2.1.6. Gebrauchsfertige Reaktionslösungen

Nachfolgend werden die verwendeten gebrauchsfertigen Reaktionslösungen aufgelistet.

Tabelle 8: gebrauchsfertige Reaktionslösungen

Gebrauchsfertige Reaktionslösung	Bezugsquelle	Bestellnummer
PreAmp Master Mix	Fluidigm, San Fransisco, USA	100-5581
QuantiFast SYBR® Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	204156
RNeasy Mini Isolationskit	Qiagen, Hilden, Deutschland	74106

2.1.7. Chemikalien

In der Tabelle 9 werden die benutzten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 9: Chemikalienverzeichnis

Chemikalienbezeichnung	Firma	Bestellnummer
BCIP	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	B6777
Cryostem	Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel	05-710-1E
D(+)- Sucrose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	4621.1
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	4720.1
Dispase	Corning, Amsterdam, Niederlande	354235
DPBS Calcium, Magnesium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	14040-091
DPBS ohne Calcium, ohne Magnesium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	14190-094
Hexadimethrinbromid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	107689
Holo-Transferrin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	T0665
Insulin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	91077C
Kollagen IV	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	C5533

Laminin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	11243217001
Lenti-X Concentrator	Takara Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich	631232
Matrigel® hESC-Qualified Matrix	Corning, Amsterdam, Niederlande	354277
Mitomycin C	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	11435
Natriumselenit	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	S5261
NBT	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	N5514
Normal Donkey Serum	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	D9663
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	0335
Polyethylenimin linear	Polysciences GmbH, Eppelheim, Deutschland	23966-2
Poly-L-Ornithin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	P4957
Progesterone	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	P8783
ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	P36935
Putrescin Dihydrochlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	P7505
ReLeSR™	Stem Cell Technologies, Köln, Deutschland	05873
Synth-a-Freeze®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	A12542-01
Triton® X 100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3051.3
TrypLE™ Express	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	12604-021

2.1.8. Zellkulturzusätze und Zytokine

Für die Zellkultur verwendeten Basismedien, Zusätze, Zytokine und Wachstumsfaktoren werden in den folgenden Tabellen aufgelistet.

Table 10: In der Zellkultur verwendete Basismedien

Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
Animal-Free Growth Factor Component	PeptoTech, Hamburg, Deutschland	GF-hESC-500
DMEM (+ 4,5 g/l D-Glucose, + L-Glutamin, - Pyruvat)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	41965-039
DMEM/F-12, GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	31331-028
EpiLife®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	M-EPI-500-CA
hESC Embryonic Stem Cell Media	PeptoTech, Hamburg, Deutschland	BM-hESC
Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	S-001-5
Knockout™ DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	10829-018

Table 11: Auflistung der Zusätze für die Zellkultur

Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
(±)-Blebbistatin	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland	BN0640
Antibiotikum-Antimykotikum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	15240-062
B-27® Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	17504-044
Chemisch definiertes Lipidkonzentrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	11905-031
Fötales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	10500-064

GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	35050-038
Humanes Serumalbumin	Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel	05-720-1B
KnockOut™ Serum Replacement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	10828-028
MEM Non-Essential Amino Acids Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	11140-050
SB431542	Selleckchem, München, Deutschland	S1076
β-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	31350-010
Vitamin C	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3525.1
Y-27632 2HCl	Selleckchem, München, Deutschland	S1049

Tabelle 12: Verwendete Zytokine und Wachstumsfaktoren in der Zellkultur

Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
ActivinA	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	GFH6
BMP4	PeptoTech, Hamburg, Deutschland	120-05ET
Brain-derived neurotrophic factor	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	GFH1
Dibutryl-cAMP	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland	BML-CN125
Dorsomorphin	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab120843
EGF	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	GFH26
FGF2	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	GFH146
FGF8	PeptoTech, Hamburg, Deutschland	100-25
GDNF	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	GFH2
ITS Premix	Corning, Amsterdam, Niederlande	354350
Purmorphamin	Phoenix GmbH, Karlsruhe, Deutschland	080-60A
Retinsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	R2625
TGF-β1	PeptoTech, Hamburg, Deutschland	100-21
Trichostatin A	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	CAY-89730

2.1.9. Geräte

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden folgende Geräte benutzt:

Tabelle 13: Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Analysenwaage BP2218-OCE	Satorius
Axio Imager M2 Forschungsmikroskop	Zeiss
Biomark™	Fluidigm
Eppendorf Multipette Stream	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 0,1 – 2,5 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 0,5 – 10 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 0,5 – 5 ml	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 10 – 100 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 100 – 1000 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 20 – 200 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 500 – 5000 µl	Eppendorf
EVOS® FL Cell Imaging System	Thermo Fischer Scientific
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 1 – 10 µl	Thermo Scientific
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 10 – 100 µl	Thermo Scientific
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 100 – 1000 µl	Thermo Scientific
Flockeneisbereiter AF-103	Scotsman
Gefrierschrank GN 4113-20K	Liebherr
Heracell 240i CO ₂ Incubator	Thermo Scientific
Heraeus™ Fresco™ Zentrifuge	Thermo Scientific

Heraeus™ Megafuge™ 16 Universalzentrifuge	Thermo Scientific
InoLab® Labor-pH-Meter	WTW
Kühl-Gefrierkombination CUN 3933-21B	Liebherr
Magnetrührer MR3001K	Heidolph
Mikrowelle MW13145W	Amica
Minizentrifuge Sprout	Biozym
MSC-Advantage™ biologische Sicherheitswerkbank, Klasse 2	Thermo Scientific
Nanophotometer™ P-Class	Implen
NeoVortex D-6012	NeoLab
Odyssey FC Imaging System	Li-Cor
PCR-Cycler 732-1210	Gene Technologies
Pipetus®	Hirschmann
PowerPac™ 200	Bio-Rad
Primovert inverses Mikroskop	Zeiss
Quantum ST4	Vilber Lourmat
Schüttelinkubator 3031	GFL
StepOnePlus™ Real-time PCR System	Applied Biosystems
Thermomixer Pro	CellMedia
Ultraschallgerät Transsonic 460/H	Elma®
Ultra-Tiefkühlschrank Forma 900 Series	Thermo Scientific

2.1.10. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 14 listet die verwendeten Verbrauchsmaterialien auf.

Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien

Material	Firma	Bestellnummer
0,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	72.704.700
1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	72.706.700
12 Well Kulturplatten	Corning, Amsterdam, Niederlande	353043
15 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	62.554.502
24 Well Kulturplatten	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland	662168
25 cm ² Kulturflaschen	Corning, Amsterdam, Niederlande	3815
250 ml Zellkulturflasche	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland	658175
50 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland	227261
6 Well Kulturplatten	Corning, Amsterdam, Niederlande	353046
96 Well Kulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3926.500
BD Plastipak 50 ml Spritzen	VWR, Darmstadt, Deutschland	300869
Clip Tip™ Pipettenspitzen 1- 10 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	94410210
Clip Tip™ Pipettenspitzen 10- 100 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	94410310
Clip Tip™ Pipettenspitzen 100- 1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	94410710
Cryoröhrchen 1,2 ml	Corning, Amsterdam, Niederlande	430487
Nitril powderfree Handschuhe	ABENA, Zörbig, Deutschland	290417
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym, Hessich Oldendorf, Deutschland	720011
Pipettenspitzen 1000 µl	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland	740290
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	70.760.002
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	86.1254.001
Serologische Pipette 25 ml	Corning, Amsterdam, Niederlande	357525
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	86.1253.001

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Kultivierung und Inaktivierung von Ammenzellen, Gewinnung von konditioniertem Medium

Fibroblastenzellen von der Maus (MEF) und der Ratte (REF) werden als Ammenzellen für die Generierung von iPSZ verwendet. Zellen mit einer niedrigen Passagenzahl wachsen adhärent in dem entsprechenden Medium und werden durchgehend bei 5 % O₂, 5 % CO₂ und 37°C inkubiert. Haben die Zellen eine Konfluenz von 90 % erreicht werden sie im Verhältnis 1:3 auf eine neue Kulturschale passagiert. Das Kulturmedium der MEF Zellen wird zwei und vier Tage nach dem Passagieren gesammelt und anschließend mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert. Das gewonnene Medium wird mit FGF2, Vitamin C und Y-27632 2HCl angereichert.

Um als Ammenzellen fungieren zu können wird der Zellzyklus der REF Zellen durch die Zugabe von 7,5 µg/ml des Antibiotikums Mitomycin C über 2,5 Stunden, gestoppt. Die REF Zellen erleichtern das Absetzen der zugesetzten Zellen, sondern wachstumsfördernde Stoffe ins Medium ab und durch den Replikationsstopp können sie die anderen Zellen nicht überwachsen.

2.2.1.2. Produktion von Lentiviren

Lenti-X 293T Zellen mit einer Passagenzahl zwischen drei und sieben werden unter den gleichen Kulturbedingungen wie Fibroblastenzellen gehalten. Für die Produktion von lentiviralen Partikeln werden Lenti-X 293T Zellen mit drei unterschiedlichen Plasmiden in serumfreien Medium co-transfiziert:

- 8 µg des lentiviralen Transferplasmids, das eine polyzistronische Kasette aller vier Reprogrammierungsgenen enthält [146].
- 5,5 µg des psPAX2 Vektors das für die Verpackungsgene Gag, Pol, Rev, und Tat codiert.
- 2 µg Plasmid, das die VSV-G Hülle enthält.

Vier Stunden nach der Transfektion wechselt man zu serumhaltigen Kulturmedium, welches nach zwei und vier Tagen gesammelt wird. Um die enthaltenen Viruspartikel zu konzentrieren wird im ersten Schritt das gesammelte Medium zentrifugiert, wobei tote Zellen und Zelltrümmer abgetrennt werden. Nach der Aufreinigung durch einen Zellulosemischesterfilter wird zu der Virussuspension zu drei Teilen Viruskonzentrat hinzugegeben und für zwei bis drei Stunden kühlgestellt. Die anschließende Zentrifugation bei 1500 g für 45 Minuten bewirkt ein Absinken der Viruspartikel, welche in EpiLife aufgelöst und tiefgefroren werden. Das gelöste Viruspellet enthält durchschnittlich $8,5 \cdot 10^8$ virale Kopien.

2.2.1.3. Kultivierung von Keratinozyten

Je zehn Haarwurzeln werden von gesunden, freiwilligen Spendern entnommen. Die Haarwurzeln werden auf Keratinozyten-Matrigel beschichteten Kulturflaschen ausplattiert und mit angereichertem konditioniertem MEF Medium versorgt. Das Medium wird täglich gewechselt, bis Keratinozyten aus den Haarwurzeln auswachsen. Diese werden für weitere zwei Wochen in calciumarmen Keratinozytenmedium kultiviert, bis sie dicht genug sind für die Infektion mit lentiviralen Partikeln. Für die Cryopreservierung von Keratinozyten werden diese mit Dispase nach zehn Minuten Inkubation im Brutschrank von der Kulturflasche abgelöst, mit dem Einfriermedium Synth-a-Freeze in Cryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.4. Reprogrammierung

Keratinocyten wachsen auf Kollagen IV beschichteten 6 Well Platten bis zu einer Konfluenzdichte von 70 %. An zwei aufeinanderfolgenden Tagen werden je 50 µl des Reprogrammierungsvirus zusammen mit 8 ng/µl Hexadimethrinbromid zu den Zellen gegeben. Die infizierten Zellen werden auf inaktivierte Rattenfibroblasten ausplattiert und für etwa drei bis vier Wochen mit Reprogrammierungsmedium kultiviert bis makroskopisch sichtbare Stammzellkolonien entstehen. Die Kolonien werden mechanisch von den Ammenzellen abgelöst und auf ein ammenzellfreies Kulturmilieu gebracht.

2.2.1.5. Kultivierung von induziert pluripotenten Stammzellen

Humane induziert pluripotente Stammzellen werden auf Matrigel beschichteten Kulturschalen in FTDA Medium kultiviert. Sobald die Stammzellkolonien eine Konfluenz von 80- 90 % erreicht haben, werden sie passagiert. Dafür werden die Zellen zunächst für eine Minute mit der Enzymlösung ReLeSR inkubiert, diese wird anschließend nahezu vollständig abgenommen und für weitere vier Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von FTDA wird die Enzymreaktion abgestoppt und die Zellen können auf neue Kulturschalen im gewünschten Verhältnis verteilt werden. Um iPSZ in flüssigem Stickstoff lagern zu können, werden diese zuvor mit ReLeSR abgelöst, in dem iPSZ Einfriermedium Cryostem aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt.

2.2.1.6. Charakterisierung von induziert pluripotenten Stammzellen

Jede generierte Stammzelllinie muss auf die Fähigkeit zur Differenzierung in die drei Keimblätter und auf ihre Pluripotenz untersucht werden. Für das Differenzierungspotential werden die iPSZ für eine Woche mit Reprogrammierungsmedium in Suspensionskultur genommen und diese für weitere zwei Wochen adhärent wachsen gelassen. Auf RNA- und Proteinebene werden nun verschiedenen Marker, die charakteristisch sind für die jeweiligen Keimblätter analysiert. Die Fähigkeit der Pluripotenz von Stammzellkolonien wird immunologisch dargebracht. Dafür werden diese mit spezifischen Oberflächen- und etablierten Pluripotenzmarkern gefärbt.

Tabelle 15: Verwendete Marker für Keimblattdifferenzierung und Pluripotenzfärbung

Experimentelle Analysetechnik	Methode	Keimblatt	Verwendeter Marker
Keimblattdifferenzierung	Genexpressionsanalyse	Endoderm	AFP FOXA2
		Ektoderm	PAX6 TUBB3
		Mesoderm	MYH6 T
	Immunfluoreszenz	Endoderm	SOX17
		Ektoderm	TUBB3
		Mesoderm	DESMIN
Experimentelle Analysetechnik	Methode	Lokalisation	Verwendeter Marker
Pluripotenzanalyse	Immunfluoreszenz	Oberflächenmarker	SSEA4 TRA-1-60 TRA-1-81
		Pluripotenzmarker	NANOG OCT4 SOX2

2.2.1.7. Alkalische Phosphatase Färbung

Zum Nachweis von induziert pluripotenten Stammzellen kann eine Substratumsetzung durch das Enzym Alkalische Phosphatase herangezogen werden. Dafür wird den Stammzellkolonien BCIP und NBT zu dem Medium dazu gegeben und bei Dunkelheit für zwanzig Minuten inkubiert. Die Alkalische Phosphatase, welche ausschließlich in Stammzellen vorkommt kann nun das gelbliche Substrat umsetzen wobei ein dunkelblaues Substrat ausfällt und sich in den Stammzellkolonien ablagert.

2.2.1.8. Differenzierung von induziert pluripotenten Stammzellen zu Neuronen

Als Ausgang für die Differenzierung zu Neuronen werden auf Matrigel wachsende Stammzellkolonien verwendet. Sobald eine Konfluenz von ca. 80- 90 % erreicht ist, werden die Zellen für insgesamt sieben Minuten mit der Enzymlösung ReLeSR behandelt was eine Vereinzelnung der iPSC bewirkt. Die Zellsuspension wird in hESC Embryonic Stem Cell Media aufgenommen und auf 96 Well Suspensions Kulturschalen verteilt. Nach einem Tag findet ein Mediumwechsel statt. Die entstandenen embryonalen Körper werden nach insgesamt vier Tagen auf Matrigel beschichtete Platten ausplattiert. Durch Verwendung von definierten Zytokinen bilden sich in diesem Differenzierungsschritt charakteristische neurale Rosetten welche nach weiteren sechs Tagen manuell abgespült und wieder als Suspensionskultur gehalten werden. Die Kultivierung erfolgt in speziell beschichteten Flaschen, die ein Absetzen der Zellen nicht ermöglichen. In einem Zeitraum von zehn Tagen bilden sich durch Zugabe von Wachstumsfaktoren reife neurale Stammzellen (NSZ). Die NSZ wachsen auf Polyornithin und Laminin beschichteten Glasplättchen mindestens sechs Wochen. Durch den gezielten Zusatz von Zytokinen differenzieren sie zu reifen olfaktorischen Rezeptorneuronen. Die Gesamtdauer der Differenzierung erstreckt sich über zwei bis vier Monate. Das Protokoll für die ungerichtete Differenzierung in alle Arten von Neuronen beruht auf der Publikation von Kim et al. 2011 [30]. Hierbei

werden Zytokine und Wachstumsfaktoren zugesetzt, die keine spezielle Sorte von Neuronen bevorzugen soll, sondern eine große Vielfalt an Neuronen entstehen lässt.

2.2.2. RNA-Methoden

2.2.2.1. Zellpellet und RNA-Isolation

Für die Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen, müssen diese zunächst für fünf Minuten mit TrypLE bei 37°C inkubiert werden. Die abgelösten Zellen werden in PBS Lösung aufgenommen, gut resuspendiert und anschließend bei 4°C für fünf Minuten und 2000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Zellpellt in 350 µl RLT-Plus Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA aus dem lysierten Zellpellt wird nach Gebrauchsanweisung des RNA Extraktion Kits durchgeführt. Dabei ist besonders darauf zu achten, dass die zweimalige Elution mit je 30 µl vorgewärmten endotoxinfreien Wasser geschieht und vor der Zentrifugation jeweils eine Minute gewartet wird. Bei -80°C wird die RNA gelagert.

2.2.2.2. Quantitative Reverse Transkriptase PCR

Für die quantitative Analyse der Genexpression wird die RNA zunächst von einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Parallel wird durch die im Reaktionsmix enthaltenen Polymerase die Elongation des zu amplifizierenden Genabschnittes katalysiert. Das zusätzlich in der gebrauchsfertigen Reaktionslösung enthaltene SYBR Green lagert sich spezifisch während der Denaturierungsschritte in der PCR Reaktion in die kleine Furche des cDNA-Doppelstranges ein. Durch kontinuierliche Absenkung der Temperatur wird das gebundene fluoreszente Molekül aus der DNA freigesetzt und kann detektiert werden. Es besteht eine Korrelation aus dem Zeitpunkt dieser Detektion und der Menge an genspezifischer RNA in der gemessenen Probe. Als interne Referenzgene wurden *HMBS* und *GAPDH* zusätzlich zu jedem analysierten Gen mitgemessen.

2.2.3. Genexpressionsanalyse

Die Messung der Genexpression mit der Fluidigm Technologie hat den großen Vorteil, dass eine große Anzahl von Proben mit vielen Sonden gemessen werden kann. Zudem hat diese Methoden den Vorteil, dass nur sehr geringe Mengen von 20 ng RNA gebraucht wird. Wie bei der quantitativen Reverse Transkriptase PCR wird die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Für die Reverse Transkriptase und der parallel dazu laufenden Präamplifikation wird die RNA zusammen mit dem RXN Puffer, der Superscript 3 Polymerase und den verdünnten Sonden vorbereitet. In dem PCR Programm über achtzehn Zyklen wird die Kopienzahl der cDNA der Proben erhöht und kann eine Detektion von schwach exprimierten Genen ermöglichen. Die PCR Produkte werden anschließend mit dem Universal PCR Master Mix No Amp Arrays und dem Geneexpression Sample Loading verdünnt und zusammen mit den gewünschten Sonden auf den 96.96 Dynamic Array™ IFC geladen. Dabei können bis zu 96 Proben und 96 Sonden gleichzeitig gegeneinander gemessen werden. Die Verrechnung der Daten erfolgt gleichermaßen wie die qRT-PCR Daten, die Ct-Werte der gemessenen RNA Expressionen werden intern mit dem Referenzgen verrechnet. Dies ermöglicht einen Rückschluss auf die Ausgangsmenge der RNA zu ziehen und somit eine relative Genexpression zu bestimmen.

2.2.4. Immunfluoreszenz

Für die immunologische Detektion von kultivierten Zellen müssen diese für fünfzehn Minuten mit vorgewärmten 4 % Paraformaldehyd 10 % D(+) Sucrose fixiert werden. Nach einem anschließenden Waschvorgang mit PBS werden die Zellen für weitere fünf Minuten mit 0,2 % Triton X permeabilisiert. In dieser Zeit wird die Zellmembran porös und ermöglicht somit einen leichteren Durchtritt des Antikörpers in das Zytoplasma und den Nucleus. Die Behandlung der Proben für 1,5 Stunden mit 5 % Normalem Eselserum führt zur Blockierung von allen freien Proteinstellen auf dem Präparat. Der Primäantikörper wird in der gleichen Blockierlösung angesetzt. Eine Abfolge von Waschschritten mit Magnesium- und Calciumarmen PBS, gefolgt von ionenreichem PBS und ionenarmen PBS wird durchlaufen. Der Sekundäantikörper wird für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt ein erneuter Waschgang, dem eine zehn sekundige Inkubation in destilliertem Wasser und das Eindeckeln mit einer DAPI-haltigen Lösung folgt.

Für die immunologische Detektion der pluripotenten Eigenschaften von Stammzellen werden die iPSZ Kolonien zunächst fixiert. Eine Permeabilisierung mit eiskaltem Methanol für zehn Minuten bei -20°C wird jedoch nur bei den Präparaten vorgenommen, die mit Pluripotenzmarkern gefärbt werden. Das Waschen mit ionenarmen PBS entfernt das Methanol und alle Proben werden mit einer Blockierlösung, bestehend aus 5 % Normalen Ziegeneserum mit 0,3 % Triton X für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Über Nacht bei 4°C werden die Primäantikörper zur Detektion der Oberflächenmarker und Pluripotenzmarkern inkubiert. Die nachfolgenden Schritte werden entsprechend dem Färbeprotokoll durchgeführt.

3. Ergebnisse

Olfaktorische Rezeptorneurone (ORN) haben im Gehirn eine ganz besondere Stellung, da sie die einzigen Nervenzellen des gesamten Organismus sind, die Rezeptorzellen und gleichzeitig primäre Neurone sind. Reizaufnahme direkt über Rezeptoren, Verarbeitung und Weiterleitung erfolgt dabei in einer einzigen sensorischen Nervenzelle. Als weiteres Merkmal unter den zerebralen Neuronen sind die ORN neben einzelnen Zellen der subgranulären Zone des Gyrus dentatus im Hippocampus und der Subventrikulären Zone zur adulten Neurogenese befähigt. Die sensorischen Neurone der Nase befinden sich in einem von außen nur schwer zugänglichen Bereich. Für eine Entnahme erfordert es die Kenntnisse eines spezialisierten Arztes und die Betäubung der Nasenhöhlendecke bei der obersten Nasenmuschel. Durch die bedingte Lage der Neurone ist das Material zur Erforschung der Rezeptorneurone und der adulten Neurogenese sehr limitiert. Eine Anreicherung von ORN *in vitro* würde dieses Problem leicht umgehen, da die Neurone für alle Experimente leicht zugänglich wären. Bisher gibt es sehr viele Differenzierungsprotokolle für unterschiedliche somatische Zellen, sowie für neuronale Subtypen. Jedoch gibt es noch kein Protokoll für die spezifische Generierung von olfaktorischen sensorischen Neuronen *in vitro* ausgehend von iPSZ. Neben der Erforschung der adulten Neurogenese ist auch die grundlegende Erforschung der Entwicklung und Reifung der ORN im humanen System noch nicht in Gänze geklärt. Die meisten Daten zur Entwicklung des olfaktorischen Systems basieren auf Experimenten an Modellorganismen, wie Huhn [65], Krallenfrosch [44], Fisch [147] oder Nager [148, 149]. Die gewonnenen Erkenntnisse lassen sich nur bedingt auf das humane System übertragen, da die Anatomie der Nasenhöhle und des Geruchsepithels zwischen den Spezies teilweise sehr stark voneinander abweicht. Auch gibt es speziesübergreifend eine große Varianz in der Expression der olfaktorischen Rezeptoren. Im humanen Genom sind beispielsweise nur sehr wenige der codierenden Rezeptorgene auch Pseudogene. Im murinen Genom dagegen sind ein Drittel der Gene nicht mehr aktiv. Ein Protokoll zur gezielten Anreicherung von ORN in Kultur ermöglicht es, diese Neurone für Versuche einfach und direkt zugänglich zu haben und damit viele noch offene Forschungsfragen zu klären.

3.1. Generierung und Charakterisierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen

3.1.1. Reprogrammierung von Keratinozyten

Keratinozyten wurden von insgesamt drei freiwilligen Haarspendern gewonnen. Von jedem Spender wurden ca. zehn Haare entnommen, wobei auf das Vorhandensein einer gut sichtbaren äußeren Wurzelscheide geachtet wurde. Haarwurzeln lassen sich schnell und nicht invasiv entnehmen und Keratinozyten weisen im Vergleich zu anderen primären Zelllinien eine hohe Reprogrammierungseffizienz auf [12]. Nach einigen Tagen Inkubationszeit wachsen Keratinozyten aus der äußeren Wurzelscheide aus. Diese primären, somatischen Zellen dienen als Ausgangspunkt für die Reprogrammierung. Die Gewinnung und Kultivierung der Keratinozyten erfolgte nach der Publikation von Aasen et al. [17]. Für die Reprogrammierung der drei Keratinozytenlinien wurde ein Lentivirus verwendet das neben einer polyzistronischen Kasette mit den vier Reprogrammierungsfaktoren (*OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, *C-MYC*) [11] eine nachgeschaltete Fluoreszenzkasette enthält. Abbildung 14 zeigt die erfolgreiche Reprogrammierung von Keratinozyten zu iPSZ. Die Fluoreszenzkasette dTomato wird unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar, sobald die Zellen die exogenen Transkriptionsfaktoren exprimieren und wird nach stabiler Expression der Pluripotenzgene epigenetisch wieder abgeschaltet [146]. Erfolgreich reprogrammierte Keratinozyten lassen sich als Stammzellkolonien nach etwa drei bis vier Wochen auf ein Ammenzell-freies System übertragen.

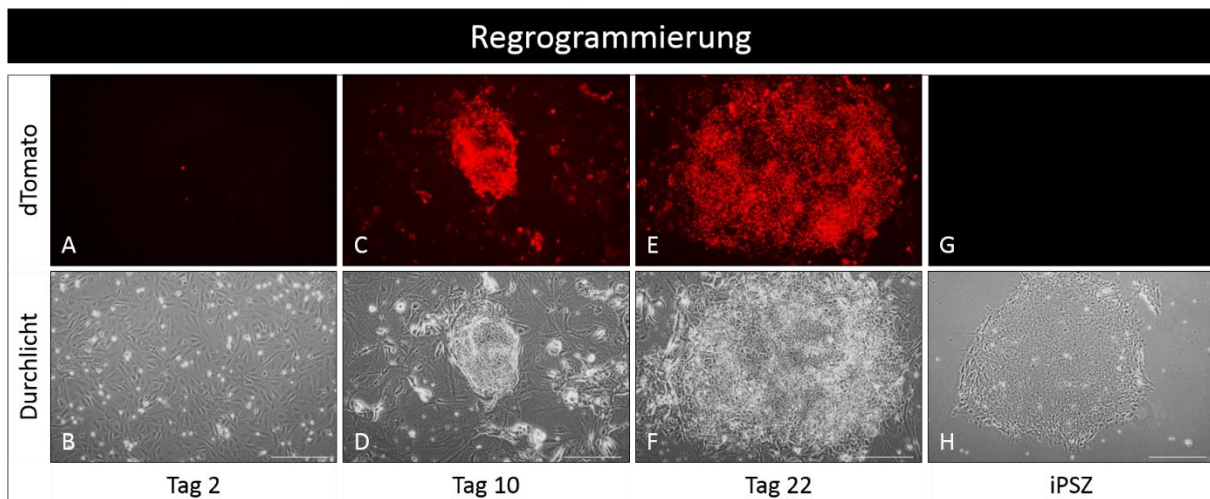


Abbildung 14: Reprogrammierung von Keratinozyten

Die untere Reihe (B, D, F, H) zeigt die Durchlichtbilder einer Reprogrammierung von Keratinozyten. Parallel dazu finden sich in der oberen Reihe (A, C, E, G) die dazu passenden Immunfluoreszenzbilder. Bilder A, B wurden nach zwei Tagen, C, D nach 10 Tagen und E, F nach 22 Tagen Reprogrammierung aufgenommen. Die Bilder G und H zeigen eine iPSZ Kolonie ohne Ammenzellen. Maßstabsbalken für alle Bilder: 100µm.

3.1.2. Expression der Viruskassette nimmt während der Reprogrammierung ab

In dem Prozess der Reprogrammierung von primären somatischen Zellen konnte gezeigt werden, dass die Genexpression der viralen polyzistronischen Kassette abnimmt. Pluripotenzgene sind im Vergleich dazu im gleichen Diagramm (Abbildung 15) dargestellt, um die Abnahme der viralen Kassette zu verdeutlichen. Die Primer zur Detektion der viralen Kassette liegen im Bereich der Fluoreszenzkassette dTomato. Die gemessene Expression der viralen Kassette hat ihren höchsten Punkt bei den direkt infizierten Keratinozyten an Tag null der Reprogrammierung. Über die Zeit der Reprogrammierung fällt das Expressionslevel langsam und stetig ab und geht im Stadium der Stammzellen verloren. Alle drei Pluripotenzgene, *NANOG*, *OCT4* und *SOX2* nehmen während der Reprogrammierung endogen zu. Die *NANOG* Expression ist im Vergleich zu den anderen zwei Pluripotenzgenen bereits am Tag zwei der Reprogrammierung zu messen und nimmt kontinuierlich bis zu den Stammzellen zu. *OCT4* und *SOX2* Expression sind erst ab Tag vier des Reprogrammierungsprozesses detektierbar. Beide Gene nehmen in ihrer Expression auf RNA Ebene ähnlich schnell zu und erreichen den Höhepunkt bei den Stammzellen.

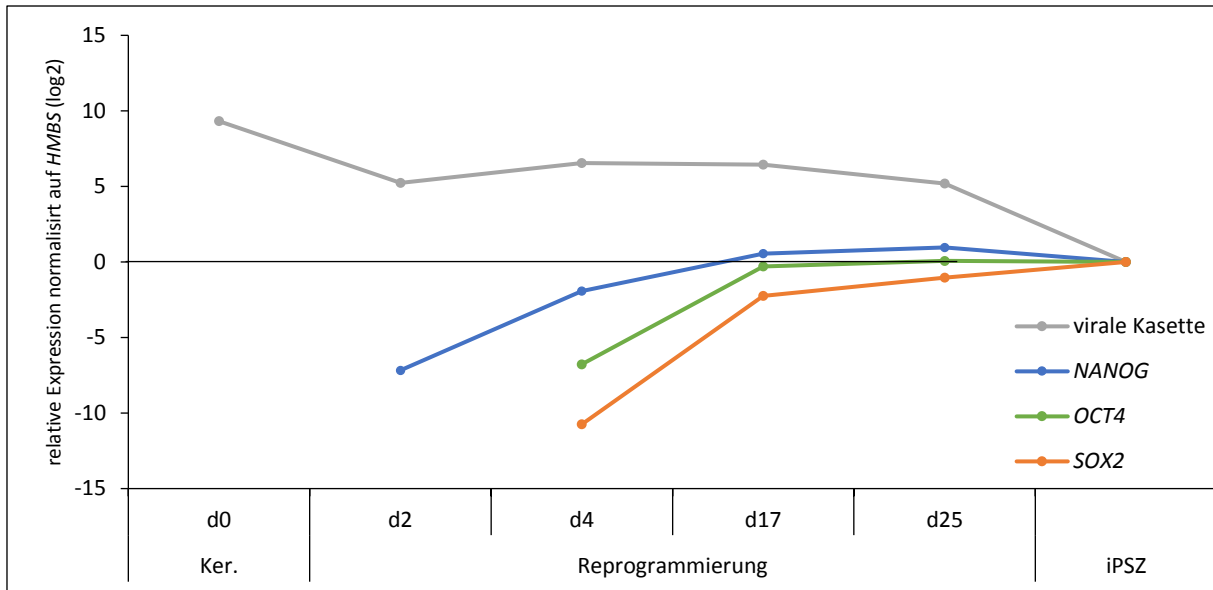


Abbildung 15: Abnahme der viralen Kasette während der Reprogrammierung

Eine humane primäre Zelllinie, hier Keratinozyten (Ker) wurde nach Protokoll reprogrammiert. Die Gesamtdauer der Reprogrammierung erstreckte sich über 25 Tage. Die daraus generierten iPSZ wurden über 15 Passagen in Kultur gehalten und anschließend analysiert. Genexpressionswerte wurden intern mit *HMBS* verrechnet und auf iPSZ bezogen. Zur besseren Darstellung wurden die Werte logarithmisch (\log_2) verrechnet. D= day (Tag)

3.1.3. Expression der Pluripotenzfaktoren nimmt mit der Reprogrammierung zu

Zur genaueren Analyse der Pluripotenzgene (*NANOG*, *OCT4* und *SOX2*) während der Reprogrammierung wurden sehr kurze Zeitabschnitte gewählt (Abbildung 16). Beobachtet werden kann ein Anstieg in allen drei gemessenen Pluripotenzgenen während der Reprogrammierung. Alle drei Gene weisen ihre geringste Expression in den infizierten Keratinozyten auf. *NANOG* und *SOX2* zeigen eine sehr ähnliche Grundexpression, das Basislevel von *OCT4* liegt im Vergleich zu den anderen beiden Genen noch niedriger. Der Kurvenverlauf von *OCT4* und *NANOG* ist über den Verlauf der Reprogrammierung sehr ähnlich. Die höchste Expression wird von allen gemessenen Genen im späten Stammzell Stadium, bei Passage 13 erreicht. Alle drei Gene weisen im frühen Stammzell Stadium eine geringere Expression auf, was zeigt, dass die vollständige Pluripotenz der Stammzellen erst mit fortgeschrittener Passage erreicht ist. Jedoch ist diese auch bereits in einer frühen Passage sehr hoch. Nur die *NANOG* Expression gibt die wirkliche endogene Expression wieder, die beiden anderen Gene werden noch zusätzlich durch die exogene virale Kasette gebildet.

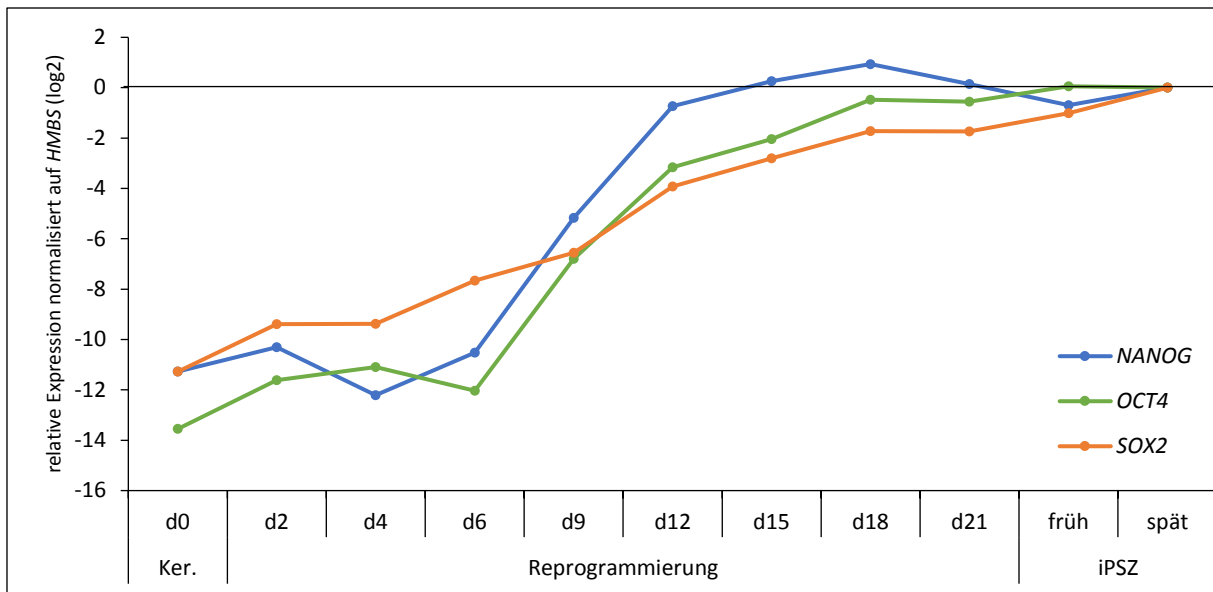


Abbildung 16: Expression der Pluripotenzmarker nimmt während der Reprogrammierung zu. Humane Keratinozyten wurden nach Protokoll reprogrammiert. Die Messpunkte geben die gemessenen Tage (d) der Reprogrammierung an. Stammzellen wurden zu einer frühen Passage p4 und einer späteren Passage, p13 gemessen. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Werte nach einem relativen Bezug zu HMBS logarithmisch auf die Basis 2 verrechnet und auf den Wert „späte iPSZ“ verrechnet.

3.1.4. Induziert pluripotente Stammzellen

Nach einer durchschnittlichen Reprogrammierungszeit von drei bis vier Wochen werden die Kolonien von den Ammenzellen heruntergenommen und wachsen auf Matrigel beschichteten Kulturplatten. Stammzellkolonien haben eine kompakte Form ohne Löcher oder Differenzierungen innerhalb der Kolonie und einen definierten Randbereich. Außerhalb der Kolonien in der Kulturschale sollten sich ebenfalls keine differenzierten Einzelzellen und Stammzellkolonien befinden (Abbildung 17). Es können neben großen, auch kleinere, noch wachsende Kolonien in einer Kulturschale auftreten.

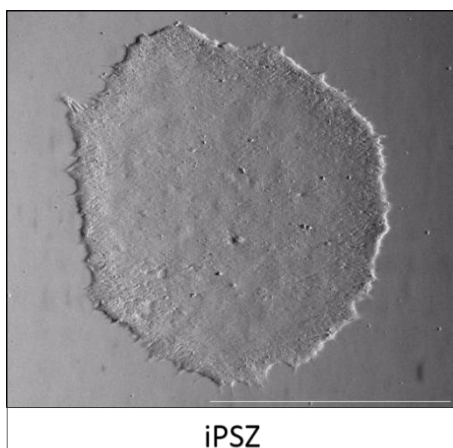


Abbildung 17: Induziert pluripotente Stammzelle

Die Abbildung zeigt eine große, kompakte induziert pluripotente Stammzellkolonie mit definiertem Randbereich ohne differenzierte Zellen. Maßstab: 1000 μm

3.1.5. Generierte Stammzellen sind pluripotent

Aus der Reprogrammierung hervorgehende Stammzellen müssen auf ihre Pluripotenz untersucht werden. Dazu werden auf Proteinebene anerkannte Pluripotenzmarker (z.B. OCT4, SOX2, NANOG) und charakteristische Oberflächenmarker (SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81) gefärbt. Die Pluripotenzmarker sind Transkriptionsfaktoren und weisen eine Kernlokalisierung auf. Die Oberflächenmarker befinden sich auf

der Plasmamembran, bzw. binden an spezifische Glykoproteine der Plasmamembran und sind extrazellulär. Bei jeder Färbung wurde eine Gegenfärbung mit DAPI zur Detektion des Nukleus durchgeführt (Abbildung 18).

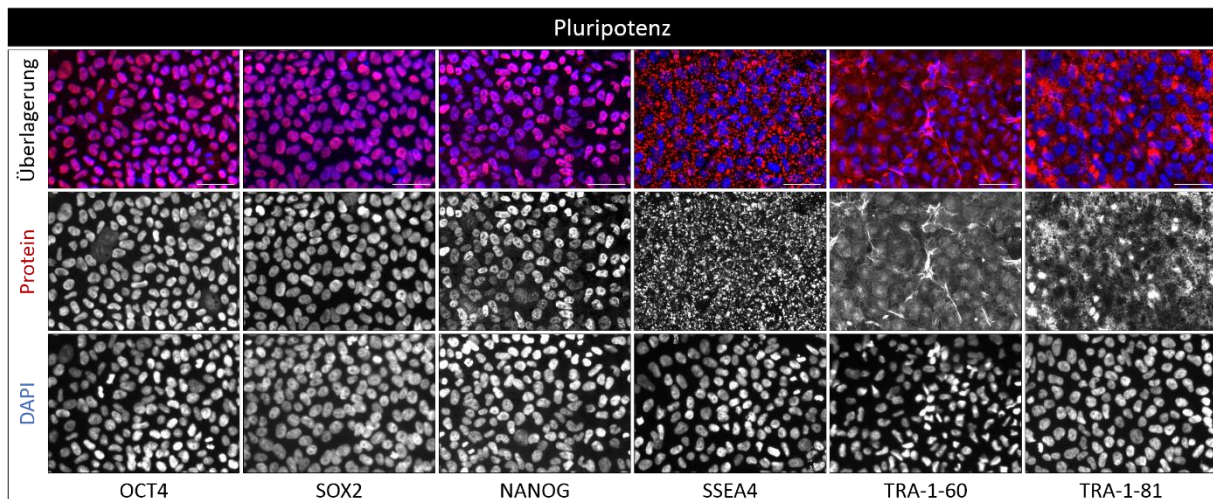


Abbildung 18: Pluripotenzfärbung von iPSZ

Die ersten drei Spalten zeigen die Färbung der Pluripotenzmarker NANOG, OCT4 und SOX2. Die folgenden drei Spalten die Oberflächenmarker SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81. In der untersten Reihe sind jeweils die Kernfärbungen mit DAPI zu sehen, die mittlere Reihe zeigt die spezifische Färbung gegen das gewünschte Protein und das oberste Bild zeigt ein überlagertes Bild aus Kernfärbung mit der immunologischen Detektion des gewünschten Proteins. Maßstab: 50 µm

3.1.6. Generierte Stammzellen können in alle drei Keimblätter differenzieren

Neben der Pluripotenz muss bei Stammzellen auch deren Potential zur Differenzierung in die drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) nachgewiesen werden. Dazu lässt man die Stammzellen in diesem Fall für insgesamt drei Wochen spontan differenzieren und analysiert sie anschließend. Bei einer erfolgreichen Keimblatt-Differenzierung entstehen Zellen aus dem Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Diese Zellen werden zum einen auf RNA Ebene und zum anderen immunologisch auf Protein-Ebene nachgewiesen.

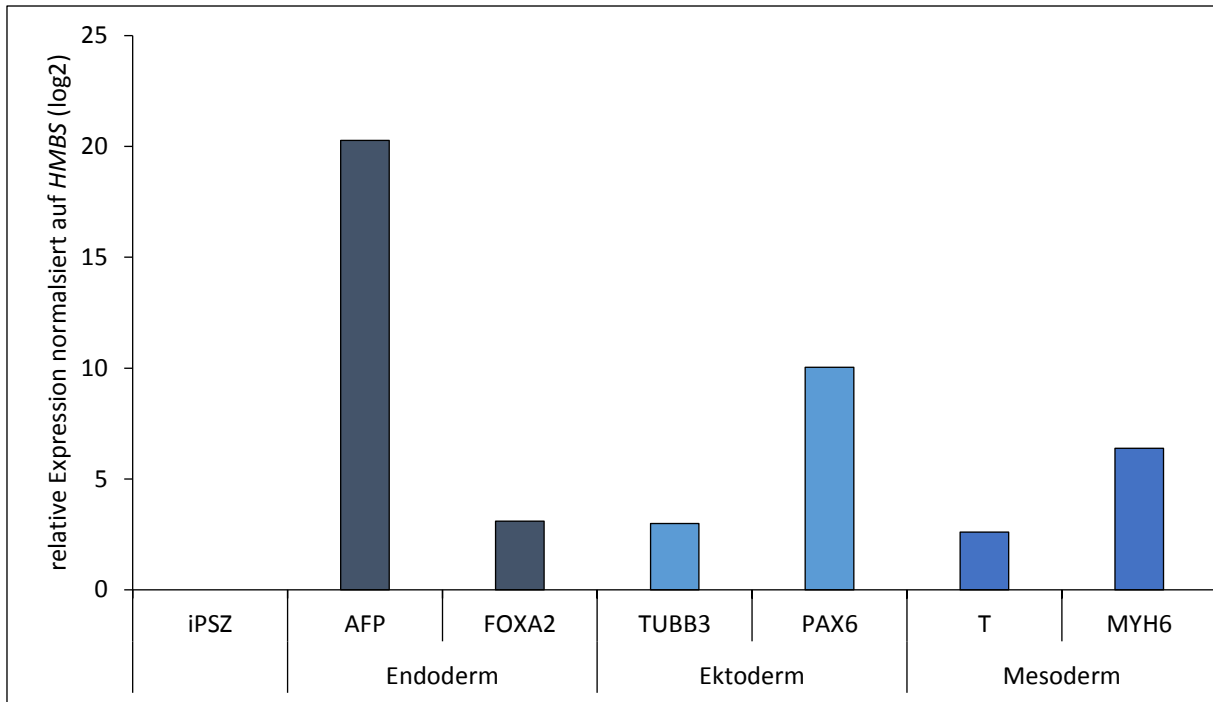


Abbildung 19: Keimblatt Differenzierung von iPSZ auf RNA Ebene

Stammzellen aus reprogrammierten Keratinozyten differenzieren drei Wochen in unterschiedliche Zellen aus allen drei Keimblättern. Die Bildung jedes Keimblattes wird anhand der Genexpression von zwei keimblattspezifischen Genen überprüft. *AFP* und *FOXA2* sind charakteristisch für das Endoderm, *TUBB3* und *PAX6* für das Ektoderm, *T* und *MYH6* für das Mesoderm. Jedes Gen wird intern mit *HMBS* verrechnet und auf undifferenzierte Stammzellen bezogen.

Die Proben der differenzierten Zellen werden mit undifferenzierten Stammzellen verrechnet, um die relative Überexpression der Keimblattmarker zu verdeutlichen. Charakteristisch für das Ektoderm sind die Marker *PAX6* und *TUBB3*, für das Mesoderm *MYH6* und *T*, für das Endoderm *AFP* und *FOXA2*. Für alle gemessenen Marker findet man eine starke Überexpression im Vergleich zu undifferenzierten iPSZ (Abbildung 19).

Auch auf Proteinebene werden die Zellen analysiert, die nach der dreiwöchigen Differenzierung entstanden sind. Hierfür wird ein charakteristischer Marker je Keimblatt gefärbt. DESMIN ist spezifisch für mesodermale Zellen, SOX17 für das Endoderm und TUBB3 für das Ektoderm (Abbildung 20). SOX17 weist eine charakteristische Kernfärbung auf und kolokalisiert mit der DAPI Färbung. Die DESMIN Färbung findet man im Zytoplasma von Zellen mit fibroblastenartiger Morphologie. TUBB3 markiert neuronale Strukturen, wie Axone und Dendriten.

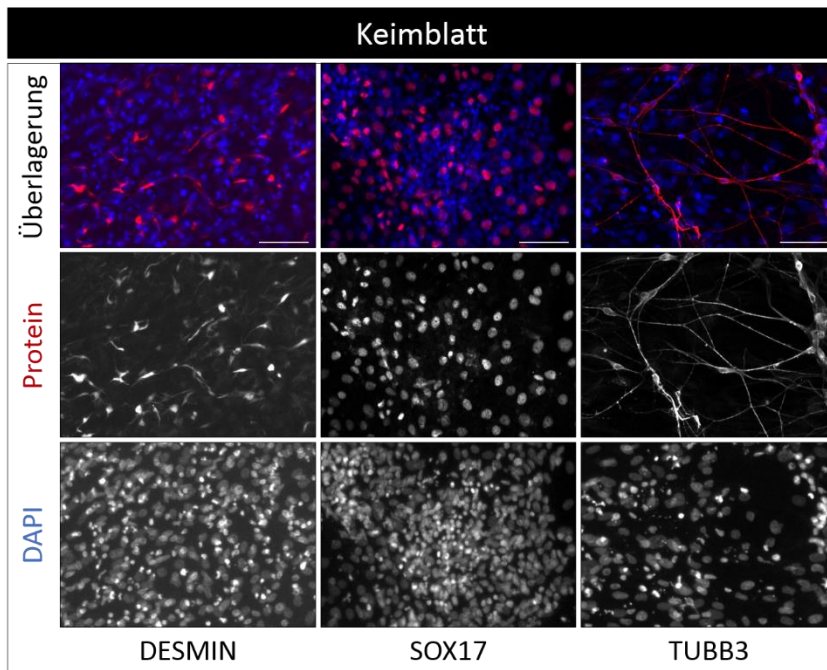


Abbildung 20: Aus Stammzellen können sich Zellen aller drei Keimblätter entwickeln
 Stammzellen aus reprogrammierten Keratinozyten differenzieren drei Wochen in unterschiedliche Zellen aus allen drei Keimblättern. DESMIN färbt die Zellen aus dem Mesoderm, SOX17 aus dem Endoderm und TUBB3 aus dem Ektoderm. In der untersten Reihe sind jeweils die Kernfärbungen mit DAPI zu sehen, die mittlere Reihe zeigt die spezifische Färbung gegen das Marker-Protein und das oberste Bild zeigt ein überlagertes Bild aus Kernfärbung mit der immunologischen Detektion des gewünschten Proteins. Maßstab: 50 µm

3.1.7. Generierte Stammzellen sind AP positiv

Zur Charakterisierung von induzierten Stammzellen aus somatischen Zellen ist neben der Immunfluoreszenzfärbung und Genexpressionsanalyse auch die Detektion der Alkalischen Phosphatase als Nachweis möglich. Dabei werden iPSZ Kolonien, die noch im Reprogrammierungsprozess sind oder bereits reife Stammzellkolonien mit einer Farblösung inkubiert. Ausschließlich pluripotente Stammzellen besitzen das Enzym Alkalische Phosphatase, die diesen zugesetzten Farbstoff umsetzen kann. Diesen Farbumschlag kann man makroskopisch verfolgen (Abbildung 21).

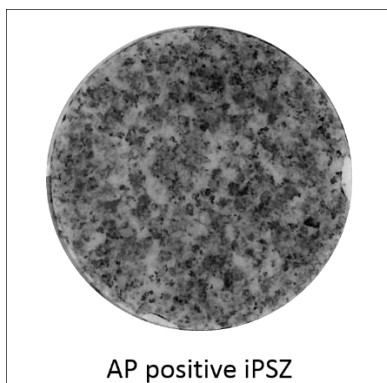


Abbildung 21: Alkalische Phosphatase Färbung
 IPSZ Kolonien während des Reprogrammierungsprozesses werden mit einer Farblösung inkubiert. Das Enzym Alkalische Phosphatase in den Stammzellkolonien setzt diesen Farbstoff um und die Kolonien heben sich als dunkle Flecken von dem Ammenzellrasen ab.

3.2. Generierung eines Differenzierungsprotokolls zu ORN

3.2.1. Ektodermales Differenzierungsprotokoll als Basis?

Während der frühen Gastrulation bildet sich die Präplakodale Region (PPR), die sich unter anderem weiter zur olfaktorischen Plakode differenziert und daraus entwickelt sich das olfaktorische Epithel mit allen spezialisierten Zelltypen. Da im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Protokoll zur Generierung von ORN *in vitro* entwickelt werden soll, müssen die in der menschlichen Entwicklung ablaufenden Schritte bis zum reifen Epithel unter Kulturbedingungen nachgeahmt werden. Im ersten Schritt zum etablierten Protokoll wurde überprüft, ob ein bereits publiziertes Protokoll das die Bildung ektodermaler Neurone fördert als Ausgangsbasis genutzt werden kann.

3.2.1.1. Detektion von Markern der späten Neuralplatte im Rosetten Stadium

Während der humanen Embryogenese entsteht die Präplakodale Region parallel zu der Entwicklung der Neuralplatte (Abbildung 22). Dieser Entwicklungsschritt lässt sich sehr einfach *in vitro* rekapitulieren. Ausplattierte Embryonale Körper/Embryoid Bodies (EBs), welche das Potential haben, in alle drei Keimblättern zu differenzieren, bilden bereits nach sehr kurzer Zeit ektodermale Strukturen aus. Dabei handelt es sich um sogenannte neurale Rosetten, die dem Querschnitt des embryonalen Neuralrohrs entsprechen. Diese neuronalen Rosetten enthalten unterschiedliche Zelltypen, die unter anderem positiv für neuro-ektodermale Marker, Neuralleistenmarker und PPR Marker sind. Die Neuralplatte zeichnet sich durch die Expression von *NCAM1*, *SOX1* und *SOX2* aus. Lateral von der neuralen Platte entwickelt sich die Neuralleiste, die positiv für *FOXD3*, *SOX9* und *SOX10* ist. Das Oberflächenektoderm, aus dem sich später beispielsweise die Epidermis mit Drüsen entwickelt exprimiert Zytokeratin 19 (*KRT19*). Zwischen dem Oberflächenektoderm und der Neuralleiste bildet sich nun die Präplakodale Region aus. Sie bildet den Ursprung der Plakoden und exprimiert die Gene *EYA1*, *EYA2*, *SIX1* und *SIX4*. Das Vorhandensein von positiven Zellen für die PPR ist entscheidend für die Entwicklung eines Differenzierungsprotokolls zu ORN. Um nun zu überprüfen, ob dieser Zelltyp in den neuronalen Rosetten vorhanden ist, wurde mit Markern spezifisch für die PPR, Neuralleiste und Neuralrohr gefärbt. Zudem wurde die Genexpression der Marker im Vergleich zu iPSZ analysiert.

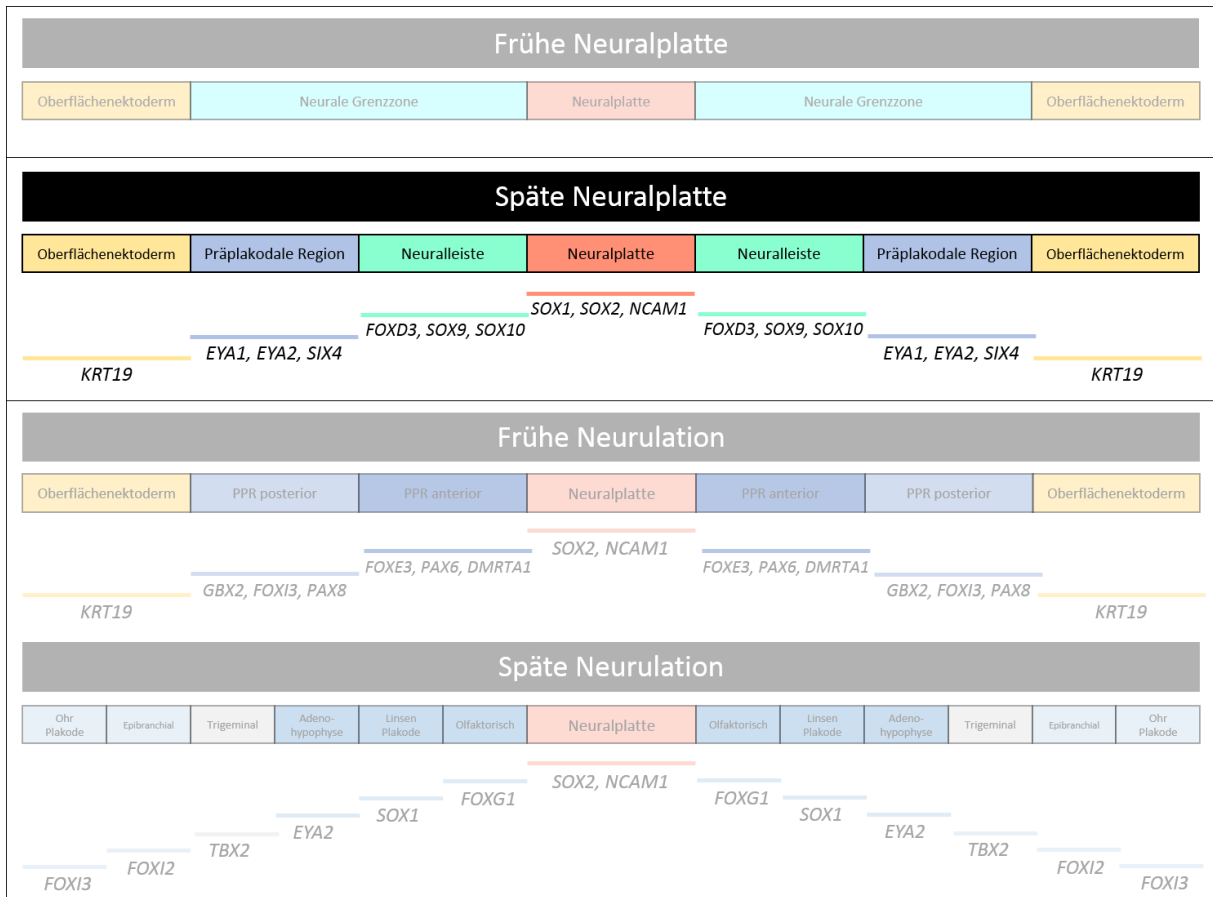


Abbildung 22: Genexpression während der Entwicklung der späten Neuralplatte

Im humanen embryonalen Entwicklungsstadium der späten Neuralplatte bilden sich Zelltypen der Neuralplatte (Marker: *NCAM1*, *SOX1*, *SOX2*), der Neuralleiste (Marker: *FOXD3*, *SOX9*, *SOX10*), der Präplakodalen Region (PPR) (Marker: *EYA1*, *EYA2*, *SIX1*, *SIX4*) und des Oberflächenektoderms (Marker: *KRT19*).

Das ektodermale Differenzierungsprotokoll wurde im Stadium der Rosetten an drei unterschiedlichen Zeitpunkten in direktem Vergleich zu iPSZ auf die Markergene der späten Neuralplatte hin analysiert (Abbildung 23). Es wurden die gleichen Gene untersucht, die charakteristisch für die verschiedenen Zellzonen während des Stadiums der neuralen Platte sind.

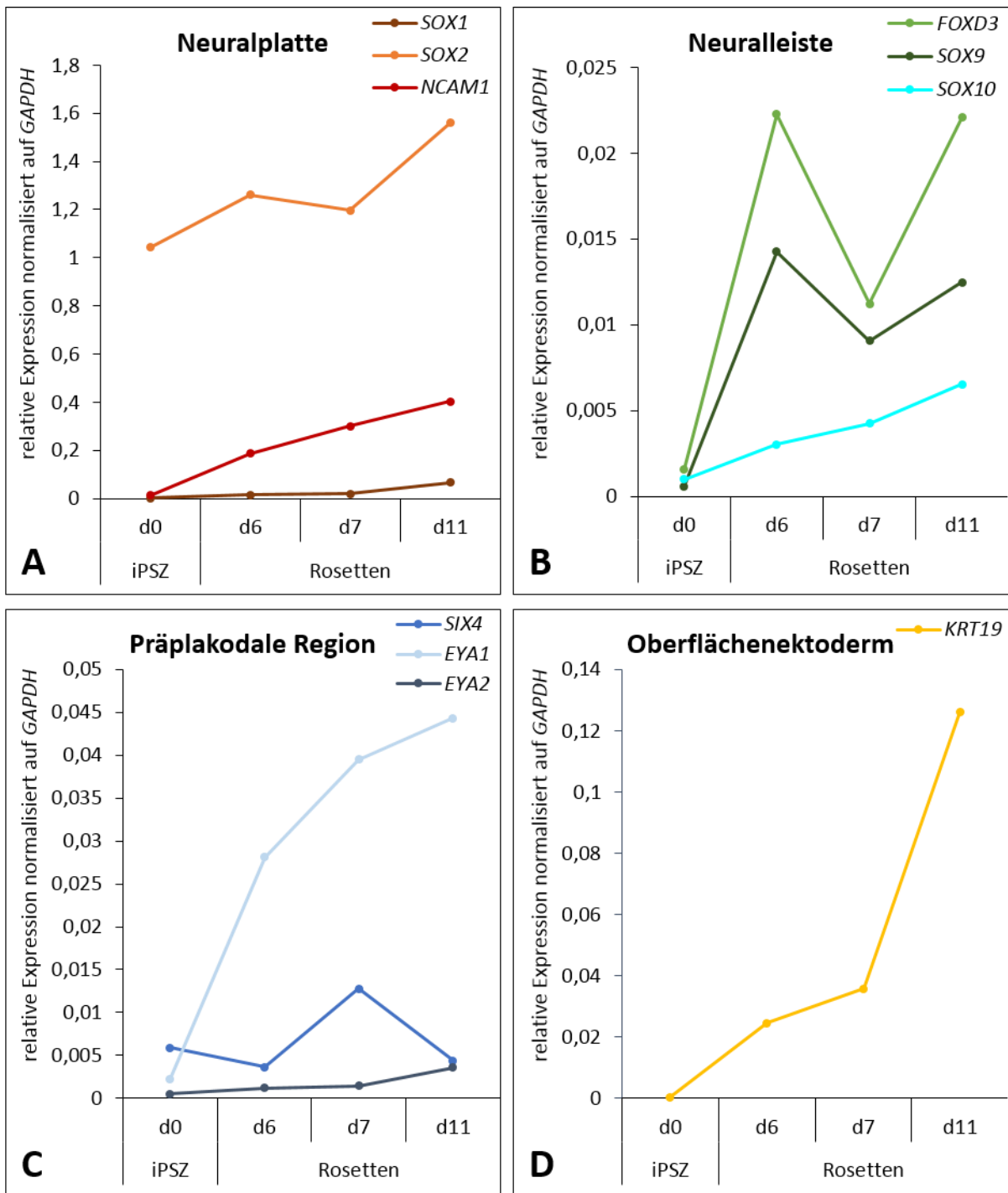


Abbildung 23: Analyse der Marker für die späte Neuralplatte während der Differenzierung

Analysiert werden die Marker, die während des embryonalen Stadiums der späten Neuralplatte exprimiert werden. Zu diesem Zeitpunkt besteht bereits die Region der Neuralplatte (A) mit den spezifischen Markern *NCAM1*, *SOX1*, und *SOX2* die Neuralleiste (B) mit *FOXD3*, *SOX9* und *SOX10*, die Präplakodale Region (C) mit *EYA1*, *EYA2*, und *SIX4* und das Oberflächenektoderm (D) mit *KRT19*. Es wird die absolute Expression, bezogen auf das Referenzgen *GAPDH* gezeigt.

Die Genexpression der drei Marker der Neuralplatte (A) (*NCAM1*, *SOX1* und *SOX2*) werden zum Zeitpunkt der iPSZ und drei aufeinanderfolgenden Tage im Stadium der Rosetten in einem Verlaufsdiagramm dargestellt. Die Kurven der drei Markergene zeigt ein deutlicher Anstieg ausgehend von den Stammzellen, die Genexpression nimmt während der Differenzierung konstant zu. Bei den Markern für die Neuralleiste (B) (*FOXD3*, *SOX9* und *SOX10*) lässt sich ein sehr geringes Level in den

Stammzellen beobachten. Die höchste Expression zeigen *FOXD3* und *SOX9* zu Beginn des Rosetten Stadiums, fällt ab und steigt zum Ende wieder auf nahezu das gleiche Level an. Die Genexpression von *SOX10* steigt konstant über die analysierte Zeit an. Auch die Markergene für die Präplakodale Region (C) *EYA1*, *EYA2* und *SIX4* sind in den Stammzellen gering exprimiert und steigen während des Rosetten Stadiums an. Eine Ausnahme bildet dabei *SIX4*. Dessen Expression zeigt den höchsten Wert an Tag sieben der Differenzierung und fällt vier Tage später wieder auf das Niveau zu Beginn der Rosetten ab. Für das Oberflächenektoderm (D) wurde *KRT19* gemessen, das einen sehr starken Anstieg in den gemessenen Werten über die Zeit der Differenzierung aufweist. Zusammenfassend lässt sich aus den Grafiken schließen, dass die gemessenen Gene, die die unterschiedlichen Regionen zum Zeitpunkt der späten Neuralplatte in der embryonalen Entwicklung widerspiegeln auch alle in der Differenzierung exprimiert werden. Die Gene sind nicht nur messbar, sondern steigen auch konstant während der frühen Differenzierungsphase zum Rosetten Stadium an.

3.2.1.2. Analyse von PPR Markern im Rosetten Stadium

Da der Zeitpunkt der Präplakodalen Region (PPR) (siehe Abbildung 22) für die Entwicklung des Protokolls entscheidend ist, wurde ein zusätzlicher Versuch durchgeführt. Die differenzierten Zellen wurden an zwei Zeitpunkten im Rosetten Stadium auf RNA und Protein Ebene auf die PPR Marker *EYA* und *SIX* untersucht. Im Vergleich zum vorhergehenden Versuch (Abbildung 23) wurde eine andere Kontrollzelllinie verwendet und die Nachweismethode zur Detektion der RNA unterscheidet sich hinsichtlich der verwendeten Sonden und des Detektionsgerätes. Auf RNA Ebene zeigt *SIX1* einen signifikanten Anstieg gegenüber den iPSZ über die zwei gemessenen Zeitpunkte im Rosetten Stadium. Auch lässt sich das Protein wie erwartet im Zellkern zur gleichen Zeit detektieren (Abbildung 24).

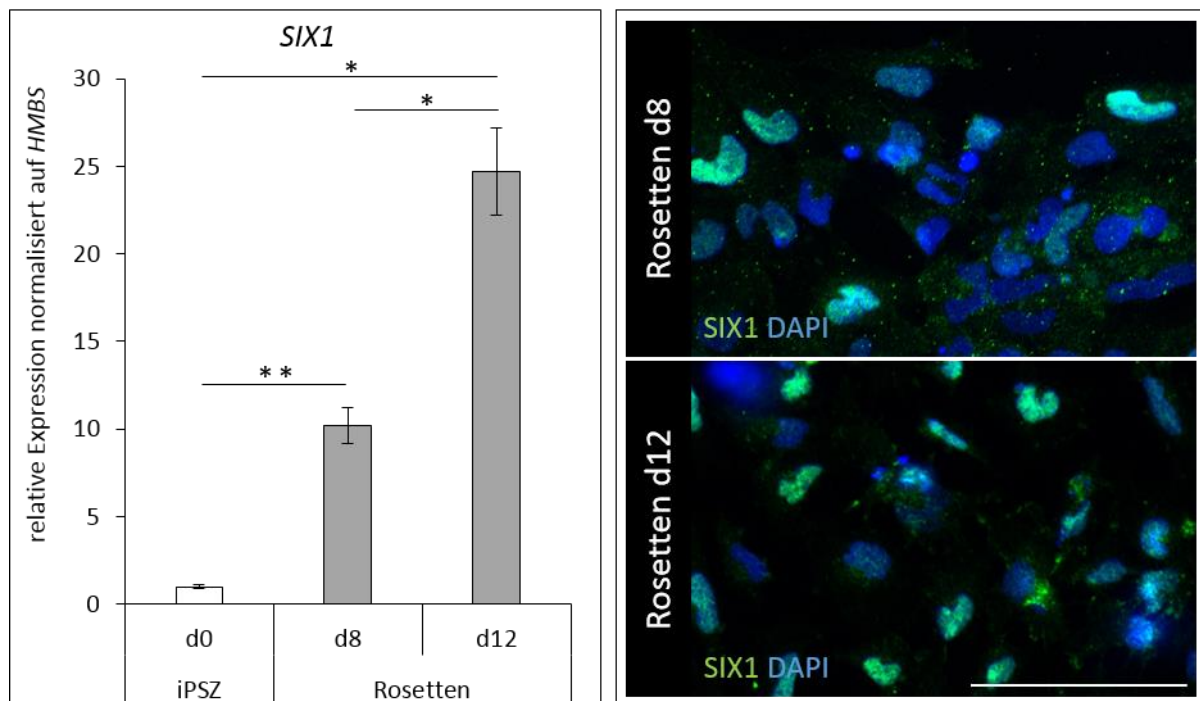


Abbildung 24: *SIX1* Expression während des Rosetten Stadiums

Die linke Spalte zeigt die RNA Expression von *SIX1* zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierung. Die Daten wurden intern mit dem Referenzgen *HMBS* verrechnet und relativ auf iPSZ bezogen. Der Fehlerbalken entspricht dem SEM, Signifikanzen: $P \leq 0,5$: *, $P \leq 0,1$: **, $P \leq 0,01$: ***. Die rechte Spalte gibt die immunologische Detektion des *SIX1* Proteins zu den gleichen Zeitpunkten wieder. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI, Maßstab: 100 μm .

Die Genexpression von *SIX4* fällt signifikant in beiden Zeitpunkten im Rosetten Stadium gegenüber der Grundexpression in iPSZ. Das Protein ist zu den gleichen Zeitpunkten zytoplasmatisch lokalisiert (Abbildung 25).

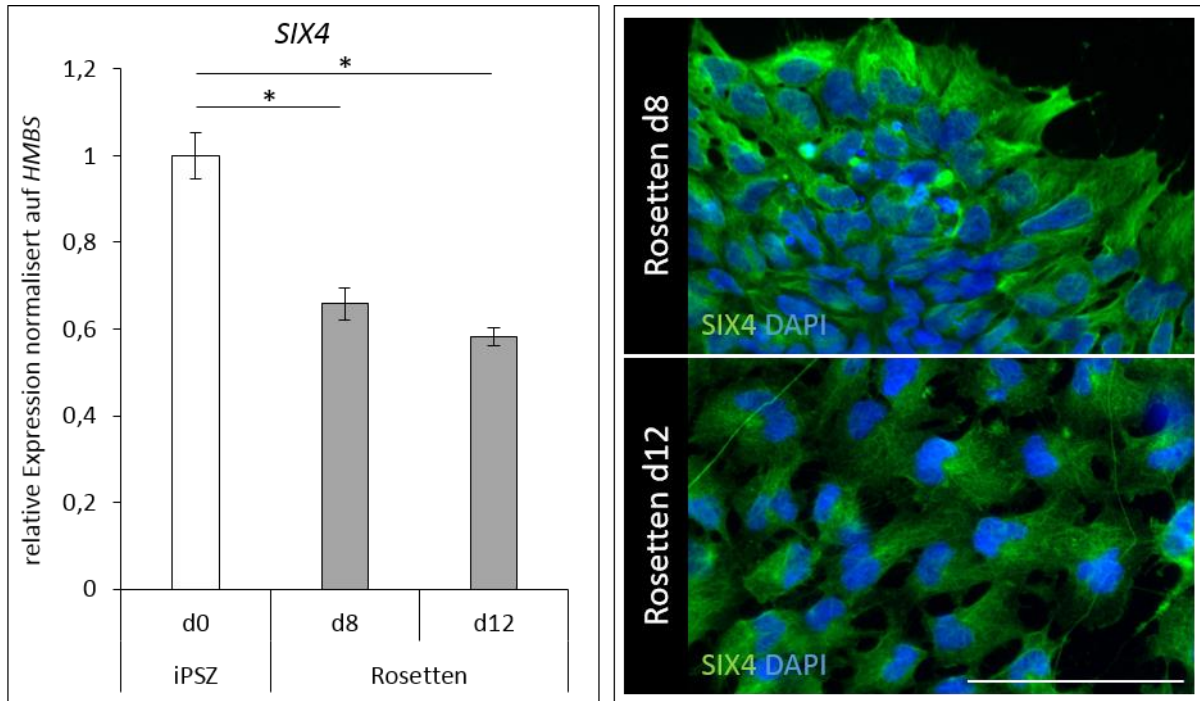


Abbildung 25: *SIX4* Expression während des Rosetten Stadiums

Die linke Spalte zeigt die RNA Expression von *SIX4* zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierung. Die Daten wurden intern mit dem Referenzgen *HMBS* verrechnet und relativ auf iPSZ bezogen. Der Fehlerbalken entspricht dem SEM, Signifikanzen: $P \leq 0,5$: *, $P \leq 0,1$: **, $P \leq 0,01$: ***. Die rechte Spalte gibt die immunologische Detektion des *SIX4* Proteins zu den gleichen Zeitpunkten wieder. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI, Maßstab: 100 μm .

An Tag acht der Differenzierung steigt die *EYA1* Expression signifikant gegenüber dem Wert in den Stammzellen an. Vier Tage später (Tag 12) fällt die Expression wieder, ist aber immer noch hoch signifikant erhöht gegenüber dem Ausgangswert. Auf Proteinebene kann man *EYA1* im Zytoplasma detektieren (Abbildung 26).

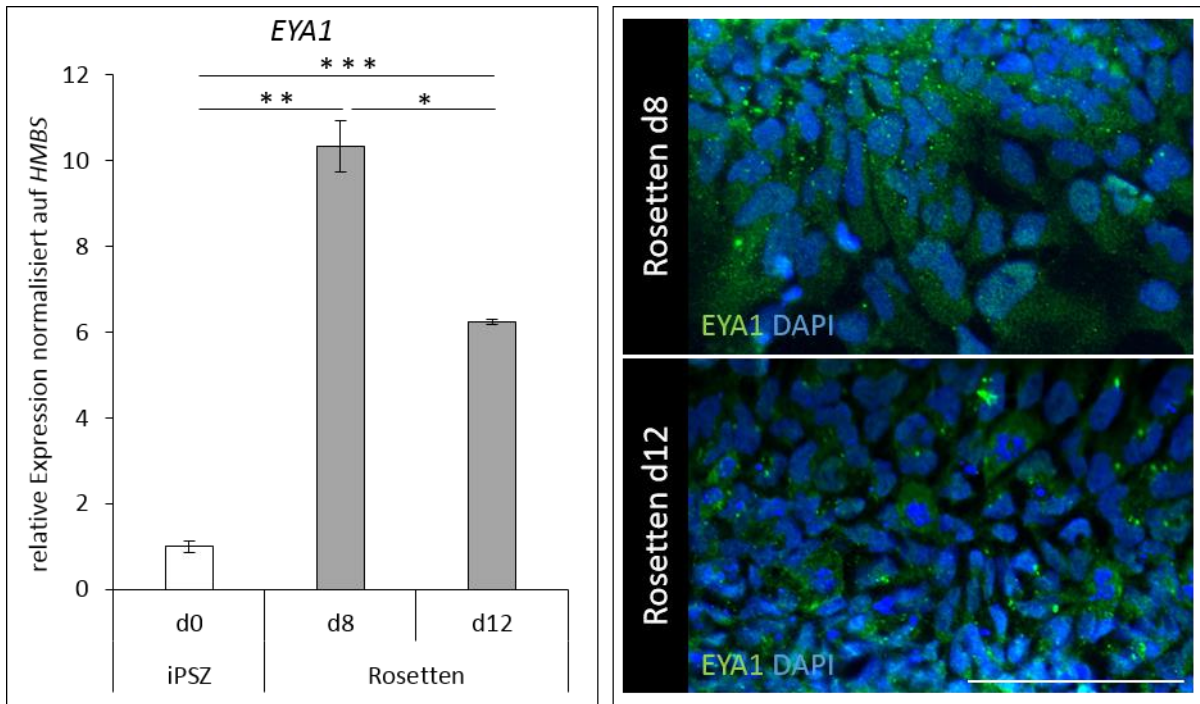


Abbildung 26: EYA1 Expression während des Rosetten Stadiums

Die linke Spalte zeigt die RNA Expression von EYA1 zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierung. Die Daten wurden intern mit dem Referenzgen HMBS verrechnet und relativ auf iPSZ bezogen. Der Fehlerbalken entspricht dem SEM, Signifikanzen: $P \leq 0,5$: *, $P \leq 0,1$: **, $P \leq 0,01$: ***. Die rechte Spalte gibt die immunologische Detektion des EYA1 Proteins zu den gleichen Zeitpunkten wieder. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI, Maßstab: 100 μm .

Auf RNA Ebene zeigt sich in der Genexpression von EYA2 kein signifikanter Unterschied zwischen den Stammzellen und den zwei gemessenen Zeitpunkten während des Rosetten Stadiums. Das EYA2 Protein ist im Zytoplasma lokalisiert.

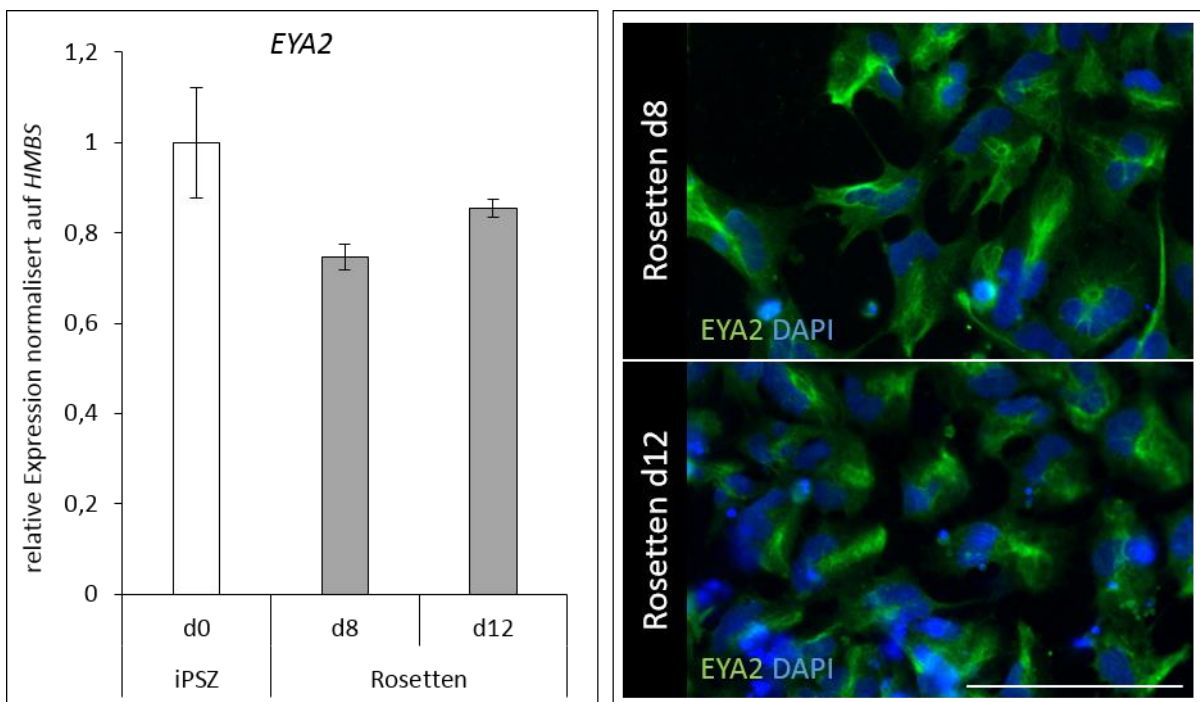


Abbildung 27: EYA2 Expression während des Rosetten Stadiums

Die linke Spalte zeigt die RNA Expression von EYA2 zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierung. Die Daten wurden intern mit dem Referenzgen HMBS verrechnet und relativ auf iPSZ bezogen. Der Fehlerbalken entspricht dem SEM. Die rechte Spalte gibt die immunologische Detektion des EYA2 Proteins zu den gleichen Zeitpunkten wieder. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI, Maßstab: 100 µm.

3.2.1.3. Abgrenzung von anteriorer zu posteriorer Plakode während der Differenzierung

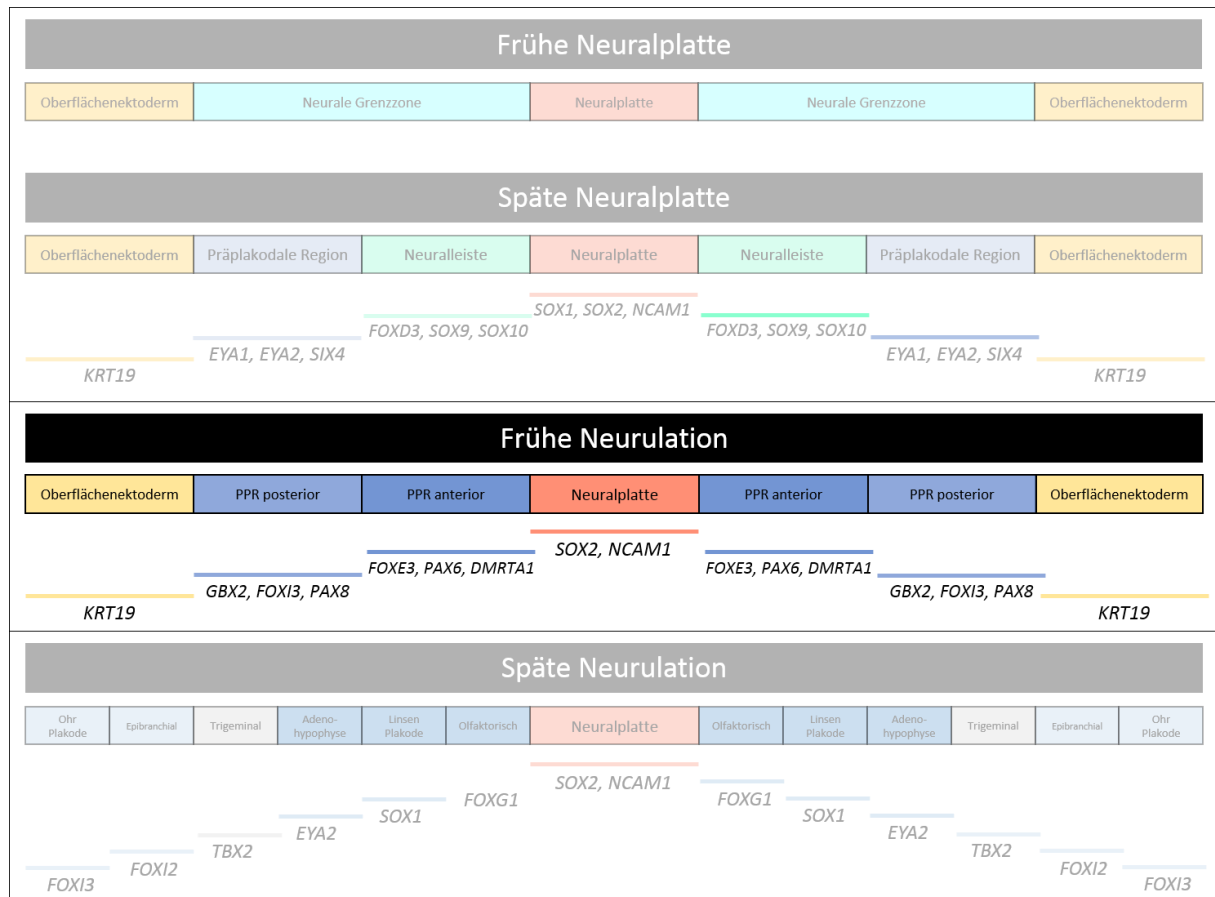


Abbildung 28: Genexpression während der frühen Neurulation

Im humanen embryonalen Entwicklungsstadium der frühen Neurulation differenziert sich die Präplakodale Region (PPR) in einen anterioren Teil (Marker: *DMRTA1, FOXE3, PAX6*) und einen posterioren Teil (Marker: *FOXI3, GBX2, PAX8*). Die Neuralplatte und das Oberflächenektoderm sind benachbarte Strukturen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die embryonal exprimierten Gene zum Zeitpunkt der späten Neuralplatte auch in den frühen Zeitpunkten des Differenzierungsprotokolls detektiert werden können. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob auch die Marker der frühen Neurulation identifiziert werden können. In diesem Stadium der humanen Entwicklung differenziert sich die Präplakodale Region in einen anterioren und posterioren Bereich, aus denen sich später die spezifischen Plakoden entwickeln (Abbildung 28).

Die Markergene *NCAM1* und *SOX2* für die neurale Platte (Abbildung 29 A) zeigen ab dem Stadium der neuralen Stammzellen (NSZ) einen unterschiedlichen Kurvenverlauf. *NCAM1* zeigt einen deutlichen Anstieg in der Genexpression ausgehend von den iPSZ bis zu den sieben Tage alten Neuronen (Tag 33 der Differenzierung). *SOX2* bleibt im NSZ Stadium konstant auf dem Level des späten Rosetten

Stadiums und fällt im Laufe der Differenzierung unter den Wert der iPSZ. Dieses Expressionsmuster ist verwunderlich, da SOX2 ein wichtiges Gen im Pluripotenznetzwerk darstellt. Die Marker der posterioren Präplakodalen Region, *FOXI3*, *GBX2* und *PAX8* (Abbildung 29 B) zeigen einen Anstieg in ihrem Kurvenverlauf mit einer maximalen Expression im späten Rosetten Stadium. Die Genexpression dieser spezifischen Marker fällt in den folgenden Tagen der Differenzierung wieder auf das Level der Stammzellen, oder noch tiefer ab. Im Vergleich zu den posterioren PPR Markern, zeigen die Gene des anterioren PPR Bereichs (*DMRTA1*, *FOXE3*, *PAX6*) ihre höchste Expression im Stadium der neuralen Stammzellen (Abbildung 29 C). Im weiteren Verlauf der Differenzierung fällt die Expression wieder auf das Ausgangslevel der iPSZ zurück.

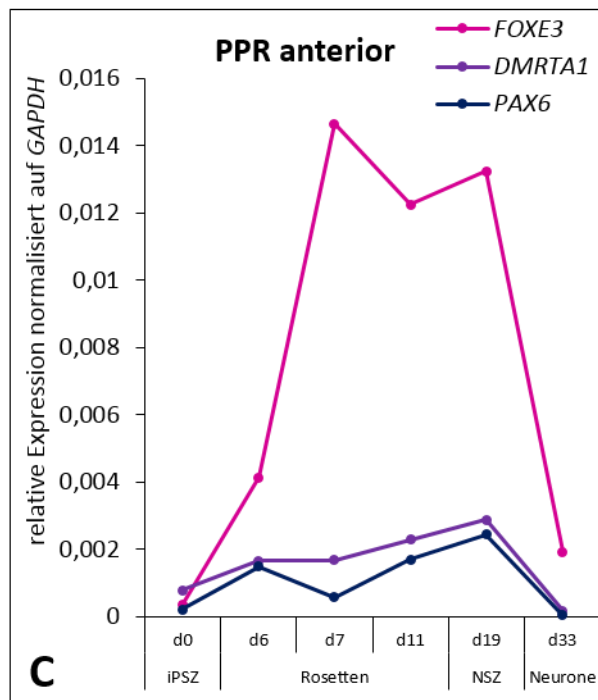
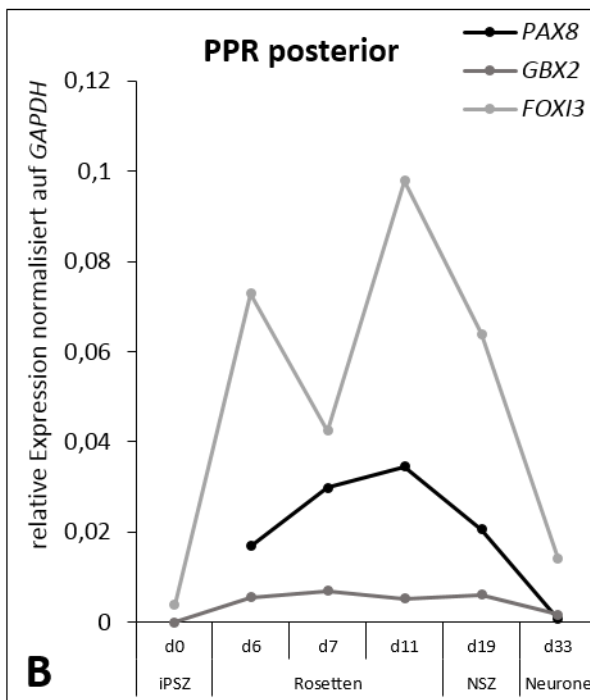
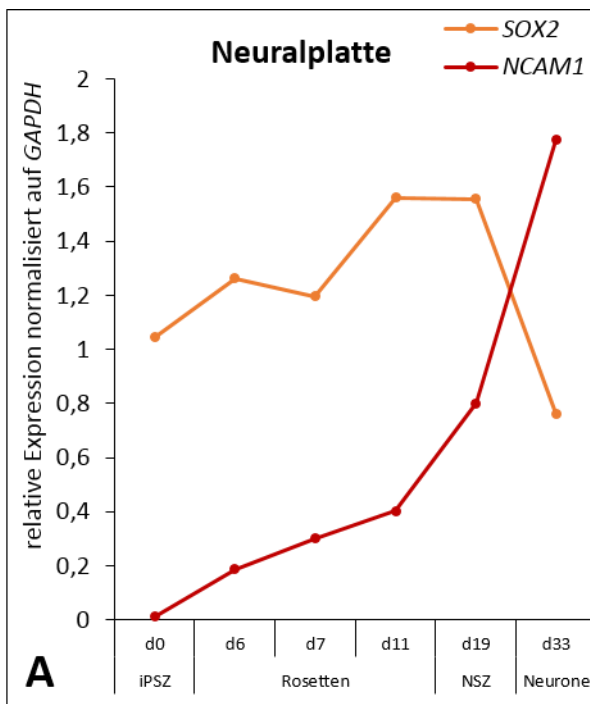


Abbildung 29: Analyse der Marker für die frühe Neurulation während der Differenzierung

Analysiert werden die Marker, die während des embryonalen Stadiums der frühen Neurulation exprimiert werden. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Region der Neuralplatte (A) mit den spezifischen Markern *NCAM1* und *SOX2*, die posteriore Präplakodale Region (PPR) (B) mit *FOXI3*, *GBX2* und *PAX8* und die anteriore PPR (C) mit *DMRTA1*, *FOXE3*, und *PAX6*. Es wird die absolute Expression, bezogen auf das Referenzgen *GAPDH* gezeigt.

Da es sich bei der *in vitro* Differenzierung um einen eher fließenden Prozess handelt, bei dem die einzelnen Stadien, die die *in vivo* Entwicklung nachspielen sollen, sich nicht so einfach voneinander abgrenzen lassen, finden sich die einzelnen embryonalen Stadien parallel zueinander oder teilweise überlappend in den Differenzierungsstadien wieder.

3.2.1.4. Detektion von Plakodenmarkern während der Differenzierung

Aus den anterioren und posterioren PPR Bereichen während der frühen Neurulation differenzieren sich während der embryonalen Entwicklung die Plakoden (Abbildung 30). Im folgenden Versuchsansatz wird das ektodermale Ausgangsprotokoll dahingehend überprüft, ob die Ausbildung bestimmter Plakoden auf RNA Ebene zu unterscheiden ist. Hierfür werden Plakoden-spezifische Marker zu unterschiedlichen Zeiten während der Differenzierung analysiert.

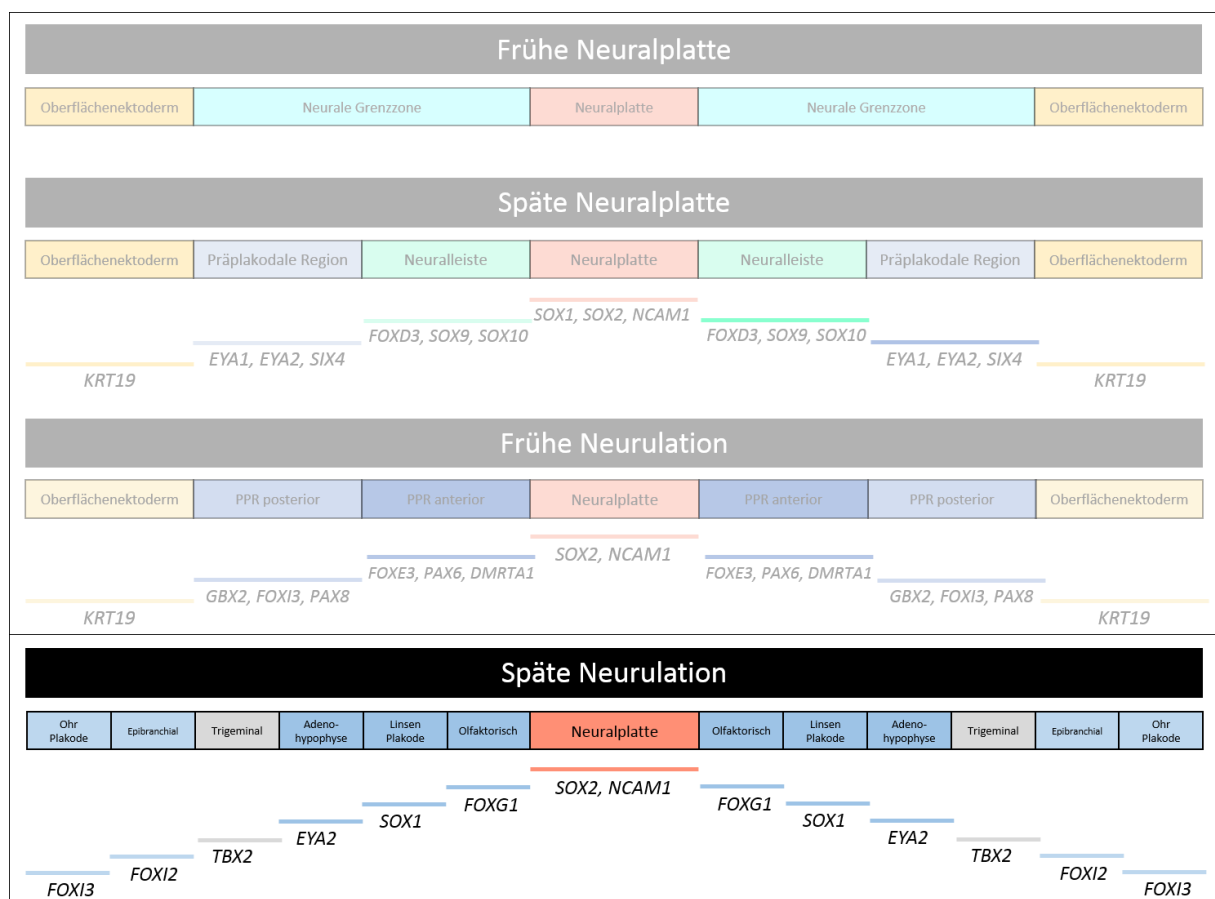


Abbildung 30: Genexpression während der späten Neurulation

Im humanen embryonalen Entwicklungsstadium der späten Neurulation bilden sich neben den Zelltypen der Neuralplatte (Marker: *NCAM1*, *SOX2*) die unterschiedlichen Plakoden heraus. Aus der posterioren Präplakodalen Region (PPR) gehen die Ohr Plakode (Marker: *FOXI3*) und die epibranchiale Plakode (Marker: *FOXI2*) hervor. Die olfaktorische Plakode (Marker: *FOXP1*), die Linsen Plakode (Marker: *SOX1*) und die adeno-hypophysale Plakode (Marker: *EYA2*) differenzieren sich aus der anterioren PPR. Dazwischen entwickelt sich die trigeminale Plakode (Marker: *TBX2*) aus der intermediären PPR (nicht gezeigt).

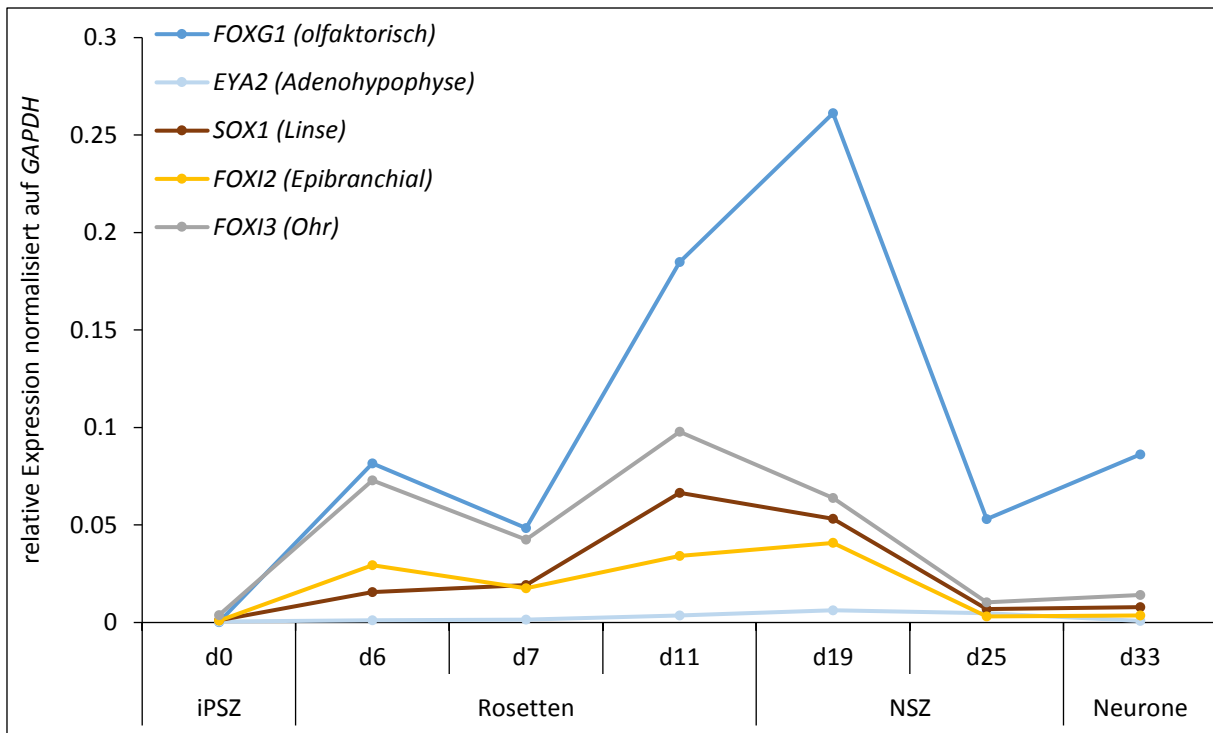


Abbildung 31: Analyse der Marker für die späte Neurulation während der Differenzierung

Analysiert werden die Marker, die während des embryonalen Stadiums der späten Neurulation exprimiert werden. Zu diesem Zeitpunkt haben sich bereits die unterschiedlichen Plakoden entwickelt. *FOYG1* als Marker für die olfaktorische Plakode, *EYA2* für die Adenohypophyse, *SOX1* für die Linsen Plakode, *FOYI2* für die epibranchiale Plakode und *FOYI3* für die Ohr Plakode. Es wird die absolute Expression, bezogen auf das Referenzgen *GAPDH* gezeigt.

Während der Differenzierung wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten spezifische Plakodenmarker analysiert. Dabei wurde für jede Plakode ein spezifischer Marker näher angeschaut: *FOYG1* als Marker für die olfaktorische Plakode, *EYA2* für die Adenohypophyse, *SOX1* für die Linsen Plakode, *FOYI2* für die epibranchiale Plakode und *FOYI3* für die Ohr Plakode (Abbildung 31). Über die Zeit der Differenzierung nehmen alle Marker zu. Bezogen auf iPSZ zeigt *FOYG1*, ein Marker für die olfaktorische Plakoden die höchste Expression an Tag 19 während der Differenzierung. Zu diesem Punkt befinden sich die Zellen in einem frühen Stadium der neuralen Stammzellen. Alle anderen Marker zeigen ihr Maximum im Stadium der späten neuralen Rosetten.

3.2.1.5. Zusammenfassung: Eignet sich das ektodermale Protokoll als Basis für eine Differenzierung zu ORN?

Das ektodermale Differenzierungsprotokoll fördert das gerichtete Wachstum von Zellen in die ektodermale Richtung. Darunter fallen beispielsweise neurale Vorläuferzellen und Neurone. Dieses Protokoll wurde dahingegen überprüft, ob es als Basis für die *in vitro* Generation von olfaktorischen Rezeptorneuronen dienen kann. ORN entstehen im Gegensatz zu kranialen Neuronen nicht aus dem Neuralrohr, das sich während der Neurulation ausbildet, sondern aus Plakoden. Diese entwickeln sich zeitgleich und parallel zu dem Neuralrohr. Lassen sich Vorläuferzellen der olfaktorischen Plakode, die den direkten Ursprung der später reifen ORN darstellt in dem Differenzierungsprotokoll detektieren? Bei einem positiven Ergebnis besteht die Möglichkeit, durch die gezielte Förderung dieser Zellen ein Protokoll zur Differenzierung von ORN zu entwickeln.

Die analysierten Daten der frühen Stadien des ektodermalen Protokolls zeigen eine hohe Markergenexpression für die unterschiedlichen Stadien (späte Neuralplatte, frühe Neurulation, späte

Neurulation) der frühen humanen Embryogenese. Es können sowohl die unterschiedlichen Plakoden als auch deren Vorstufen über spezifische Marker auf RNA Ebene identifiziert werden. Zusätzlich können auf Proteinebene die Daten der Genexpression bestätigt werden: Die PPR Marker sind bereits im frühen und späten Rosetten Stadium exprimiert. Zusammenfassend kann man sagen, dass sich das ektodermale Differenzierungsprotokoll sehr gut als Grundlage zur Generierung eines Protokolls für die *in vitro* Herstellung von ORN eignet.

3.2.2. OMP Detektion in ektodermalen Protokoll

In vorhergehenden Experimenten konnte auf RNA und Protein Ebene gezeigt werden, dass die für die olfaktorische Entwicklung notwendigen PPR Vorläuferzellen im Stadium der Rosetten vorhanden sind. Darauf aufbauend wird nun überprüft, ob bereits in diesem ungerichteten ektodermalen Differenzierungsprotokoll OMP-positive Zellen detektiert werden können. OMP ist ein allgemein anerkannter und sehr spezifischer Marker für reife sensorische Neurone der Nase und dient im Rahmen dieser Doktorarbeit als Marker zur Bestimmung der Ausbeute an ORN am Ende einer Differenzierung.

Ausgehend für die Entwicklung eines Differenzierungsprotokolls für ORN wurde zunächst die Grundexpression des Markergens OMP in Stammzellen und in adulten Neuronen getestet. Als Positiv-Kontrolle diente die isolierte RNA aus einer humanen Biopsie (Abbildung 32). Im ungerichteten Protokoll, bei dem alle Arten von Neurone entstehen können, kann eine zehnfach höhere OMP Expression im Vergleich zu den Stammzellen detektiert werden. Somit kann dieses Protokoll als Basis für die Generierung von ORN genutzt werden. Das Ziel war nun, dieses Protokoll soweit durch die gezielte Zugabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu verändern, dass eine höhere OMP Expression am Ende der Differenzierung detektiert werden kann. Experimentell wurde dazu parallel zu dem aktuell veränderten Protokoll das ungerichtete Protokoll mitgeführt und diente als direkter Vergleich in der OMP Ausbeute.

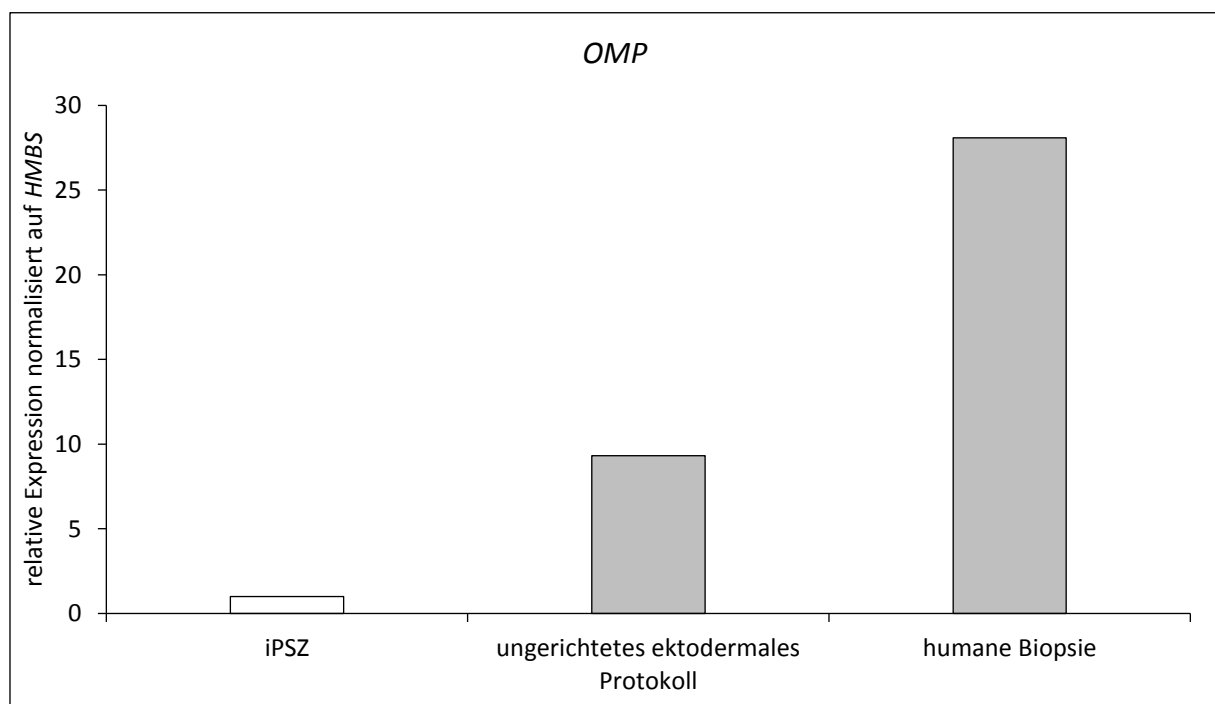


Abbildung 32: OMP Expression in iPSZ im Vergleich zum ungerichteten Differenzierungsprotokoll

Dargestellt ist die Genexpressionsanalyse von *Omp* in iPSZ im Vergleich zu Neuronen, die aus einem ungerichteten ektodermalen Protokoll entstanden sind. Im Vergleich zueinander ist *OMP* fast zehnfach mehr in den Neuronen vorhanden, in der humanen Biopsie kann eine fast dreißigfache Expression beobachtet werden. Genexpressionswerte wurden intern mit *HMBS* verrechnet und auf iPSZ bezogen. Eine statistische Signifikanz konnte aufgrund zu geringer Anzahl an Biopsien nicht errechnet werden.

3.2.3. Zugabe von BMP4 erhöht die OMP Ausbeute in den Neuronen

Nachdem die Ergebnisse des ersten Experiments bereits gezeigt hatten, dass in einem ungerichteten neuronalen Protokoll im Vergleich zu Stammzellen mehr *OMP* detektiert werden kann, musste nun dieses Grundprotokoll so verändert werden, dass die Ausbeute an *OMP* steigt. Dieses Ziel wurde durch die gezielte Zugabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verfolgt. Im ersten Medium Test liefen fünf Protokolle über insgesamt vierzig Tage Differenzierung parallel zueinander (Tabelle 16). Die einzelnen Stadien des Protokolls wurden bei allen Protokollen zeitgleich und mit der gleichen Dauer durchgeführt. Die Varianz innerhalb der fünf getesteten Protokolle basierte auf der Zugabe oder dem Weglassen von BMP4 (Abbildung 33). Neben der Induktion des Mesoderms [150] wird BMP4 als wichtiges und frühes Zytokin bei der olfaktorischen Entwicklung beschrieben [56, 60]. Daher wurde die BMP4 Zugabe an verschiedenen Schritten während des Protokolls verändert.

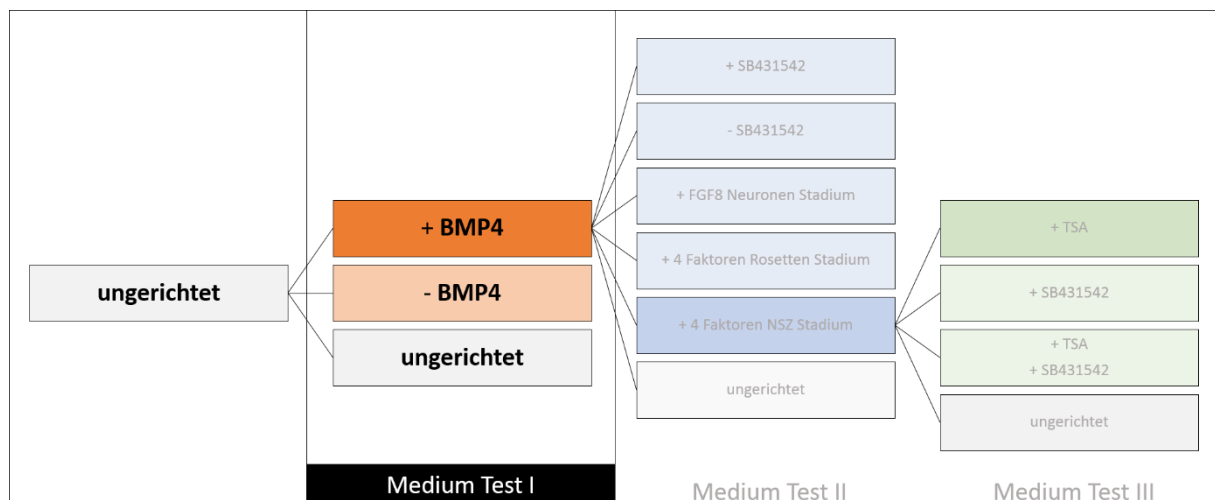


Abbildung 33: Medium Test I zur Erhöhung der OMP Ausbeute im Differenzierungsprotokoll

Schematische Zusammenfassung der Differenzierungsexperimente zur Generierung von olfaktorischen Rezeptorneuronen. Im Medium Test I wurde ausgehend von dem ungerichteten Protokoll die Zugabe oder das Weglassen von BMP4 variiert.

Das Differenzierungsprotokoll umfasste unabhängig von den Zusätzen fünf definierte Stadien (iPSZ, Embryoid Bodies, neurale Rosetten, neurale Stammzellen und Neurone) die alle Protokollansätze durchlaufen. Im ersten Stadium erfolgt die Bildung der EBs über den Zeitraum von vier Tagen, dem folgt das adhärenste Stadium der neuralen Rosetten mit weiteren acht Tagen. Die Rosetten werden mechanisch abgelöst und verbringen weitere acht Tage als neurale Stammzellen in einer Suspensionskultur. Als adhärenste Neurone bekommen die Zellen im frühen Stadium FGF8 zugesetzt und nach 25 Tagen Differenzierung wird zu einem Neuronenmedium mit ActivinA Zusatz gewechselt (Tabelle 16). Die Variation in der BMP4 Zugabe erfolgte im Stadium der neuralen Rosetten und der neuralen Stammzellen.

Tabelle 16: Medium Test I: Vergleich von fünf verschiedenen Differenzierungsprotokollen

In Rot wird die Variable innerhalb der parallel getesteten Protokolle hervorgehoben. Die Zugabe von BMP4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierung variiert innerhalb der vier getesteten Protokolle. Das ungerichtete Protokoll wurde zur besseren Darstellung mit einem grauen Kasten hinterlegt.

	iPSZ	EB	Rosetten	Neurale Stammzellen	frühe Neurone	reife Neurone
	0	4	12	20	25	>40
Medium	ungerichtet					
			2 μ M Dorsomorphin 20 ng/ml FGF2	2 μ M Dorsomorphin 20 ng/ml FGF2	10 ng/ml BDNF 10 ng/ml BDNF 200 μ M Vit. C 1 mM cAMP	10 ng/ml BDNF 10 ng/ml BDNF 200 μ M Vit. C 1 mM cAMP
	Medium 2		0,1 μ M Retinsäure 1 μ M Pumorphamin 100 ng/ml FGF8 5 ng/ml BMP4	1 μ M Pumorphamin 100 ng/ml FGF8 20 ng/ml FGF2 5 ng/ml BMP4	10 ng/ml BDNF 10 ng/ml BDNF 200 μ M Vit. C 1 mM cAMP 100 ng/ml FGF8	10 ng/ml BDNF 10 ng/ml BDNF 200 μ M Vit. C 1 mM cAMP 10 μ g/ml Activin A
	Medium 3		0,1 μ M Retinsäure 1 μ M Pumorphamin 100 ng/ml FGF8	1 μ M Pumorphamin 100 ng/ml FGF8 20 ng/ml FGF2	10 ng/ml BDNF 10 ng/ml BDNF 200 μ M Vit. C 1 mM cAMP 100 ng/ml FGF8	10 ng/ml BDNF 10 ng/ml BDNF 200 μ M Vit. C 1 mM cAMP 10 μ g/ml Activin A
	Medium 4		0,1 μ M Retinsäure 1 μ M Pumorphamin 100 ng/ml FGF8 5 ng/ml BMP4	1 μ M Pumorphamin 100 ng/ml FGF8 20 ng/ml FGF2	10 ng/ml BDNF 10 ng/ml BDNF 200 μ M Vit. C 1 mM cAMP 100 ng/ml FGF8	10 ng/ml BDNF 10 ng/ml BDNF 200 μ M Vit. C 1 mM cAMP 10 μ g/ml Activin A
Medium 5		0,1 μ M Retinsäure 1 μ M Pumorphamin 100 ng/ml FGF8	1 μ M Pumorphamin 100 ng/ml FGF8 20 ng/ml FGF2 5 ng/ml BMP4	10 ng/ml BDNF 10 ng/ml BDNF 200 μ M Vit. C 1 mM cAMP 100 ng/ml FGF8	10 ng/ml BDNF 10 ng/ml BDNF 200 μ M Vit. C 1 mM cAMP 10 μ g/ml Activin A	

Auf RNA Ebene wurden insgesamt fünf parallelaufende Differenzierungsprotokolle, einschließlich des ungerichteten Protokolls untersucht. Dabei wurden 14 Tage alte Neurone, die eine Gesamtdifferenzierung von vierzig Tagen durchlaufen haben, auf Markergene für frühe olfaktorische Vorläuferpopulationen und reife Rezeptorneurone analysiert (Abbildung 34). Das Protokoll mit dem Medium 2 zeigt innerhalb dieser Versuchsreihe im Vergleich zu dem ungerichteten Protokoll die besten Ergebnisse. In den Neuronen weist es signifikant die höchste *RPSA*, *OMP* und *TUBB3* Genexpression auf. Da die *OMP* Expression entscheidend für die Bewertung der entstandenen olfaktorischen Neurone innerhalb der Differenzierungsprotokolle ist, wurde auf dieses Gen ein besonderer Fokus gelegt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde mit dem Protokoll **Medium 2** weitergearbeitet.

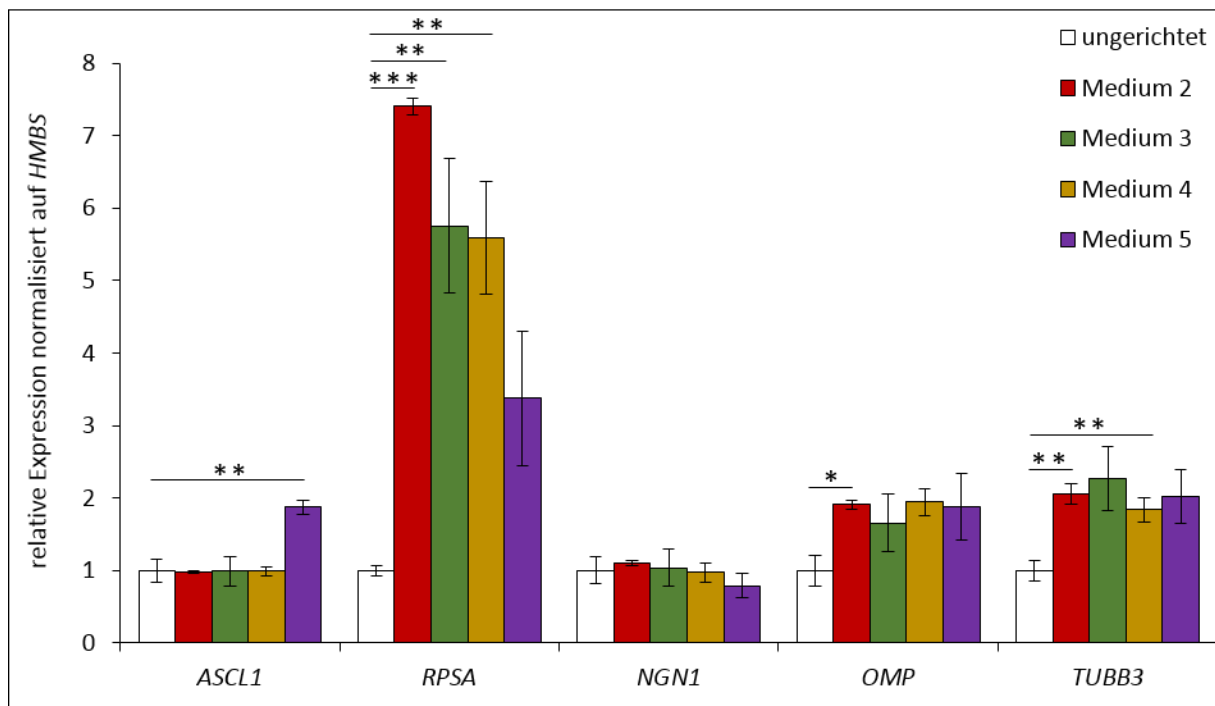


Abbildung 34: Medium Test I, Genexpression in Neuronen

Die Grafik zeigt die RNA Expressionen von olfaktorischen Vorläufergenen (*ASCL1*, *RPSA*, *NGN1*), reifen olfaktorischen Neuronen (*OMP*) und einem allgemeinen Neuronenmarker (*TUBB3*). Gemessen wurden 14 Tage alte Neurone von fünf Differenzierungsprotokollen mit unterschiedlichen Medien: Medium 2- 5 und ungerichtet. Die Daten wurden intern mit dem Referenzgen *HMBS* verrechnet und relativ auf das ungerichtete Protokoll bezogen. Der Fehlerbalken entspricht dem SEM, Signifikanzen: $P \leq 0,5$: *, $P \leq 0,1$: **, $P \leq 0,01$: ***.

3.2.4. Zugabe von 4 Faktoren in der späten Differenzierung erhöht die *OMP* Expression

Das Ergebnis des ersten Medium Tests zeigte, dass die Zugabe von BMP4 im Stadium der neuralen Rosetten und der neuralen Stammzellen wichtig ist für die *OMP* Ausbeute in den differenzierten Neuronen (Abbildung 34). Aufbauend auf dieses Protokoll Medium 2 wurden im nächsten experimentellen Ansatz vier weiteren Faktoren, die als entscheidende Wachstumsfaktoren in der olfaktorischen Entwicklung beschrieben werden (BMP4, FGF8, Purmorphamin/PU und Retinsäure/RA) während der Differenzierung zugegeben [55, 63, 64, 151, 152]. Die sechs parallellaufenden Protokolle sollten einen Hinweis darauf geben, wann die Zugabe dieser vier Faktoren wichtig für die Bildung von *OMP* positiven Zellen im Neuronen Stadium ist. Weiterhin wurde getestet, ob die Zugabe oder Wegnahme von SB431542, einem small molecule (ALK Inhibitor) im frühen Differenzierungsstadium die Bildung der olfaktorischen Vorläufer fördert oder hemmt (Abbildung 35, Tabelle 17).

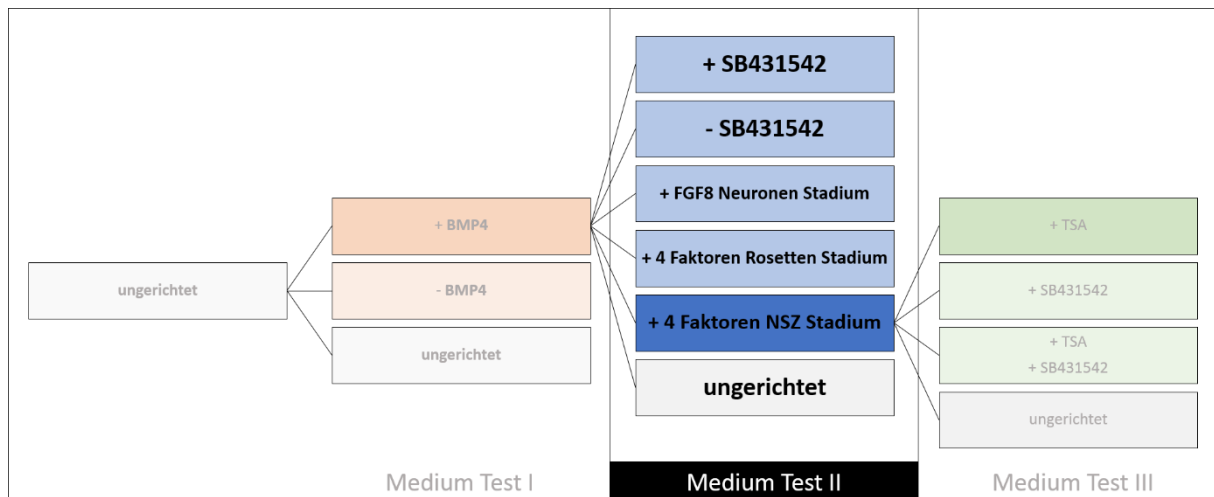


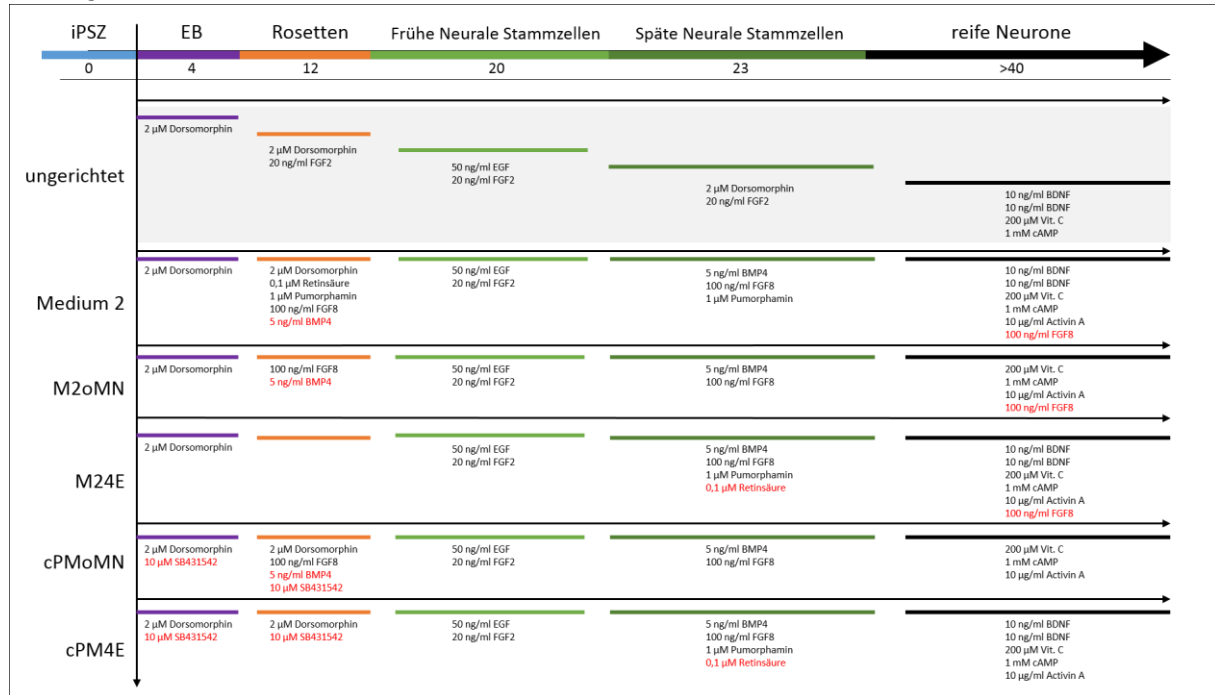
Abbildung 35: Medium Test II zur Erhöhung der OMP Ausbeute im Differenzierungsprotokoll

Schematische Zusammenfassung der Differenzierungsexperimente zur Generierung von olfaktorischen Rezeptorneuronen. Im Medium Test II wurde, ausgehend von dem Medium mit BMP4 Zusätzen, die Zugabe von SB431542, FGF8 und der vier Faktoren variiert. Die vier Faktoren umfassen BMP4, FGF8, Purmorphamin und Retinsäure. Das ungerichtete Protokoll lief parallel dazu als interne Referenz.

Das verbesserte Differenzierungsprotokoll umfasst die fünf definierten Stadien (iPSZ, Embryoid Bodies, neurale Rosetten, neurale Stammzellen und Neurone), wobei der Schritt der neuralen Stammzellen in einen frühen und einen späten Abschnitt unterteilt wurden. In der Phase der späten neuralen Stammzellen, nach 23 Tagen Differenzierung wird die Zugabe der vier Faktoren innerhalb der sechs getesteten Protokolle (Medium 2, M2oMN, M24E, cPMoMN, cPM4E und ungerichtet) variiert (Tabelle 17). M2oMN: **M**edium **2** ohne **M**otor-**N**euronen Aktivierung, M24E: **M**edium **2** mit den **4** Faktoren am **E**nde der Differenzierung, cPMoMN: **c**raniales **P**lakoden **M**edium ohne **M**otor-**N**euronen Aktivierung, cPM4E: **c**raniales **P**lakoden **M**edium mit den **4** Faktoren am **E**nde der Differenzierung. Mit Ausnahme des ungerichteten Protokolls wird zu allen Neuronenmedien ActivinA zugeben. Dieses Zytokin soll die Anzahl der olfaktorischen Progenitoren erhöhen und die Differenzierung zu ORN fördern [153].

Tabelle 17: Medium Test II: Vergleich von sechs verschiedenen Differenzierungsprotokollen

In Rot wird die Variable innerhalb der parallel getesteten Protokolle hervorgehoben. Insgesamt wurden sechs verschiedene Protokolle untereinander verglichen. Das ungerichtete Protokoll wurde zur besseren Darstellung mit einem grauen Kasten hinterlegt.



Die sechs Protokolle wurden auf RNA Ebene hinsichtlich der Markergene *OMP*, für reife ORN und *TUBB3* als Marker für die generelle Ausbildung von Neuronen verglichen. Es wurden zwei unterschiedliche Zeitpunkte im Neuronen Stadium analysiert. Bei den zwei Wochen alten Neuronen (Abbildung 36 A) zeigte sich die höchste *OMP* Expression in dem cPM4E Medium, jedoch ist dieser Wert in Bezug zum ungerichteten Protokoll nicht signifikant. Eine signifikante Erhöhung des gemessenen Gens wurde ausschließlich im Medium 2 gemessen. Das cPM4E Medium zeigt auch bei *TUBB3* die höchste Expression. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch in drei Wochen alten Neuronen (Abbildung 36 B). Hier konnte man relativ zum ungerichteten Protokoll im cPM4E Protokoll die höchste *OMP* und *TUBB3* Expression beobachten.

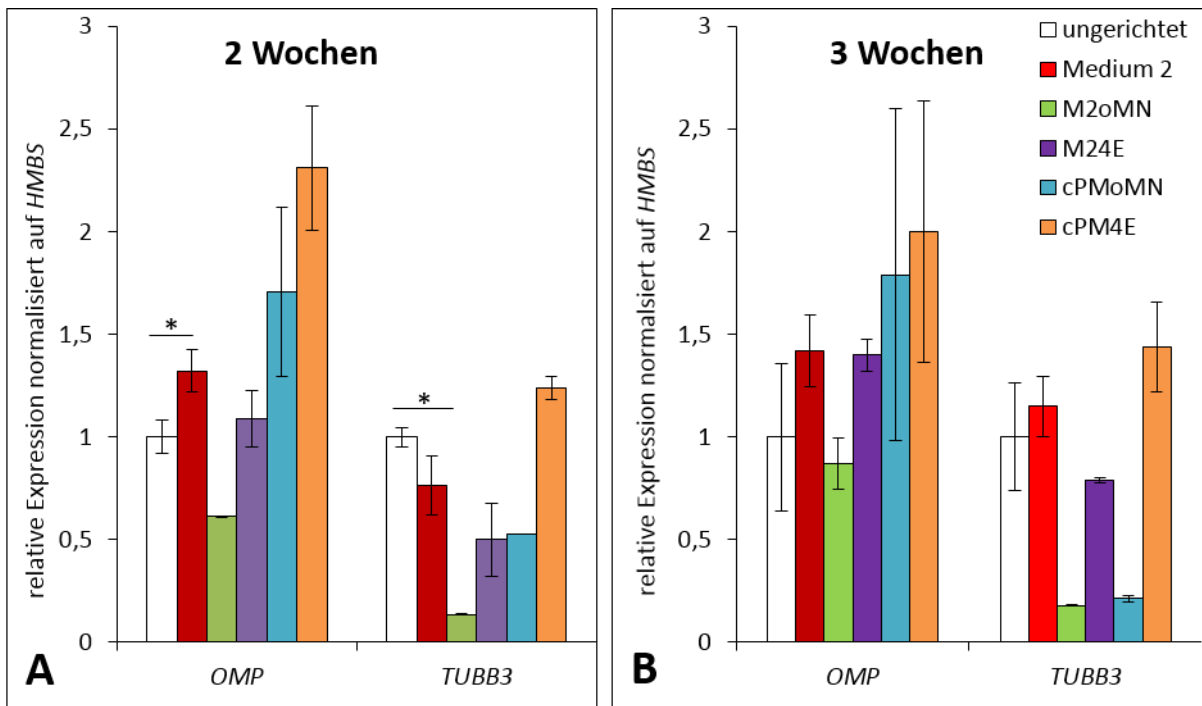


Abbildung 36: Medium Test II, Genexpression in zwei und drei Wochen alten Neuronen

Die Grafik zeigt die RNA Expressionen von (OMP), einem Marker für reife olfaktorische Neurone und einem allgemeinen Neuronenmarker (TUBB3). Gemessen wurden zwei (A) und drei Wochen (B) alte Neurone von sechs Differenzierungsprotokollen mit unterschiedlichen Medien. Die Daten wurden intern mit dem Referenzgen *HMBS* verrechnet und relativ auf das ungerichtete Protokoll bezogen. Der Fehlerbalken entspricht dem SEM. Signifikanzen: $P \leq 0,5$: *, $P \leq 0,1$: **, $P \leq 0,01$: ***.

Innerhalb der sechs Protokolle wurde nicht nur die Genexpression, sondern auch makroskopisch das Wachstum und die Proliferation der entstandenen Neurone verglichen (Abbildung 37). Für das Differenzierungsprotokoll wurden die Neurone über einen längeren Zeitraum von mindestens 14 Tagen kultiviert. In dieser Zeit können die noch unreifen Vorläuferzellen zu reifen ORN differenzieren und erste synaptische Kontakte innerhalb der Neuronenkultur ausbilden. Zudem wurde beurteilt, ob die Neurone neben den Zellkörpern auch Axone und Dendriten entwickeln und diese Zellen untereinander Netzwerke bilden. Funktionierende neuronale Netzwerke sind für das Wachstum und die weitere Ausdifferenzierung der Zellen ein entscheidendes Kriterium.

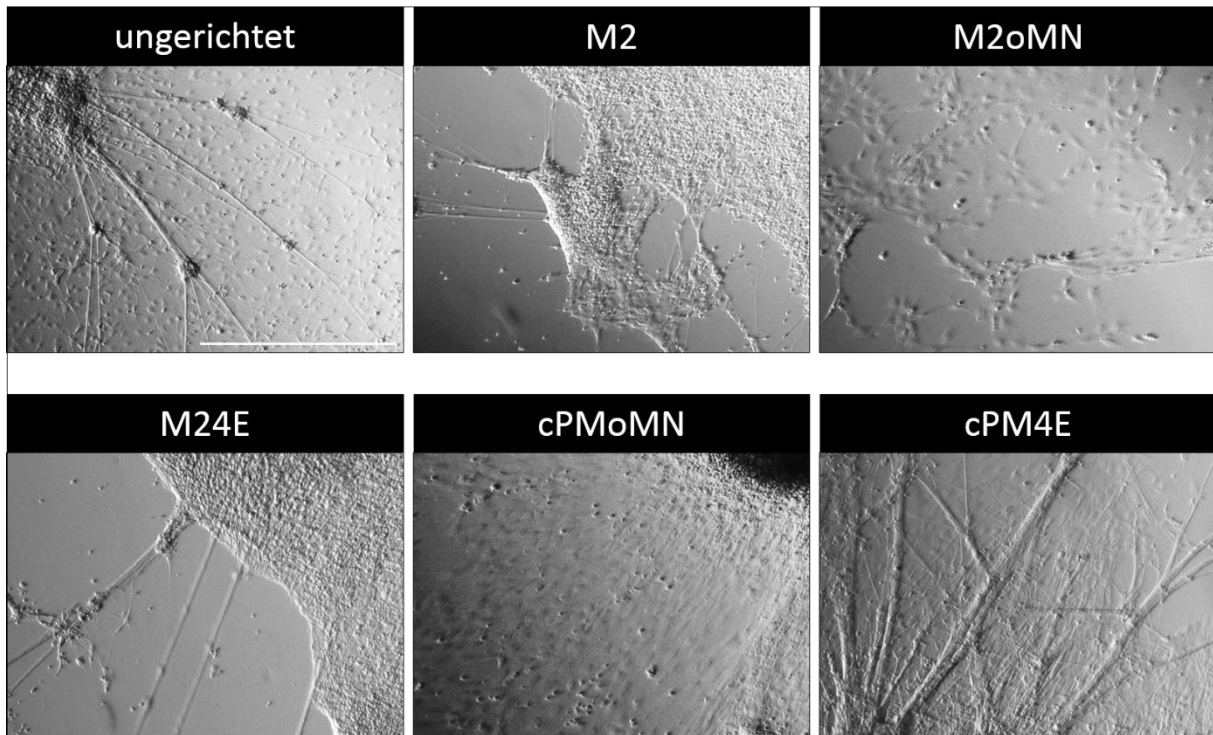


Abbildung 37: Medium Test II: Durchlichtbilder der sechs Protokolle im Vergleich

Die Grafik zeigt Durchlichtbilder von 14 Tage alten Neuronen aller sechs untereinander verglichenen Protokolle im Medium Test II. Maßstab: 50 µm.

Ergänzend zu den RNA Daten zeigte sich auch das cPM4E Protokoll in der morphologischen Betrachtung des Differenzierungsprotokolls als am besten geeignet. Die Neurone, die sich bei diesem Differenzierungsprotokoll entwickelten, zeigten das Auswachsen von Axonen und Dendriten und die Ausbildung eines neuronalen Netzwerks, das die gesamte Kulturschale ausfüllt. Zudem fanden sich in der neuronalen Mischkultur nur sehr wenige nicht-neurale Zellen. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde dieses **cPM4E Protokoll** für die weitere Charakterisierung der *in vitro* Differenzierung zu olfaktorischen Rezeptorneuronen verwendet.

3.2.5. Das gerichtete cPM4E Protokoll zeigt eine höhere Expression von olfaktorischen Markergenen

In einem neuen experimentellen Ansatz wurde das gerichtete cPM4E mit dem ungerichteten Protokoll über verschiedenen Stadien der Differenzierung verglichen. Für die Zeitpunkte der neuronalen Rosetten und drei Wochen alte Neurone wurden spezifische olfaktorische Markergene näher analysiert (Abbildung 38, 39).

3.2.5.1. Analyse von frühen olfaktorischen Markern im cPM4E und ungerichteten Protokoll

Die Genexpression von acht Tage alten Rosetten wurde im gerichteten und ungerichteten Protokoll gemessen (Abbildung 38). Dabei wurden Markergene analysiert, die im Zusammenhang mit olfaktorischen Stammzellen und der frühen Entwicklung stehen, wie *RPSA* [79], *FOXP1* [154], *SOX2* [155] und *NGN1* [85]. Die Grafik zeigt im direkten Vergleich der beiden Medien, dass cPM4E eine höhere Expression in allen gemessenen Genen aufweist, die Genexpression von *FOXP1* ist im cPM4E Medium signifikant erhöht gegenüber dem ungerichteten.

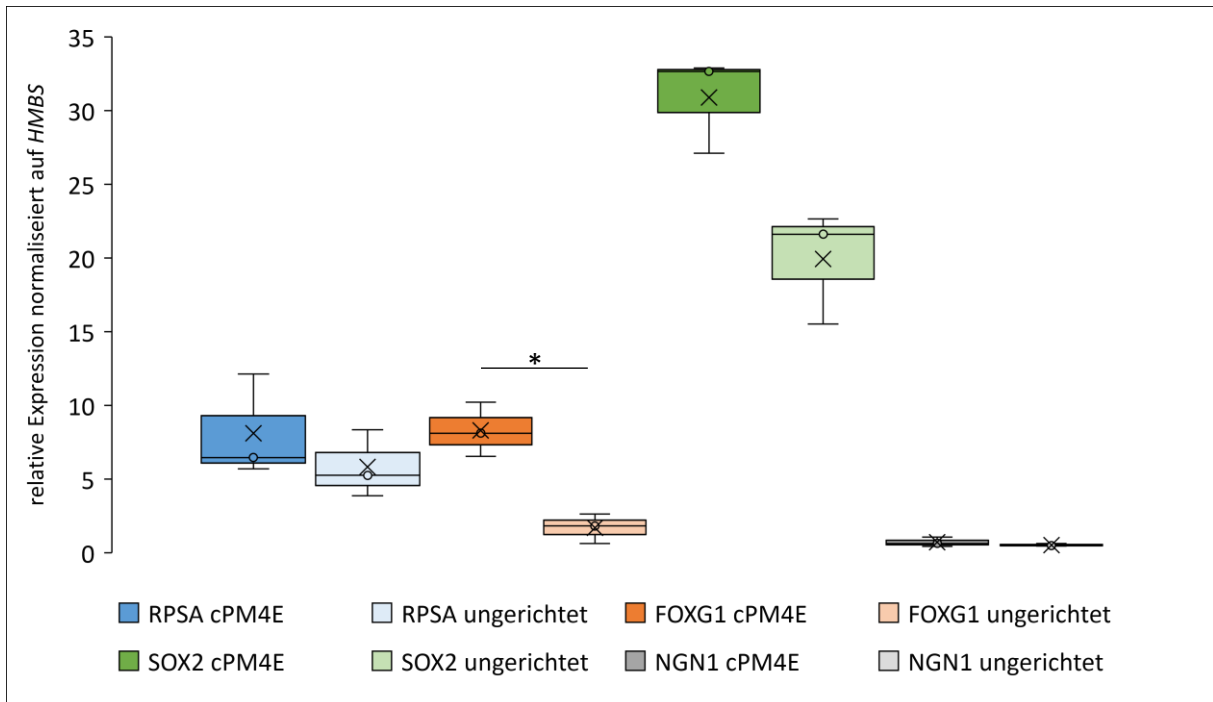


Abbildung 38: Vergleich zwischen gerichtetem und ungerichtetem Protokoll im Rosetten Stadium

Acht Tage alte Rosetten von zwei unterschiedlichen Differenzierungsprotokollen (cPM4E und ungerichtet) wurden auf die Expression von frühen olfaktorischen Markergenen (*RPSA*, *FOXG1*, *SOX2* und *NGN1*) untersucht. Die dunklere Markierung des jeweils gemessenen Gens zeigt dabei das gerichtete cPM4E Protokoll, die hellere Markierung das ungerichtete Protokoll. Die Werte wurden auf das Referenzgen *HMBS* bezogen und intern auf iPSZ verrechnet. Der Median wird mit Fehlerbalken dargestellt. Signifikanzen: $P \leq 0,5$: *, $P \leq 0,1$: **, $P \leq 0,01$: ***.

3.2.5.2. Analyse von späten olfaktorischen Markern im cPM4E und ungerichteten Protokoll

Die Genexpression von 14 Tage alten Neuronen wurde im gerichteten und ungerichteten Protokoll gemessen (Abbildung 39). Dabei wurden Markergene analysiert, die im Zusammenhang mit olfaktorischen Vorläufern und reifen Rezeptorneuronen stehen. Darunter sind: *OMP* [116], *TUBB3* [84], *GOLF* [123], *ADC3Y* [156], *GAP43* [83] und *UCHL1* [157]. Die Grafik zeigt im direkten Vergleich der beiden Medien, dass cPM4E eine höhere Expression in allen gemessenen Genen aufweist, die Genexpressionen von *GOLF* und *UCHL1* sind im cPM4E Medium signifikant erhöht gegenüber dem ungerichteten.

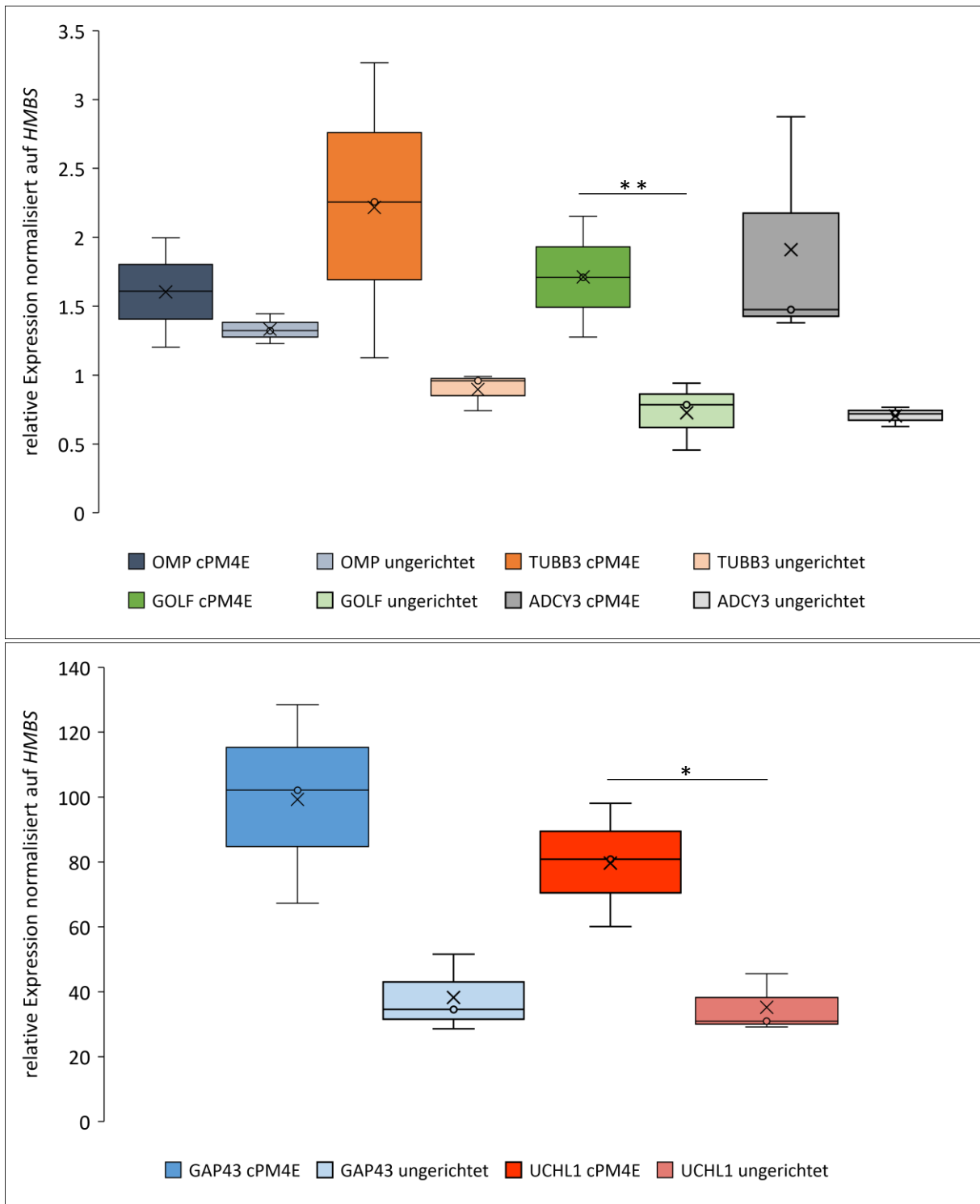
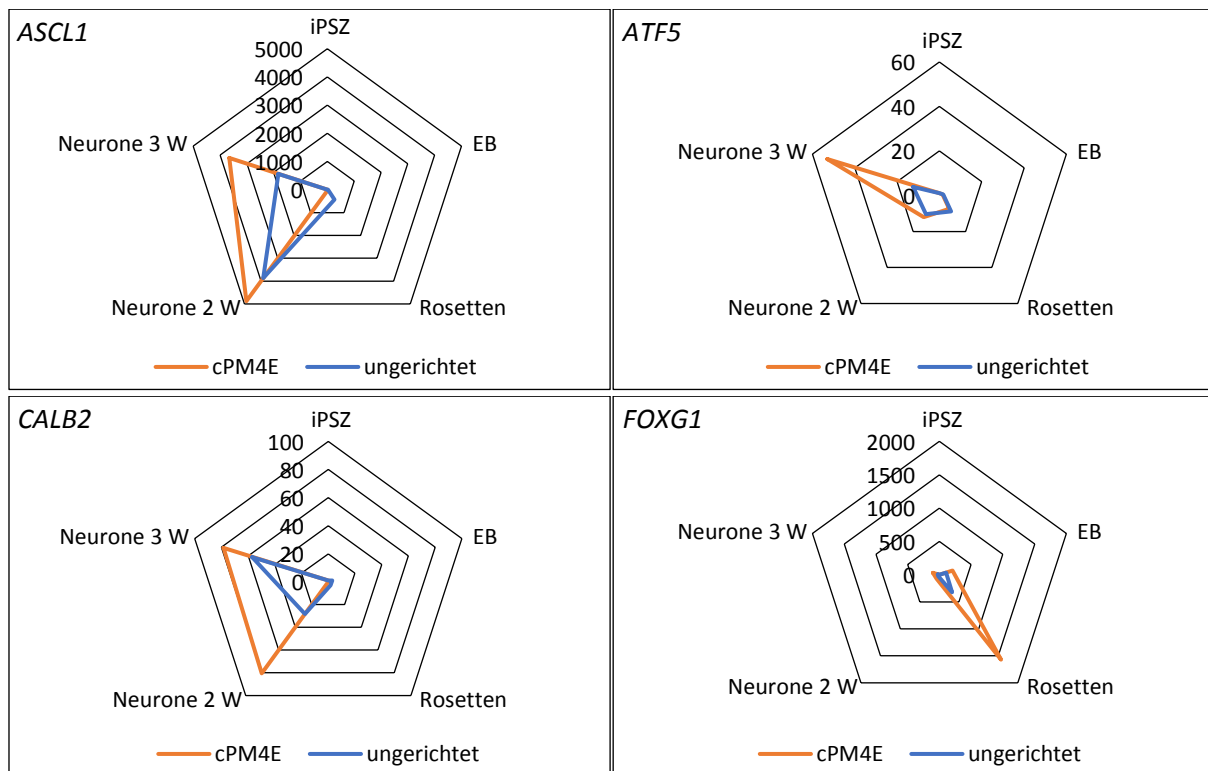


Abbildung 39: Vergleich zwischen gerichtetem und ungerichtetem Protokoll im Neuronen Stadium

14 Tage alte Neurone von zwei unterschiedlichen Differenzierungsprotokollen (cPM4E und ungerichtet) wurden auf die Expression von späten olfaktorischen Markergenen (*OMP*, *TUBB3*, *GOLF*, *ADCY3*, *GAP43* und *UCHL1*) untersucht. Zur besseren Darstellung der Genexpressionen wurden zwei Diagramme angefertigt. Die dunklere Markierung des jeweils gemessenen Gens zeigt dabei das gerichtete cPM4E Protokoll, die hellere Markierung das ungerichtete Protokoll. Die Werte wurden auf das Referenzgen *HMBS* bezogen und intern auf iPSZ verrechnet. Der Median wird mit Fehlerbalken dargestellt. Signifikanzen: $P \leq 0,5$: *, $P \leq 0,1$: **, $P \leq 0,01$: ***.

3.2.6. Zusammenfassung: Vergleich der zwei Protokolle zu unterschiedlichen Stadien in der Differenzierung

Die folgenden Grafiken (Abbildung 40, 41) zeigen die Expressionen von olfaktorischen Genen über den Verlauf der Differenzierung im direkten Vergleich zwischen dem ungerichteten und gerichteten cPM4E Protokoll. Jedes Diagramm zeigt fünf Stadien des Protokolls (iPSZ, EBs, neurale Rosetten, zwei und drei Wochen alte Neurone). Der Kurvenverlauf des gerichteten Protokolls ist in Orange dargestellt, der des ungerichteten Protokolls in Blau. Der Verlauf der Kurven im Netzdiagramm gibt an, wie hoch die Genexpression des jeweils gemessenen Markers ist. Je weiter außen sich die Kurve befindet, also je höher die Expression auf der y-Achse ist, desto mehr wird von diesem Gen im jeweiligen Stadium produziert. Dies erlaubt einen direkten Vergleich zwischen den beiden Protokollen innerhalb eines Netzdiagrammes. Die Diagramme für die olfaktorischen Vorläufer und die reifen Rezeptorneurone zeigen, dass die Markergenexpressionen des gerichteten Protokolls in fast allen Stadien höher sind. Die publizierten olfaktorischen Marker für frühe Vorläufer wurden näher analysiert: *ASCL1* [148], *ATF5* [94], *CALB2* [93], *FOXP1* [154], *NGN1* [85], *RPSA* [79], *SOX2* [155] und *TUBB3* [84] (Abbildung 40).



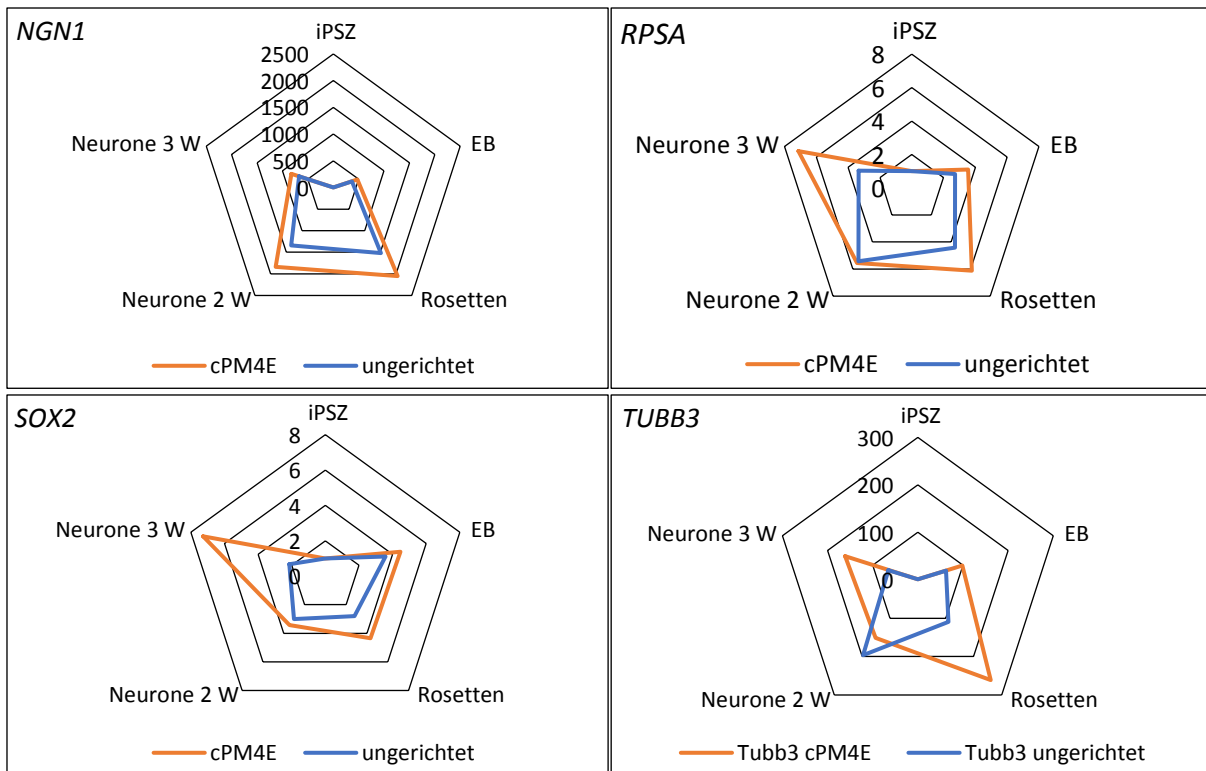


Abbildung 40: Netzdiagramm frühe olfaktorische Marker

Dargestellt sind die frühen olfaktorischen Markergene *ASCL1*, *ATF5*, *CALB2*, *FOXP1*, *NGN1*, *RPSA*, *SOX2* und *TUBB3*. Zu jedem der fünf Stadien (iPSZ, EBs, neurale Rosetten, zwei Wochen/W alte Neurone, drei Wochen/W alte Neurone) wird die jeweilige Genexpression des gerichteten cPM4E und ungerichteten Protokolls gezeigt. Der orangene Kurvenverlauf gibt das gerichtete, der blaue Kurvenverlauf das ungerichtete Protokoll wieder. Die Werte wurden intern mit *HMBS* verrechnet und auf iPSZ bezogen.

Als anerkannte Marker für die späte olfaktorische Entwicklung, Differenzierung der Rezeptorneurone und Marker für reife ORN wurden folgende Gene näher untersucht: *GAP43* [83], *GOLF* [123], *NCAM1* [102], *OMP* [109] und *UCLH1* [157] (Abbildung 41).

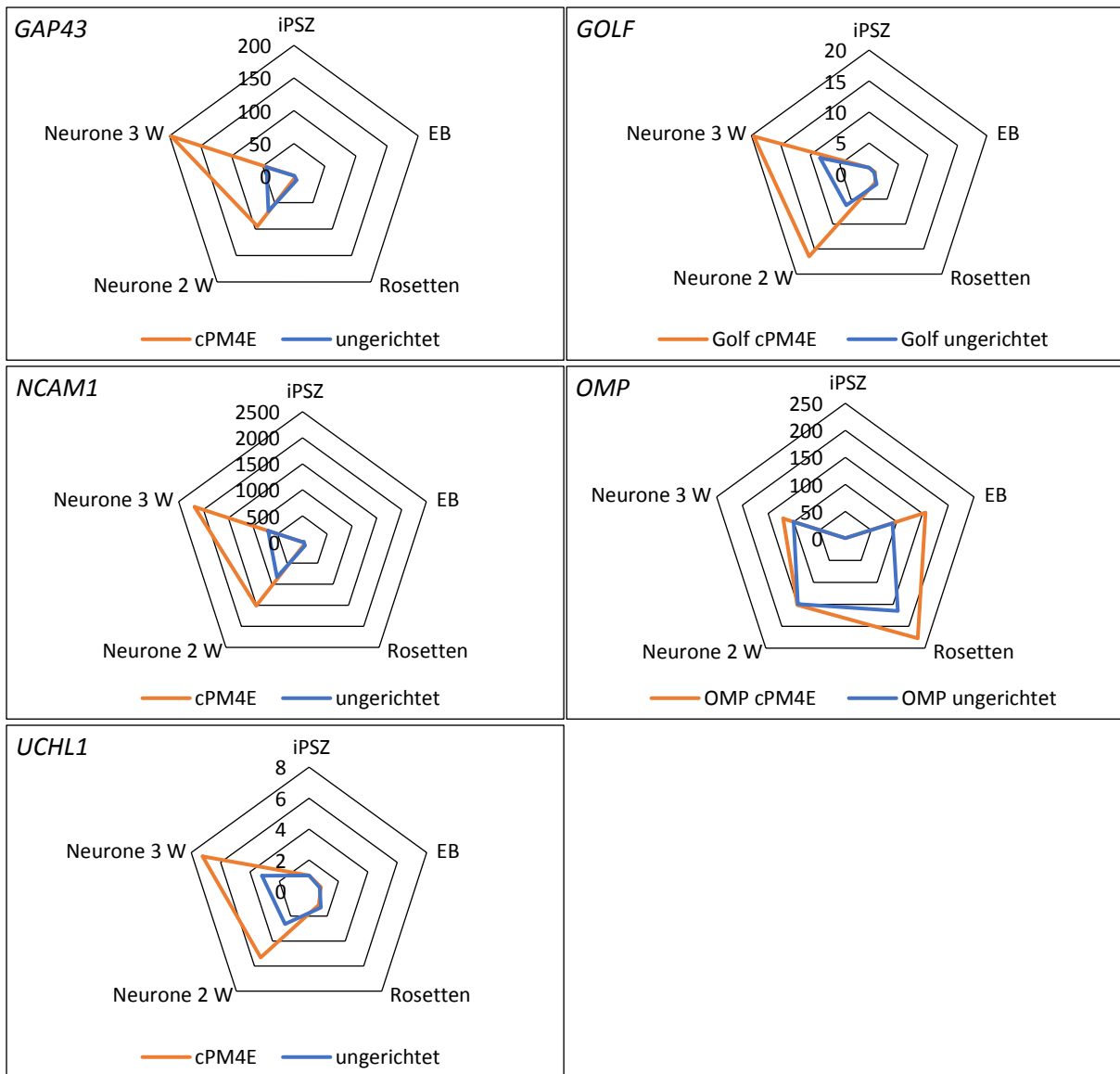


Abbildung 41: Netzdiagramm späte olfaktorische Marker

Dargestellt sind die frühen olfaktorischen Markergene *GAP43*, *GOLF*, *NCAM1*, *OMP* und *UCHL1*. Zu jedem der fünf Stadien (iPSZ, EBs, neurale Rosetten, zwei Wochen/W alte Neurone, drei Wochen/W alte Neurone) wird die jeweilige Genexpression des gerichteten cPM4E und ungerichteten Protokolls gezeigt. Der orangene Kurvenverlauf gibt das gerichtete, der blaue Kurvenverlauf das ungerichtete Protokoll wieder. Die Werte wurden intern mit *HMBS* verrechnet und auf iPSZ bezogen.

3.2.7. Variation im GDF11/FST Signalweg kann die Ausbeute an OMP erhöhen

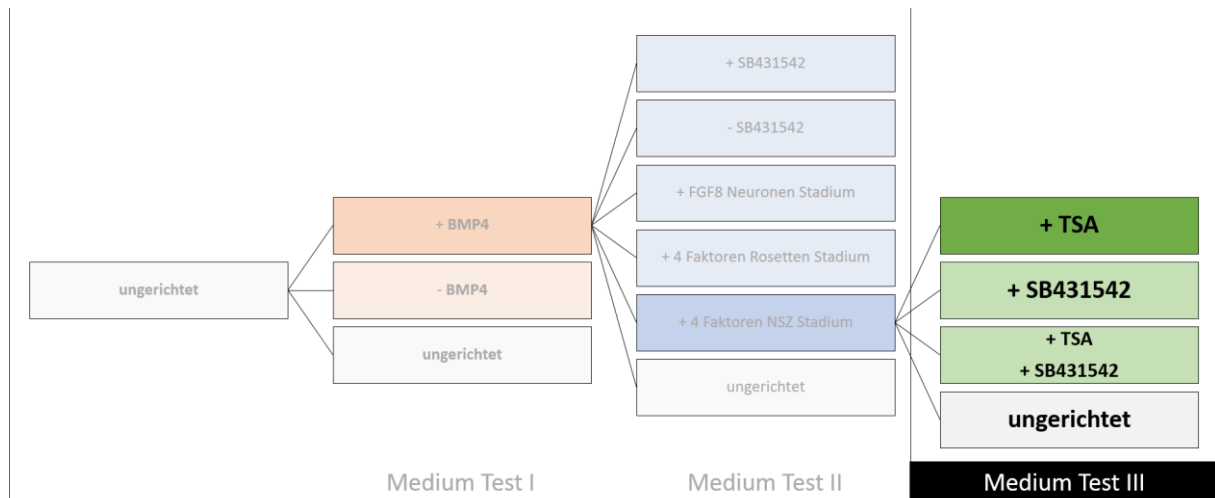


Abbildung 42: Medium Test III zur Erhöhung der OMP Ausbeute in dem Differenzierungsprotokoll

Schematische Zusammenfassung der Differenzierungsexperimente zur Generierung von olfaktorischen Rezeptorneuronen. Im Medium Test III wurde ausgehend von dem cPM4E Medium mit den vier Zusätzen im NSZ Stadium die Zugabe von TrichostatinA (TSA) und SB431542 variiert.

GDF11 (Wachstums-Differenzierungsfaktor 11) und sein Rezeptor werden von reifen olfaktorischen Rezeptorneuronen und deren Vorläufern exprimiert. *GDF11* inhibiert die Neurogenese der sensorischen Neurone *in vitro* über einen komplexen Signalweg, an dessen Ende ein reversibler Zellzyklusarrest der Progenitoren steht. Mäuse, bei denen funktionelles *Gdf11* fehlt, haben mehr Progenitoren und reife Neurone im olfaktorischen Epithel. Knockout Mausmodelle für Follistatin/*Fst*, ein GDF11 Antagonist, zeigen eine dramatisch reduzierte Neurogenese. Diese negative Autoregulation ist wichtig für die Bildung von neuen Rezeptorneuronen aus Progenitoren [158]. Durch die gezielte Zugabe von SB431542 und TrichostatinA (Histon-Deacetylase Hemmer), zwei Substanzen, die in diesen Signalweg einwirken können, sollte überprüft werden ob deren Zugabe einen Einfluss auf die Bildung von ORN und deren Vorläufer hat (Abbildung 42) [159, 160]. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem cPM4E Protokoll und den Bedingungen mit den verschiedenen Zusätzen gemessen werden. In dieser Versuchsreihe konnte in keinem der sechs gemessenen Gene (*ASCL1*, *NCAM1*, *NGN1*, *OMP*, *SOX2*, *TUBB3*) eine eindeutige Erhöhung in der Genexpression detektiert werden (Abbildung 43).

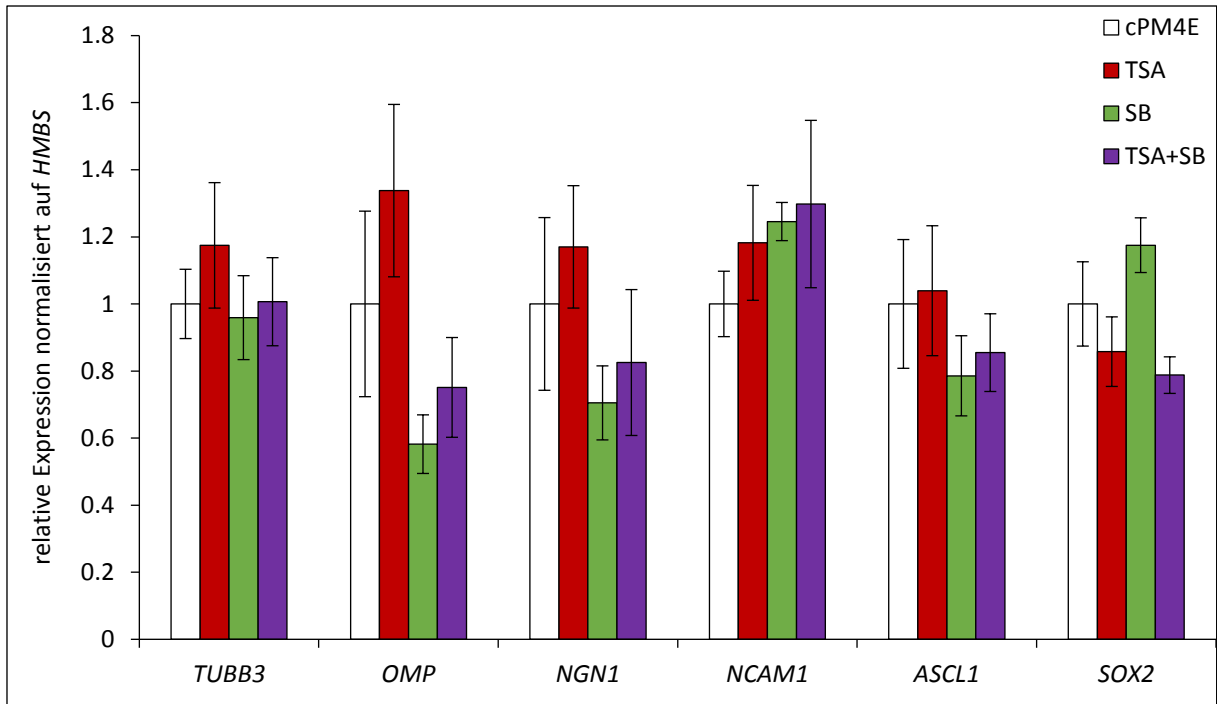


Abbildung 43: Medium Test III, Genexpression in vier Wochen alten Neuronen

Die Grafik zeigt die RNA Expressionen von olfaktorischen Markergenen (*ASCL1*, *NCAM1*, *NGN1*, *OMP*, *SOX2* und *TUBB3*). Gemessen wurden vier Wochen alte Neurone nach einer Gesamtdifferenzierungszeit von 58 Tagen von vier Differenzierungsprotokollen mit unterschiedlichen Medienzusätzen: cPM4E Medium ohne Zusätze und Protokolle die in den Zusätzen TrichostatinA (TSA) und SB431542 variieren. Die Daten wurden intern mit dem Referenzgen *HMBS* verrechnet und relativ auf das cPM4E Protokoll bezogen. Der Fehlerbalken entspricht dem SEM.

3.3. Gesamtanalyse des gerichteten, olfaktorischen Differenzierungsprotokolls

Mit dem Ziel, die Anzahl der *OMP*-positiven Neurone zu erhöhen, wurde das ursprünglich ungerichtete Protokoll in mehreren Schritten verbessert. Das gerichtete **cPM4E** Protokoll wurde ausgewählt, da es auf RNA Ebene eine zweifach höhere *OMP* Expression im Vergleich zum ungerichteten Protokoll erbrachte. Zudem zeigte dieses Protokoll bei der Kultivierung und Morphologie der Neurone, der Proliferation und Ausbildung von neuronalen Netzwerken die besten Eigenschaften. Mit diesem ausgewählten Protokoll wurden alle weiteren Differenzierungen durchgeführt. In den nachfolgenden Experimenten wird das entwickelte Protokoll auf RNA, als auch auf Proteinebene näher charakterisiert. Hierbei wird vor allem die Analyse der olfaktorischen Marker und der damit verbundenen Entwicklung von Progenitoren innerhalb dieser Differenzierung verfolgt. Es sollte ein Profil über die Expression und Entwicklung von unterschiedlichen olfaktorischen Markern in bestimmten Stadien der Differenzierung erstellt werden. Weiterhin wurde untersucht, ob die *in vitro* gewonnenen Daten mit der embryonalen Entwicklung des olfaktorischen Systems zumindest punktuell übereinstimmen oder nachgeahmt werden konnten.

3.3.1. Analyse von iPSZ

3.3.1.1. Genexpressionsanalyse von iPSZ

Da eine Vielzahl von Genen, die als spezifische Marker für Organe, Gewebe und Zelltypen genutzt werden, auch in Entwicklungsstadien, bzw, bereits in Stammzellen eine Rolle spielen können, wurde die absolute Genexpression von acht olfaktorischen Markergenen (*ASCL1*, *ATF5*, *CALB2*, *GOLF*, *NGN1*, *OMP*, *SOX2*, *TUBB3* im Stammzell-Stadium analysiert (Abbildung 44). Die Gene wurden zu vier Gruppen zusammengefasst, die die unterschiedlichen Differenzierungsstadien der ORN darstellen sollen. Diese entwickeln sich ausgehend von Gewebstammzellen (*SOX2*) im olfaktorischen Epithel zunächst zu frühen Vorläuferzellen (GBZ-TA), welche durch den Marker *ASCL1* charakterisiert werden kann. Diese wiederum entwickeln sich weiter zu GBZ-INP, die *NGN1* positiv sind. Eine Expression von *ATF5*, *CALB2* oder *TUBB3* kann einen Hinweis darauf geben, dass die GBZ-INP bereits zu IN Zellen differenziert sind und es sich dabei um späte Vorläuferzellen handelt. Reife sensorische Neurone werden durch die Expression von *GOLF* und *OMP* charakterisiert. Im Stadium der iPSZ sieht man im Vergleich unter den acht aufgeführten Genen, dass *SOX2* die höchste Expression aufweist.

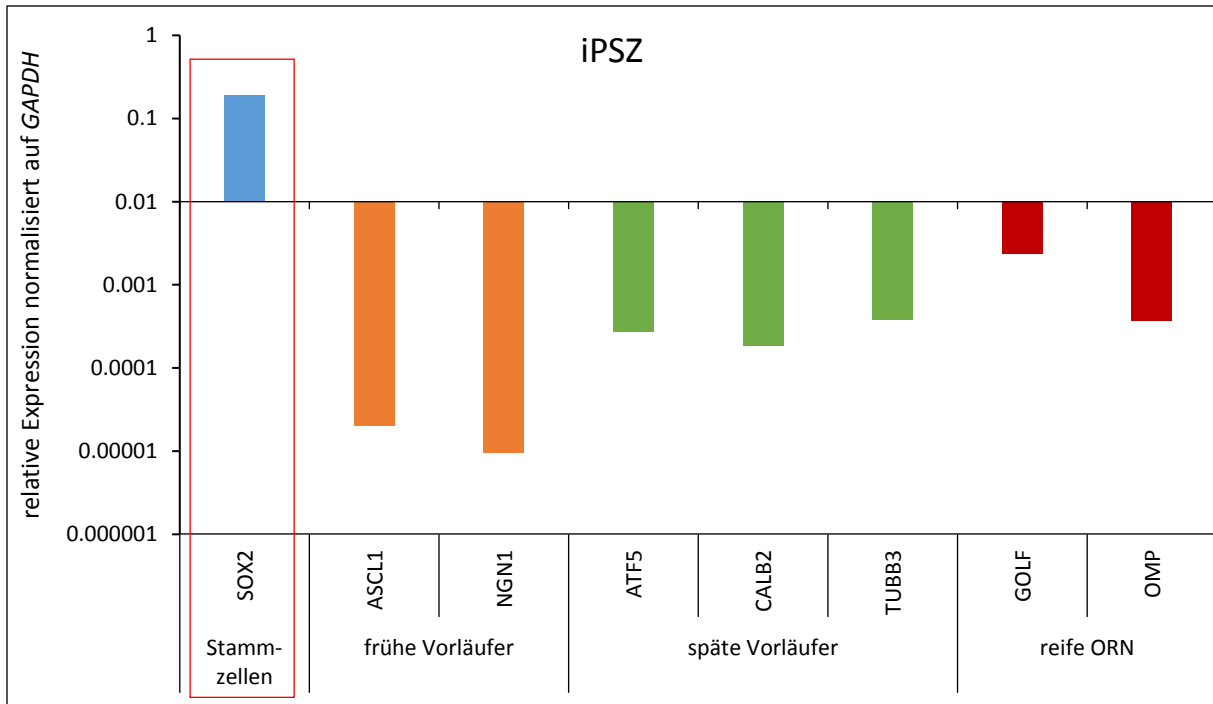


Abbildung 44: Grundexpression von olfaktorischen Markergenen in iPSZ

Die Grundexpression von acht olfaktorisch assoziierten Genen (*ASCL1*, *ATF5*, *CALB2*, *NGN1*, *GOLF*, *OMP*, *SOX2* und *TUBB3*). Die Markergene wurden in vier Gruppen eingeteilt (Stammzellen, frühe und späte Vorläufer und reife olfaktorische Rezeptorneurone (ORN)) und sind charakteristisch für die jeweilige Gruppe. Der rote Kasten markiert die Expression des erwarteten Markergens in dem analysierten Stadium. Die Werte wurde mit dem Referenzgen *GAPDH* intern verrechnet.

3.3.1.2. Proteinanalyse von iPSZ

Zusätzlich zur Genanalyse (Abbildung 44) wurde die Proteinexpression der Stammzellen untersucht. Der Fokus lag hierbei auf der Analyse des Proteingrundlevels der olfaktorischen Marker, da die Stammzellen die Ausgangszellpopulation für die Differenzierungen sind. Dies ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit und ein einfacheres Abschätzen von steigenden oder fallenden Genexpressionen im Bezug zu den iPSZ. Das Durchlichtbild und die dazugehörige Zellkernfärbung der Stammzellkolonien ist in Abbildung 45 dargestellt. Eine positive Färbung kann für den Marker SOX2 detektiert werden, eine negative Färbung für die Vorläufermarker ASCL1, ATF5, CALB2, RPSA und TUBB3. Auch gegen die neuronalen Marker NCAM1, NGN1 und PAX6 zeigen die iPSZ keine immunpositive Reaktion. Wie erwartet, zeigen sie ebenfalls keine positive Färbung der Marker für adulte ORN: OMP oder GOLF. Die Ergebnisse in den Gen- und Proteinanalysen lassen den Schluss zu, dass die Stammzellen in Bezug auf die olfaktorischen Markergene als eine Art Nulllevel angesehen werden können, da sie keine olfaktorischen Marker signifikant auf RNA und Proteinlevel exprimieren.

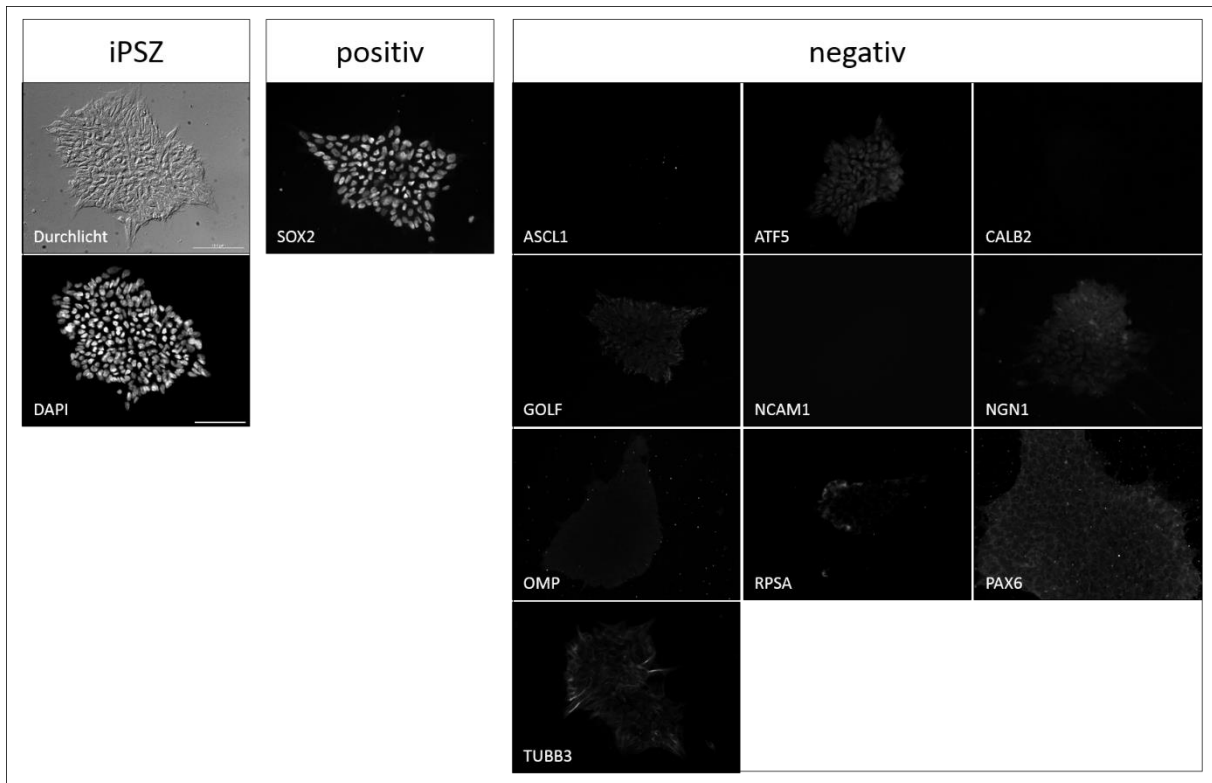


Abbildung 45: Proteinexpression von olfaktorischen Markern in iPSZ

Stammzellen wurden mit elf olfaktorisch assoziierten Markern gefärbt (ASCL1, ATF5, CALB2, GOLF, NCAM1, NGN1, OMP, RPSA, PAX6, SOX2, TUBB3). Die Ergebnisse der Färbung wurden in einen positiven und einen negativen Bereich unterteilt. Das Durchlichtbild und die Kernfärbung mit DAPI wird gezeigt. Maßstab: 100 µm

3.3.2. Analyse von EBs und neuralen Rosetten

3.3.2.1. Vergleichende Genexpressionsanalyse von EBs und Rosetten während der olfaktorischen Differenzierung

In den Grafiken 46 A/B wurden Genexpressionsdaten von EBs mit den von neuralen Rosetten verglichen. Anhand von publizierten Markern für *in vitro* differenzierte neurale Rosetten (ASCL1, NCAM1, NESTIN, SOX2, TUBB3) sollte auf RNA und Protein Ebene überprüft werden, ob unsere generierten Zellen diese Anforderungen erfüllen (Abbildung 46 A, 47). Sowohl auf RNA, als auch auf Protein Ebene konnte eine Expression von ASCL1, NESTIN, SOX2 und TUBB3 detektiert werden. NCAM1 zeigte eine signifikant erhöhte Expression in den neuralen Rosetten gegenüber den EBs. Zur immunologischen Detektion von NCAM1 gibt es keine Daten.

In einem unabhängigen Versuch wurde untersucht, ob das Differenzierungsprotokoll mit dem olfaktorischen *in vivo* System anhand von acht ausgewählten Genen (ASCL1, ATF5, CALB2, GOLF, NGN1, OMP, SOX2, TUBB3) vergleichbar ist (Abbildung 46 B). EBs sind dreidimensionale Strukturen, die die Fähigkeit besitzen in alle drei Keimblätter zu differenzieren. Für das nachfolgende Differenzierungsstadium lässt man die EBs absetzen und es bilden sich nach wenigen Tagen neurale Rosetten. Diese entsprechen dem embryonalen Neuralrohr und enthalten neben den ektodermalen Zellen auch Zellen der Neuralleiste und der Präplakodalen Region. Im direkten Vergleich zwischen den beiden Differenzierungsstadien lässt sich erkennen, dass alle Marker im Rosetten Stadium (orangene Balken) höher exprimiert sind als im Stadium der EBs (blaue Balken). In diesen frühen Stadien der Differenzierung wird ein Anstieg der Markergene für frühe olfaktorische Vorläufer (roter Kasten) erwartet.

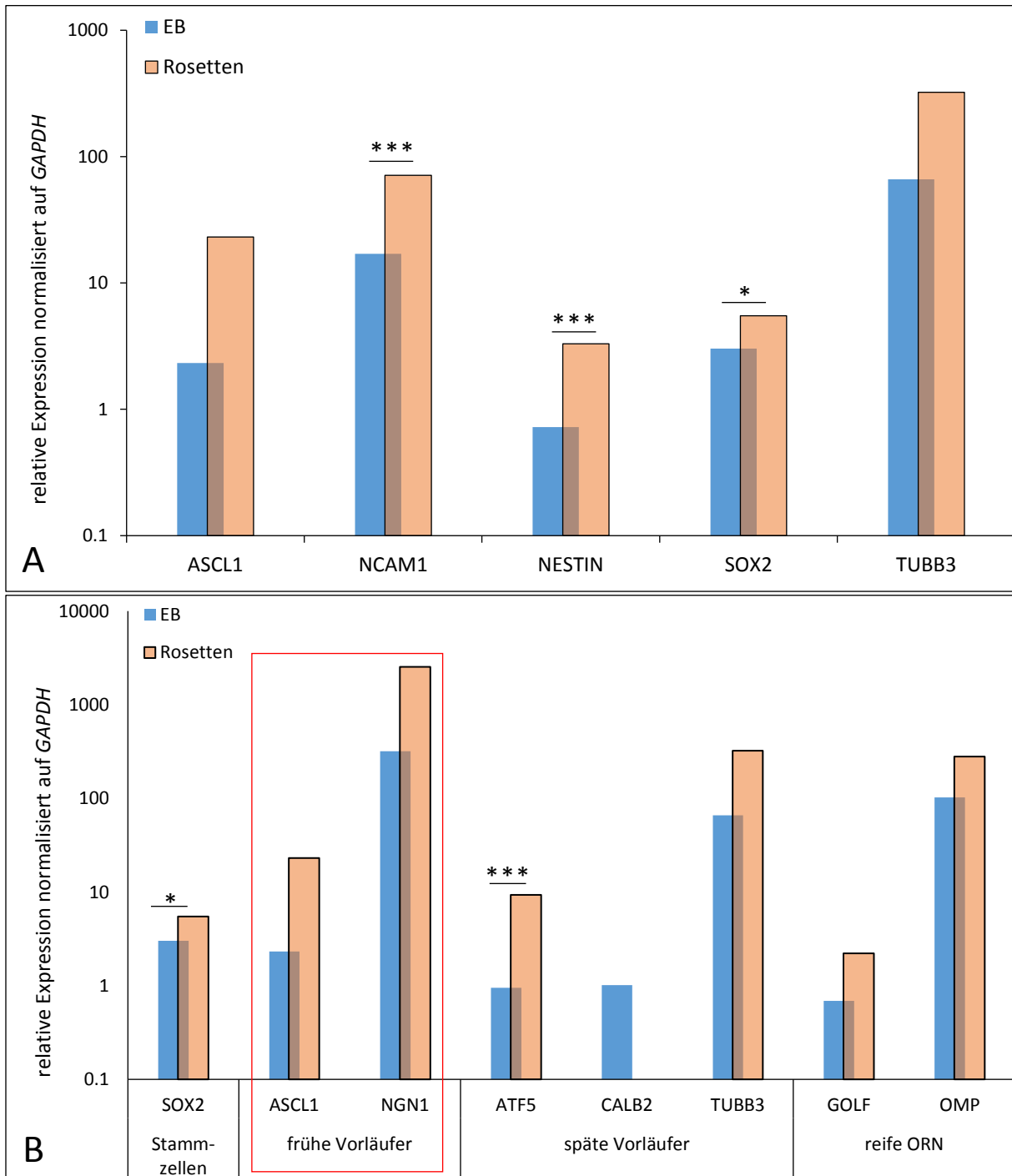


Abbildung 46: Grundexpression von olfaktorischen Markergenen in EBs und Rosetten

(A) *ASCL1*, *NCAM1*, *NESTIN*, *SOX2* und *TUBB3* sind publizierte Marker für *in vitro* differenzierte neurale Rosetten. Die Expression zwischen EBs und neuronalen Rosetten ist für jeden Marker aufgeführt. (B) Die Grundexpression von acht olfaktorisch-assoziierten Genen (*ASCL1*, *ATF5*, *CALB2*, *NGN1*, *GOLF*, *OMP*, *SOX2* und *TUBB3*) ist in dieser Grafik dargestellt. Die Markergene wurden in vier Gruppen eingeteilt (Stammzellen, frühe und späte Vorläufer und reife ORN) und sind charakteristisch für die jeweilige Gruppe. Der rote Kasten markiert die Expression des erwarteten Markergens in den analysierten Stadien. Die Werte wurden intern mit dem Referenzgen *GAPDH* verrechnet und auf iPSZ bezogen. Signifikanzen: $P \leq 0,5$: *, $P \leq 0,1$: **, $P \leq 0,01$: ***.

3.3.2.2. Proteinanalyse von Rosetten während der olfaktorischen Differenzierung

Publizierte Marker für neurale Rosetten sind *PAX6* und *SOX2* [161], welche auch in unseren Färbungen detektiert werden konnten (Abbildung 47). Neben diesen Markern zeigen die neuronalen Rosetten des

gerichteten Differenzierungsprotokolls eine immunpositive Reaktion gegen ASCL1, GOLF, SOX2 und TUBB3. Eine negative Färbung ist bei den Markern ATF5, CALB2, NGN1 und OMP zu beobachten. Das Durchlichtbild der neuralen Rosetten und die Kernfärbung mit DAPI sind auch gezeigt.

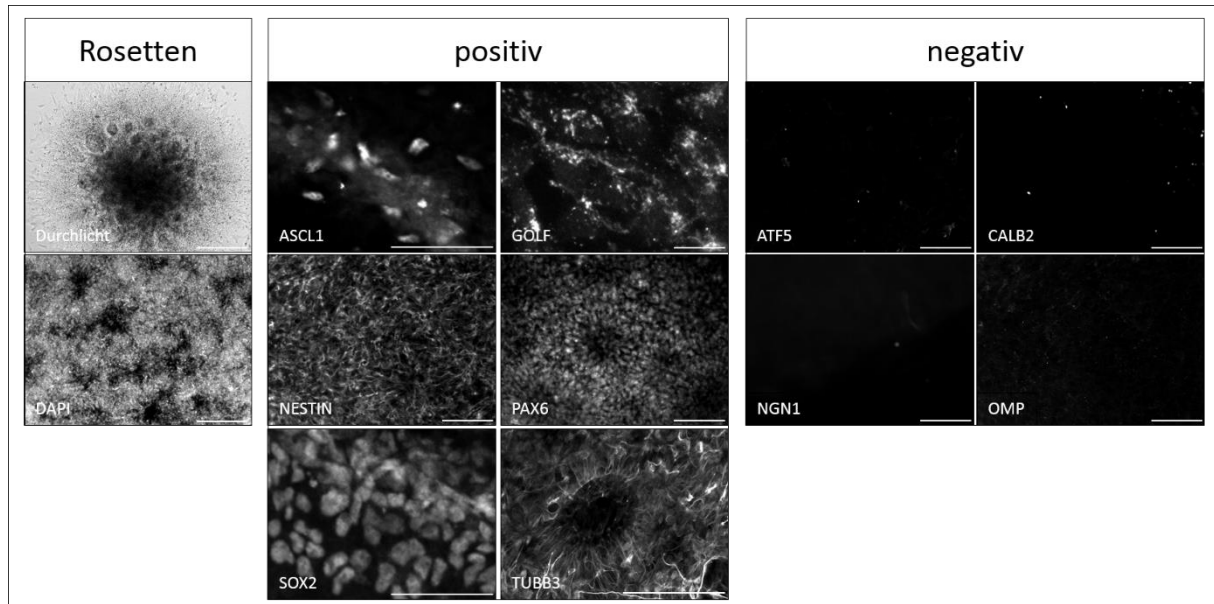


Abbildung 47: Proteinexpression von olfaktorischen Markern in Rosetten

Neurale Rosetten wurden mit zehn olfaktorisch assoziierten Markern gefärbt (ASCL1, ATF5, CALB2, GOLF, NESTIN, NGN1, OMP, PAX6, SOX2, TUBB3). Die Ergebnisse der Färbung wurden in einen positiven und negativen Bereich unterteilt. Das Durchlichtbild und die Kernfärbung mit DAPI wird gezeigt. Maßstab: 100 µm

3.3.3. Analyse von neuralen Stammzellen

3.3.3.1. Vergleichende Genexpressionsanalyse von Rosetten und neuralen Stammzellen während der olfaktorischen Differenzierung

In den Grafiken 48 A/B wurden Genexpressionsdaten von neuralen Rosetten mit den von neuralen Stammzellen verglichen. Anhand von publizierten Markern für *in vitro* differenzierte NSZ (GAP43, NCAM1, NESTIN, NEUROD1, NGN1, PAX6, SOX1, SOX2, SOX9) sollte auf RNA und Protein Ebene überprüft werden, ob unsere generierten Zellen ähnliche Expressionsprofile zeigen (Abbildung 48 A, 49). Sowohl auf RNA, als auch auf Protein Ebene konnte eine Expression von NESTIN, PAX6 und SOX2 detektiert werden. Die anderen Marker GAP43, NCAM1, NEUROD1 und SOX9 zeigten eine signifikant erhöhte Expression in den neuralen Rosetten gegenüber den EBs, während die Expression von SOX1 tendenziell abnimmt. Für NESTIN und SOX2 konnte eine Expression auf RNA und Protein Ebene in den neuralen Stammzellen detektiert werden. Das NGN1 Gen, jedoch nicht das Protein konnte detektiert werden.

Die nachfolgende Grafik (Abbildung 48 B) zeigt in einem unabhängigen Experiment das Genexpressionsprofil von acht ausgewählten olfaktorischen Markergenen (ASCL1, ATF5, CALB2, GOLF, NGN1, OMP, SOX2, TUBB3) im Vergleich von neuralen Rosetten zu neuralen Stammzellen. Es handelt sich hierbei um zwei aufeinanderfolgende Stadien der Differenzierung. Die neuralen Rosetten werden zu einer Einzelzellsuspension vereinzelt und lagern sich anschließend unter Suspensionsbedingungen zu neuralen Stammzellen zusammen. Alle Gene bis auf ASCL1 fielen im neuralen Stammzell Stadium was zu erwarten war, da das Ablösen und Vereinzeln der Rosetten ein großer Selektionsschritt im Protokoll darstellen.

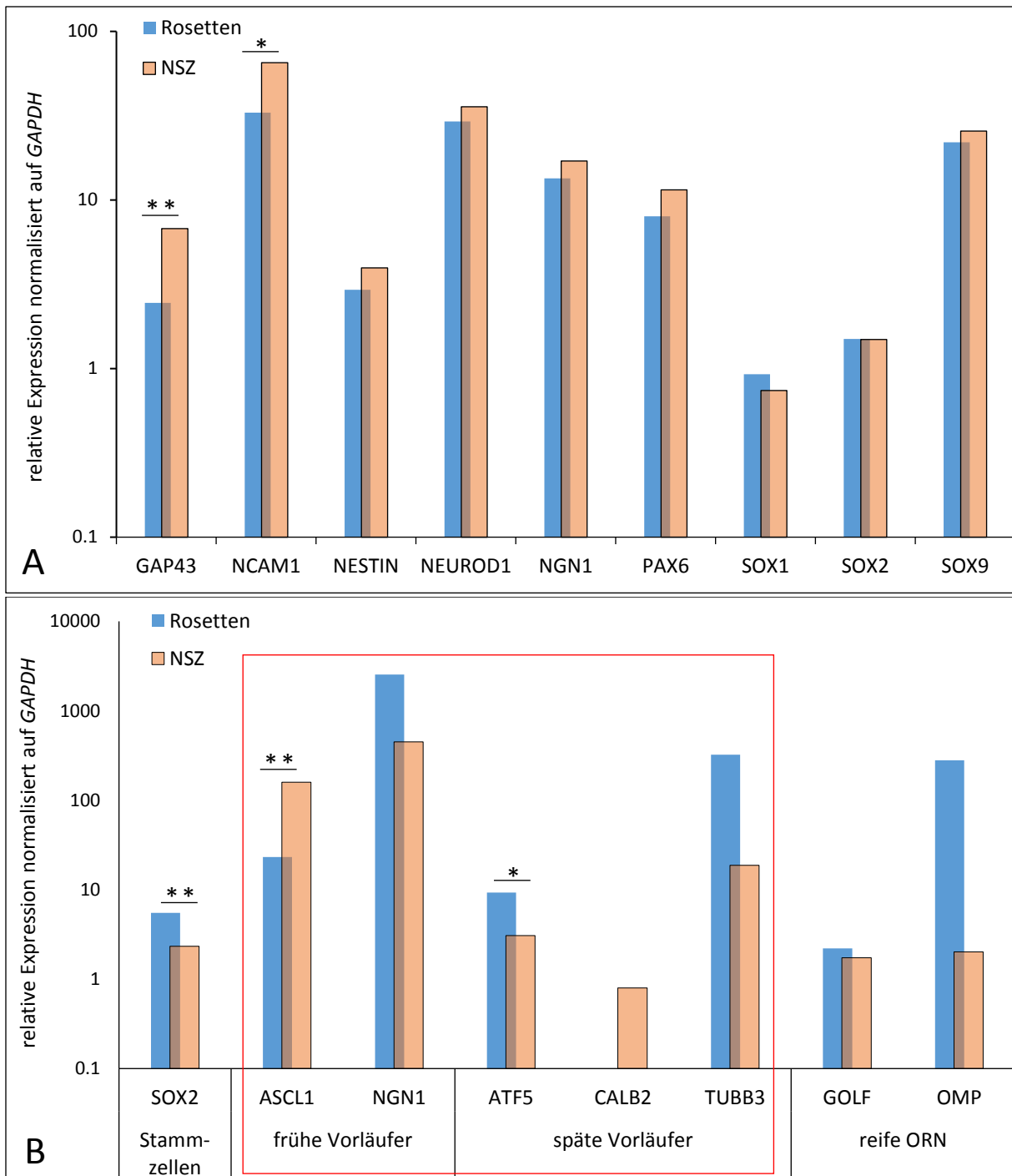


Abbildung 48: Grundexpression von olfaktorischen Markergenen in Rosetten und neuralen Stammzellen

(A) *GAP43*, *NCAM1*, *NESTIN*, *NEUROD1*, *NGN1*, *PAX6*, *SOX1*, *SOX2* und *SOX9* sind publizierte Marker für *in vitro* differenzierte neurale Stammzellen (NSZ). Die Expression zwischen neuronalen Rosetten und neuronalen Stammzellen ist für jeden Marker aufgeführt. (B) Die Grundexpression von acht olfaktorisch assoziierten Genen (*ASCL1*, *ATF5*, *CALB2*, *NGN1*, *GOLF*, *OMP*, *SOX2* und *TUBB3*) ist in dieser Grafik dargestellt. Die Markergene wurden in vier Gruppen eingeteilt (Stammzellen, frühe und späte Vorläufer und reife ORN) und sind charakteristisch für die jeweilige Gruppe. Der rote Kasten markiert die Expression des erwarteten Markergens in den analysierten Stadien. Die Werte wurden intern mit dem Referenzgen *GAPDH* verrechnet und auf iPSZ bezogen. Signifikanzen: $P \leq 0,5$: *, $P \leq 0,1$: **, $P \leq 0,01$: ***.

3.3.3.2. Proteinanalyse von neuronalen Stammzellen während der olfaktorischen Differenzierung

Die meisten Publikationen nutzen die spezifischen Marker *NESTIN*, *PAX6* und *SOX2* [162] zur Charakterisierung von neuronalen Stammzellen. Neben diesen Markern sind auch die neuronalen Stammzellen aus dem Differenzierungsprotokoll für olfaktorische Neurone positiv für *ASCL1*, *CALB2*

und TUBB3. Keine positive Färbung zeigen die Zellen für die olfaktorischen Marker ATF5, NGN1 und OMP (Abbildung 49).

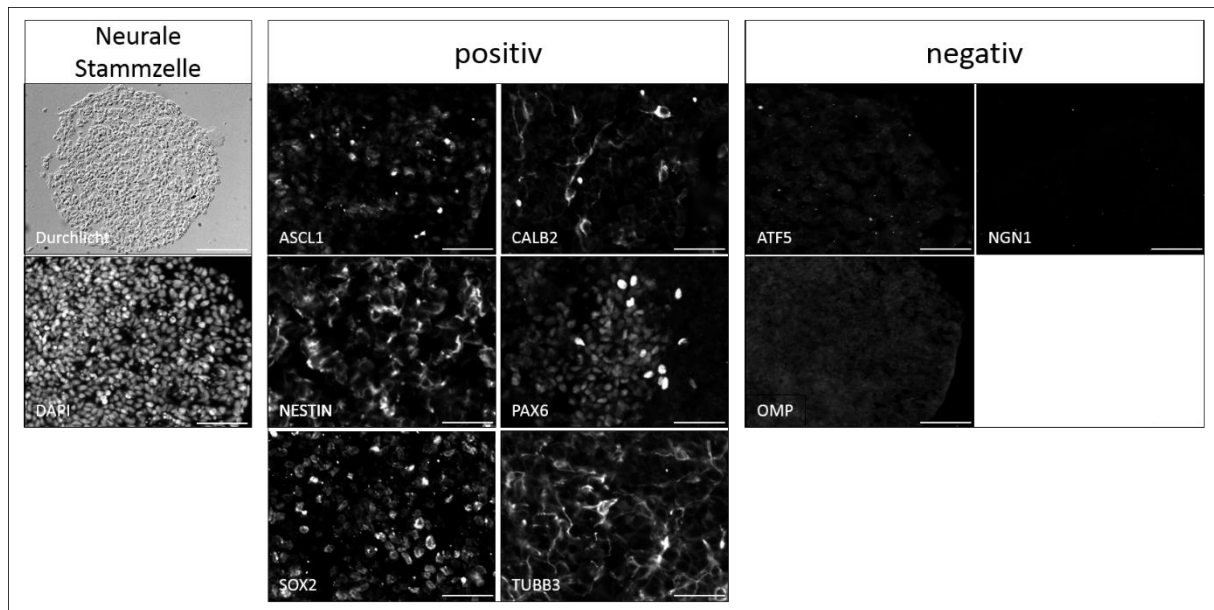


Abbildung 49: Proteinexpression von olfaktorischen Markern in neuralen Stammzellen

Neurale Stammzellen wurden mit neun olfaktorisch assoziierten Markern gefärbt (ASCL1, ATF5, CALB2, NESTIN, NGN1, OMP, PAX6, SOX2, TUBB3). Die Ergebnisse der Färbung wurden in einen positiven und negativen Bereich unterteilt. Das Durchlichtbild und die Kernfärbung mit DAPI wird für die neuralen Stammzellen gezeigt. Maßstab: 100 µm

3.3.4. Analyse von Neuronen

3.3.4.1. Vergleichende Genexpressionsanalyse von neuralen Stammzellen und frühen Neuronen während der olfaktorischen Differenzierung

Plattiert man neurale Stammzellen nach 14 Tagen Inkubation in olfaktorischem Differenzierungsmedium wieder aus, so wachsen Neurone aus den kuppelartigen Gebilden aus. Durch die gezielte Zugabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wird die Bildung und Differenzierung von olfaktorischen Neuronen gefördert. In den Grafiken 50 A/B wurden Genexpressionsdaten von neuralen Stammzellen mit den von frühen Neuronen verglichen. Anhand von publizierten Markern für *in vitro* differenzierte NSZ und frühe Neurone (GAP43, NCAM1, NESTIN, NEUROD1, NGN1, PAX6, SOX1, SOX2, SOX9) sollte auf RNA und Protein Ebene überprüft werden, ob unsere generierten Zellen diese Anforderungen erfüllen (Abbildung 50 A). In den neuralen Stammzellen gegenüber den frühen Neuronen (Tag 47) ist eine signifikant erhöhte Expression bei den Markern *GAP43* und *NCAM1*, eine signifikant erniedrigte Expression bei den Markern *NESTIN* und *SOX2* zu beobachten. Die Markergene *NEUROD1*, *NGN1*, *PAX6*, *SOX1* und *SOX9* zeigen eine tendenzielle Abnahme in ihrer Expression. In einem unabhängigen Experiment konnte gezeigt werden, dass die Markergene für die späten olfaktorischen Vorläufer und frühen Neurone in diesen Stadien der Differenzierung ansteigen (Abbildung 50 B).

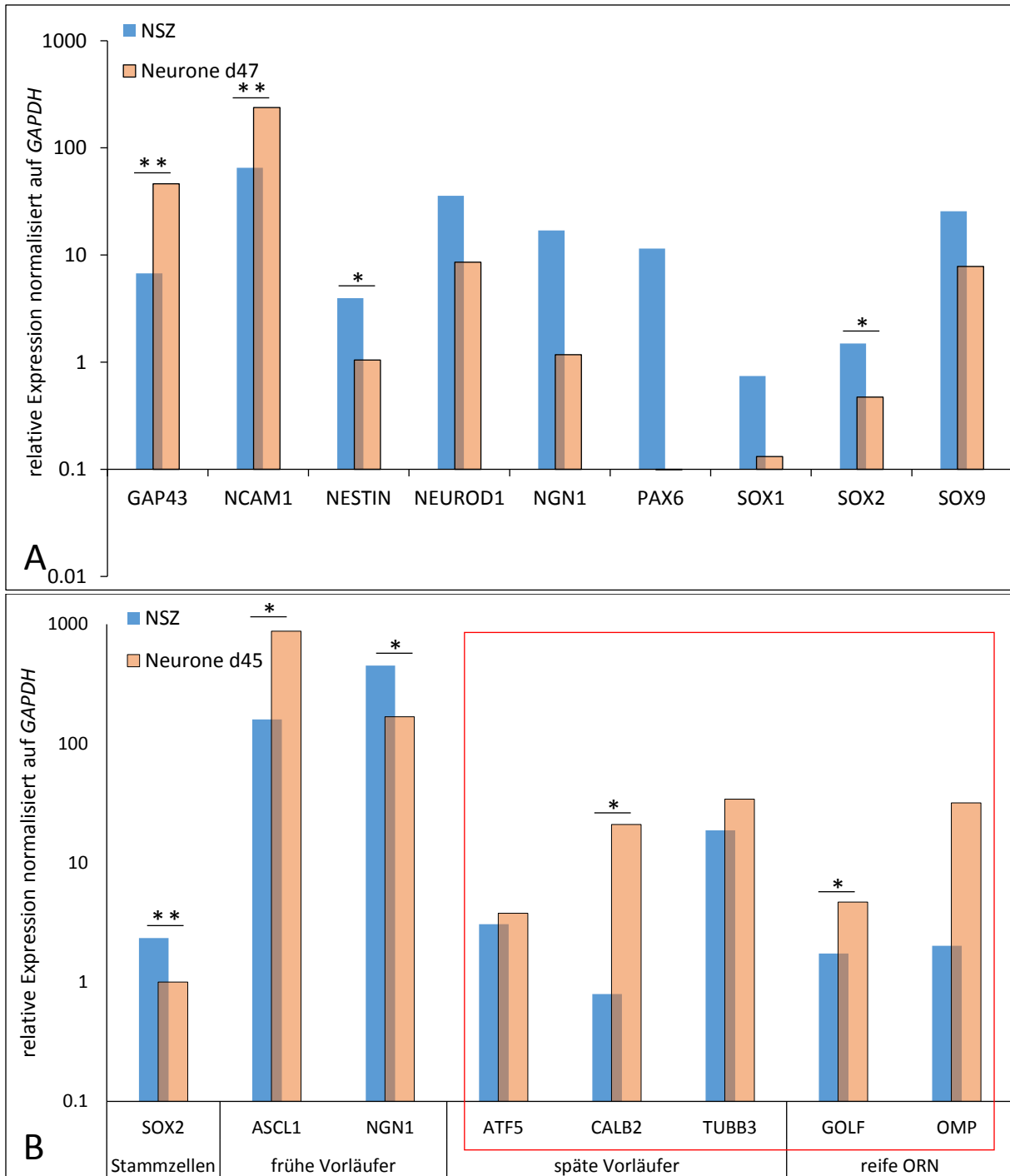
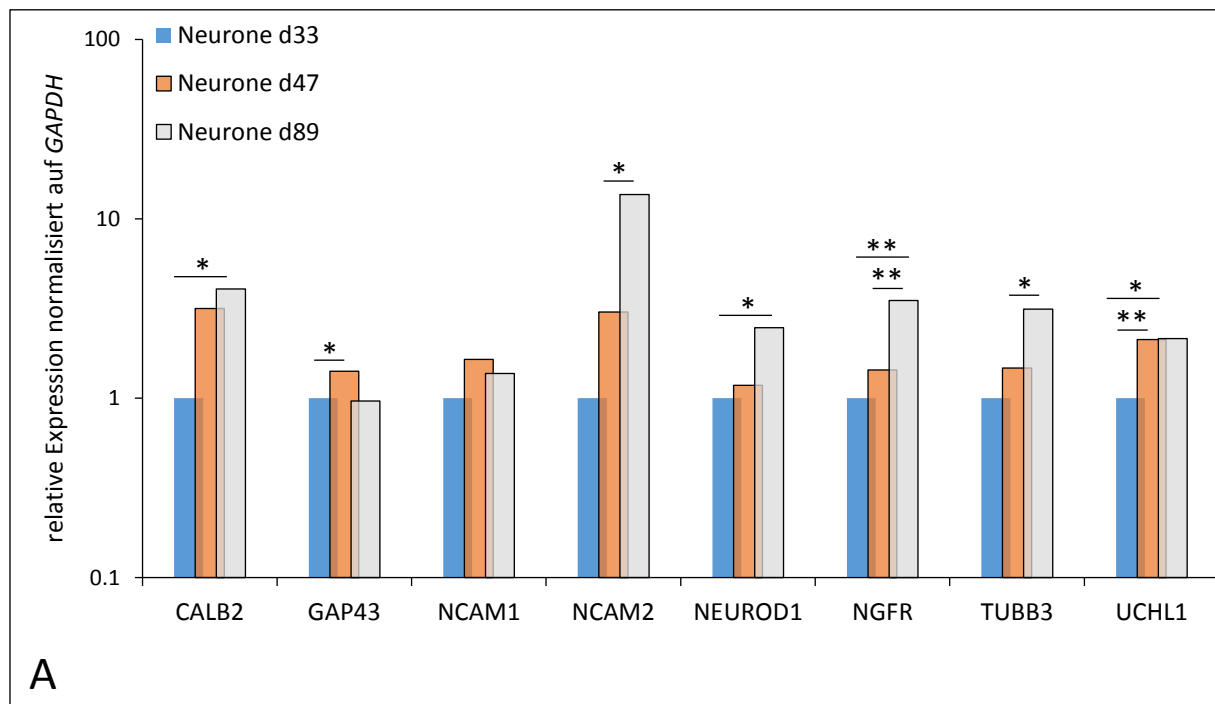


Abbildung 50: Grundexpression von olfaktorischen Markergenen in neuralen Stammzellen und frühen Neuronen

(A) *GAP43*, *NCAM1*, *NESTIN*, *NEUROD1*, *NGN1*, *PAX6*, *SOX1*, *SOX2* und *SOX9* sind publizierte Marker für *in vitro* differenzierte neuronale Stammzellen (NSZ) und frühe Neurone. Die Expression zwischen neuronalen Stammzellen und frühen Neuronen (Tag 47) ist für jeden Marker aufgeführt. (B) Die Grundexpression von acht olfaktorisch assoziierten Genen (*ASCL1*, *ATF5*, *CALB2*, *NGN1*, *GOLF*, *OMP*, *SOX2* und *TUBB3*) ist in dieser Grafik dargestellt. Die Markergene wurden in vier Gruppen eingeteilt (Stammzellen, frühe und späte Vorläufer und reife ORN) und sind charakteristisch für die jeweilige Gruppe. Der rote Kasten markiert die Expression des erwarteten Markergens in den analysierten Stadien. Die Werte wurden intern mit dem Referenzgen *GAPDH* verrechnet und auf iPSZ bezogen. Signifikanzen: $P \leq 0,5$: *, $P \leq 0,1$: **, $P \leq 0,01$: ***.

3.3.4.2. Vergleichende Genexpressionsanalyse von frühen und späten Neuronen während der olfaktorischen Differenzierung

In den Grafiken 51 A wurden Genexpressionsdaten von drei Zeitpunkten während des Neuronen Stadiums (Tag 33, 47, 89) miteinander verglichen. Anhand von publizierten Markern für *in vitro* differenzierte Neurone (*CALB2*, *GAP43*, *NCAM1*, *NCAM2*, *NEUROD1*, *NGFR*, *TUBB3*, *UCHL1*) sollten auf RNA Ebene die entsprechenden Expressionsprofile überprüft werden. Es lässt sich ein signifikanter Anstieg über die drei gemessenen Zeitpunkte bei den Genen *CALB2*, *NCAM2*, *NEUROD1*, *NGFR*, *TUBB3* und *UCHL1* beobachten. Weitere signifikante und tendenzielle Anstiege zeigen die Markergene *GAP43* und *NCAM1*. In einem weiteren unabhängigen Versuch wurden die olfaktorischen Markergene zum Zeitpunkt Tag 45 und Tag 88 der Differenzierung analysiert. Hier zeigt sich ein tendenzieller Anstieg aller Gene zwischen den frühen und den späten Neuronen (Abbildung 51 B). Die Aktivierung und Ausreifung der späten Vorläuferzellen zu reifen ORN erfolgt durch die Zugabe von ActivinA [153] in das Differenzierungsmedium. Die Reifung der Neurone wird durch die Zugabe von BDNF, GDNF und weiteren neurotrophen Faktoren gefördert [163, 164]. Im Laufe des Reifungsprozesses steigen spezifische olfaktorische Marker, wie Rezeptoren, Ionenkanäle und weitere Bestandteile der olfaktorischen Signalkaskade an.



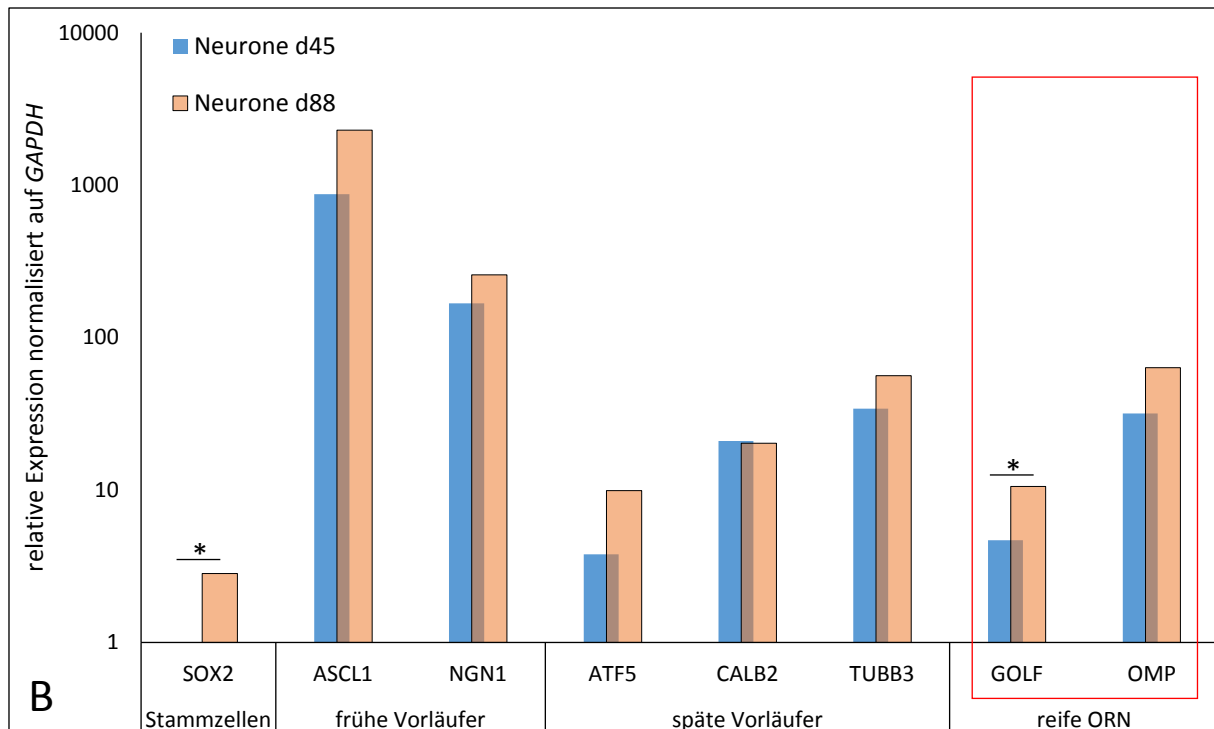


Abbildung 51: Grundexpression von olfaktorischen Markergenen in frühen und späten Neuronen

(A) *CALB2*, *GAP43*, *NCAM1*, *NCAM2*, *NEUROD1*, *NGFR*, *TUBB3* und *UCHL1* sind publizierte Marker für *in vitro* differenzierte Neurone. Die Expression der drei unterschiedlichen Tage im Neuronen Stadium ist für jeden Marker aufgeführt. (B) Die Grundexpression von acht olfaktorisch assoziierten Genen (*ASCL1*, *ATF5*, *CALB2*, *NGN1*, *GOLF*, *OMP*, *SOX2* und *TUBB3*) ist in dieser Grafik dargestellt. Die Markergene wurden in vier Gruppen eingeteilt (Stammzellen, frühe und späte Vorläufer und reife ORN) und sind charakteristisch für die jeweilige Gruppe. Der rote Kasten markiert die Expression des erwarteten Markergens in den analysierten Stadien. Frühe Neurone wurden an Tag 45 und späte Neurone an Tag 88 gemessen. Die Werte wurden intern mit dem Referenzgen *GAPDH* verrechnet und auf iPSZ bezogen. Signifikanzen: $P \leq 0,5$: *, $P \leq 0,1$: **, $P \leq 0,01$: ***.

3.3.4.3. Proteinanalyse von Neuronen am Ende der olfaktorischen Differenzierung

Differenziert man induziert pluripotente Stammzellen zu Neuronen, so entsteht immer eine Mischpopulation von verschiedenen neuronalen (Neuroglia) und neuronalen Subtypen. Das Ziel jedes Differenzierungsprotokolls ist es, die gewünschte Zellpopulation in der *in vitro* Kultur so rein wie möglich zu bekommen. Dies geschieht durch die Zugabe von definierten Zusätzen zu bestimmten Stadien während des Differenzierungsprotokolls. Durch die experimentelle Variation in der Zugabe von verschiedenen Zytokinen ist es gelungen, die Ausbeute von OMP in den differenzierten Neuronen zu erhöhen. Die Charakterisierung dieses Protokolls umfasst auch die Identifikation der allgemein entstandenen neuronalen und neuronalen Zellpopulationen. Zu diesem Zweck wurden Kulturen eines späten Zeitpunkts auf immunologischer Ebene gegen neurale und neuronale Marker getestet (Abbildung 52). Die entstandenen Neurone sind eine Mischkultur aus verschiedenen Neuronen, die durch klassische immunologische Nachweise detektiert werden können. Darunter befinden sich neben den eigentlichen Neuronen, welche *TUBB3* positiv sind, Astrozyten (Marker: *GFAP* [165]) und Oligodendrozyten (Marker: *OLIG1* [166]). Innerhalb der Neurone lassen sich bestimmte Subtypen unterscheiden: z.B. Acetylcholinerge Neurone (Marker: *CHAT* [167]), Dopaminerge Neurone (Marker: *TH* [168]), GABAerge Neurone (Marker: *GABA* [169]), Glutamaterge Neurone (Marker: *M-GLU* [170]), Motoneurone (Marker: *SMI* [171]) sowie olfaktorische Rezeptorneurone (Marker: *OMP* [110]).

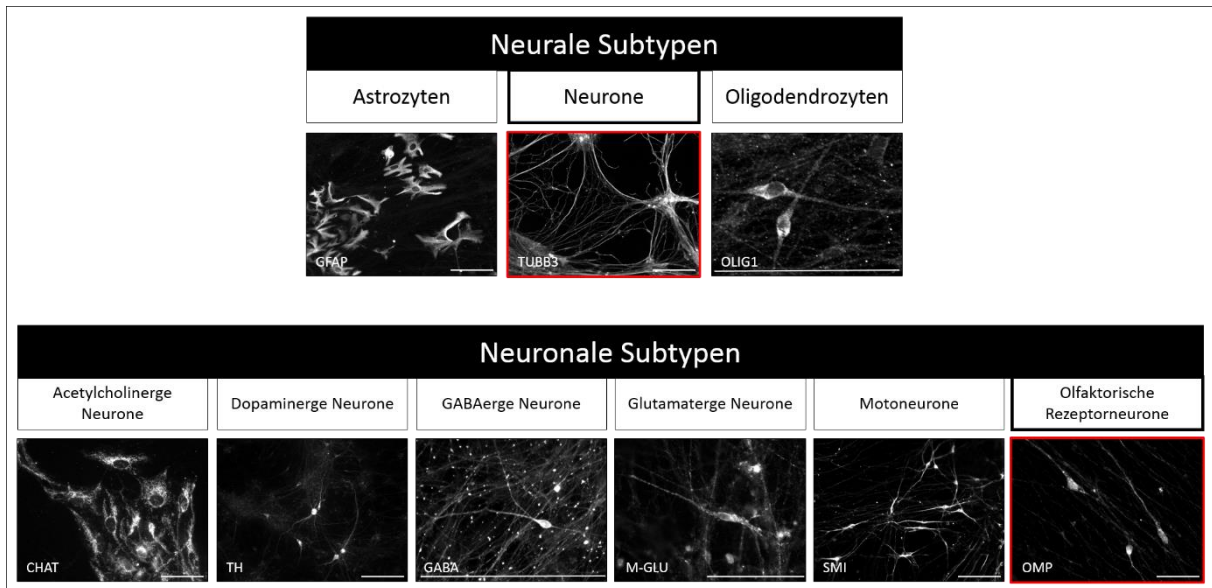


Abbildung 52: Proteinexpression von neuralen und neuronalen Subtypen in dem olfaktorischen Differenzierungsprotokoll. Neurale Subtypen des Differenzierungsprotokolls sind Astrozyten (Marker: GFAP), Neurone (Marker: TUBB3) und Oligodendrozyten (Marker: OLIG1). Eine genauere Aufspaltung der Neurone in neuronale Subtypen zeigen Acetylcholinerge Neurone (Marker: CHAT), Dopaminerge Neurone (Marker: TH), GABAerge Neurone (Marker: GABA), Glutamaterge Neurone (Marker: M-GLU), Motoneurone (Marker: SMI) und olfaktorische Rezeptorneurone (Marker: OMP). Maßstab: 100 µm

3.3.5. Genexpressionsprofilanalysen im olfaktorischen Differenzierungsprotokoll

3.3.5.1. OMP Genexpressionsanalyse während der Differenzierung

Da *OMP* als der etablierte Marker für reife ORN für die Entwicklung des Differenzierungsprotokolls herangezogen wurde, soll in Abbildung 53 genauer der Verlauf von *OMP* zusammen mit *TUBB3* dargestellt werden. Mit dem Fokus auf das Neuronen Stadium zeigt sich, dass über die gemessene Zeit der Kurvenverlauf von beiden Genen sehr ähnlich ist. Wie erwartet, kann man einen signifikanten Anstieg von *OMP* und *TUBB3* ausgehend von den Stammzellen beobachten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mithilfe des entwickelten Differenzierungsprotokolls eine höhere *OMP* Expression in den Neuronen detektiert werden kann. Dieses Ergebnis wurde durch die Messung der *OMP* Expression und die Färbung von *OMP* positiven Neuronen in der *in vitro* Kultur bestätigt. Mit diesem Protokoll wurde an Tag 74 der Differenzierung eine 58-fach höhere *OMP* Expression im Vergleich zu Stammzellen mit einer Signifikanz von $p=0,0039$ erreicht.

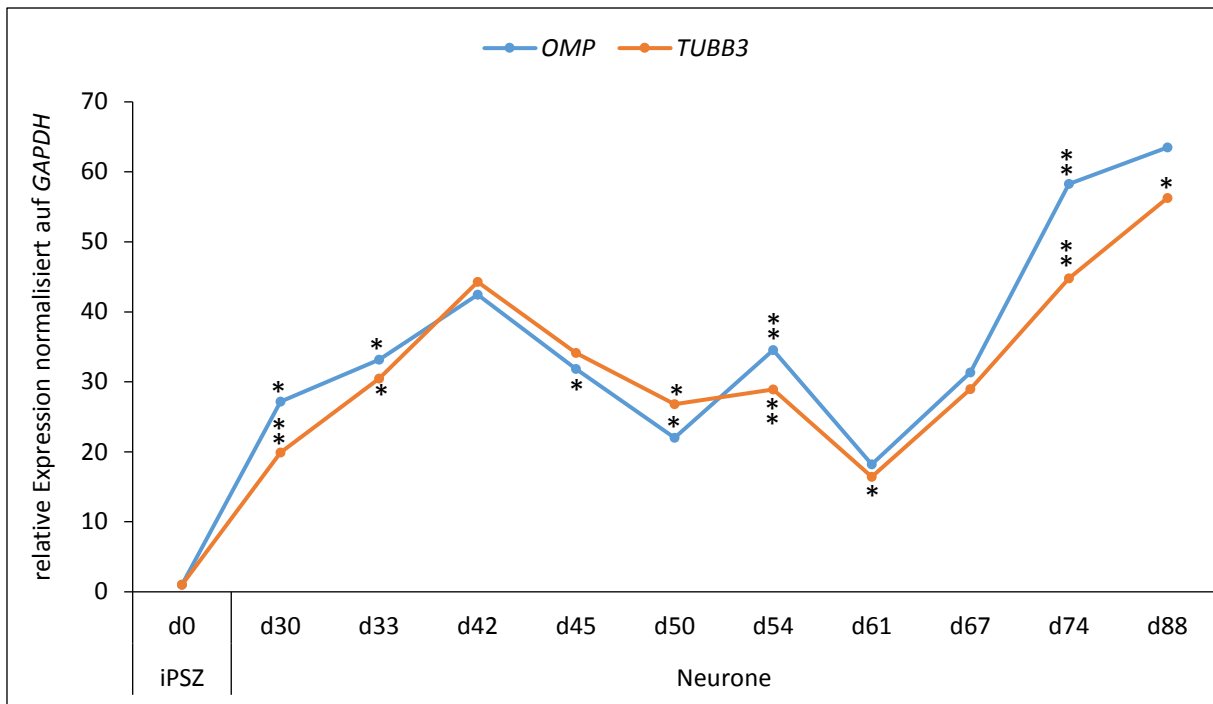


Abbildung 53: OMP und TUBB3 Genexpressionsanalyse während der Differenzierung

Die Grafik zeigt die relative RNA Expressionen von OMP und TUBB3. Die Daten wurden intern mit dem Referenzgen GAPDH verrechnet und auf iPSZ bezogen. Die Signifikanzen beziehen sich auf iPSZ Tag (d) 0: $P \leq 0,5$: *, $P \leq 0,1$: **, $P \leq 0,01$: ***.

3.3.5.2. Genexpressionskaskade ASCL1 → NGN1 → NEUROD1 → NCAM1

In Abbildung 54 soll überprüft werden, ob die publizierte Signalkaskade, die frühe ASCL1 exprimierende Vorläuferpopulationen (GBZ-TA) bis zu den reifen sensorischen Neuronen durchlaufen auch in der Differenzierung beobachtet werden kann. Differenzierte GBZ-TA exprimieren NGN1, gefolgt von NEUROD1 und reifen dann zu NCAM1 positiven Neuronen [85]. Bezogen auf NSZ Tag 25 zeigt der Kurvenverlauf von ASCL1 einen signifikanten Anstieg im weiteren Verlauf der Differenzierung. NGN1 hat seine höchste Expression im Stammzell Stadium und fällt dann signifikant zu den Neuronen hin ab. Diesen Kurvenverlauf lässt sich auch bei NEUROD1 beobachten, hier ist die Abnahme der Genexpression noch deutlich stärker als bei NGN1. NCAM1 zeigt eine durchgehend stark erhöhte Expression in allen untersuchten Tagen während des Neuronen Stadiums.

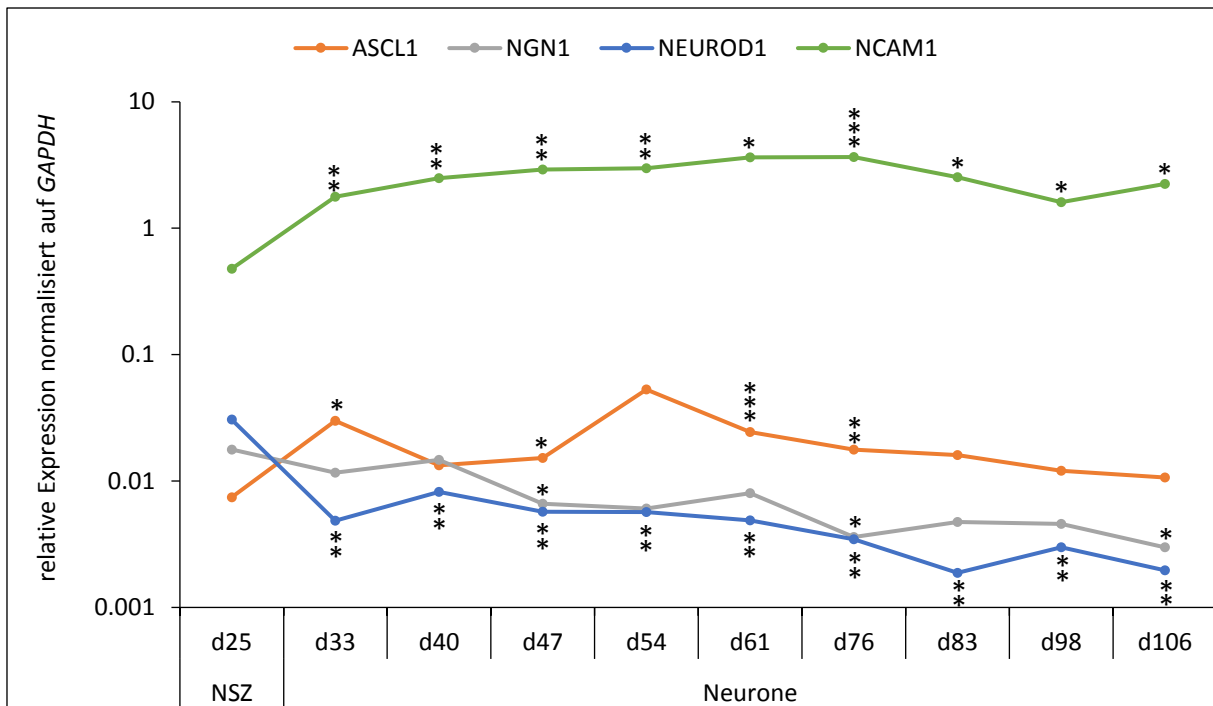


Abbildung 54: Genexpressionsanalyse Differenzierung von frühen Vorläufern zu ORN über den NEUROD1-Signalweg
 Die Grafik zeigt die absolute RNA Expressionen von ASCL1, NGN1, NEUROD1 und NCAM1. Die absoluten Daten wurden intern mit dem Referenzgen GAPDH verrechnet. Die Signifikanzen beziehen sich auf NSZ Tag (d) 25: P ≤ 0,5: *, P ≤ 0,1: **, P ≤ 0,01: ***.

3.3.5.3. Genexpressionskaskade TUBB3 → CALB2 → OMP

In Abbildung 55 soll der Zusammenhang zwischen den Markern für späte Vorläufer (GBZ-INP/IN) und reifen, OMP positiven ORN, in dem gerichteten Protokoll nachvollzogen werden. Die aufeinanderfolgende Genexpressionskaskade der differenzierenden Progenitorpopulationen ist laut Publikation wie folgt: TUBB3 → CALB2 → OMP [93]. TUBB3 markiert unreife, CALB2 und OMP reife neuronale Zellen des olfaktorischen Epithels. In der Genexpressionsanalyse lässt sich jedoch nur eine signifikante Erhöhung zum Zeitpunkt Tag 89 bei CALB2 detektieren. Alle drei Marker haben möglicherweise eine geringe Grundexpression in der Differenzierung, wodurch keine signifikante Zunahme der Genexpression erfolgen kann.

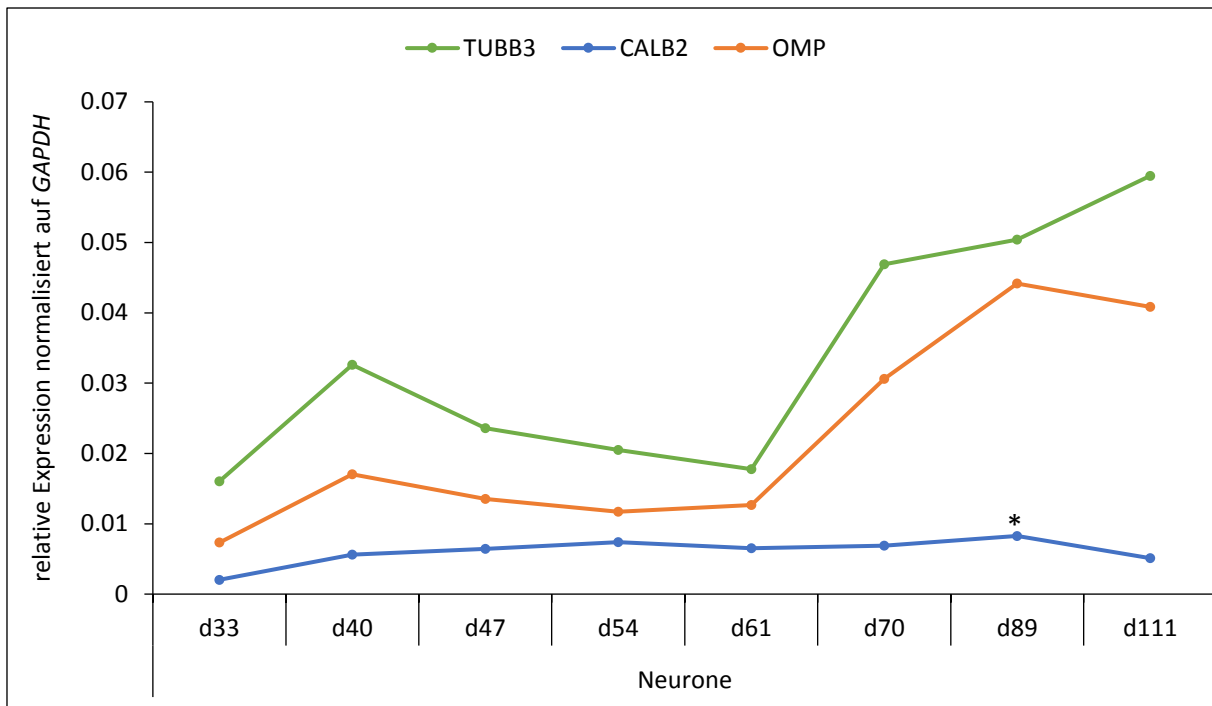


Abbildung 55: Genexpressionsanalyse Differenzierung von späten Vorläufern zu ORN über den CALB2-Signalweg
 Die Grafik zeigt die absolute RNA Expressionen von CALB2, OMP und TUBB3. Die absoluten Daten wurden intern mit dem Referenzgen GAPDH verrechnet. Die Signifikanzen beziehen sich auf Neurone Tag (d) 33: $P \leq 0,5$: *, $P \leq 0,1$: **, $P \leq 0,01$: ***.

3.3.5.4. Genexpressionskaskade $SOX2 \rightarrow TUBB3 \rightarrow ATF5 \rightarrow OMP$

Wang und Kollegen publizierten 2012 ein ATF5 reguliertes Modell in der Expressionskaskade von Progenitoren, unreifen und reifen ORN. *SOX2* wird als Marker für die Basalzellen beschrieben, von denen ausgehend sich zunächst $TUBB3^+/ATF5^-$ und $TUBB3^+/ATF5^+$ späte Vorläuferpopulationen bzw. frühe neuronale Vorläufer bilden und dann zu $OMP^+/ATF5^+$ reifen olfaktorischen Neuronen differenzieren [95]. Ob dieser Zusammenhang zwischen den Genexpressionsverläufen auch in dem von uns generierten Differenzierungsprotokoll zu finden ist, wird in der Abbildung 56 näher analysiert. *SOX2* zeigt dabei die höchste Expression in den neuralen Stammzellen und nimmt dann signifikant ab, während *TUBB3* einen ansteigenden Kurvenverlauf besitzt. *ATF5* und *OMP* zeigen einen tendenziellen Anstieg in ihrem Kurvenverlauf über die gemessenen Zeitpunkte im Neuronen Stadium.

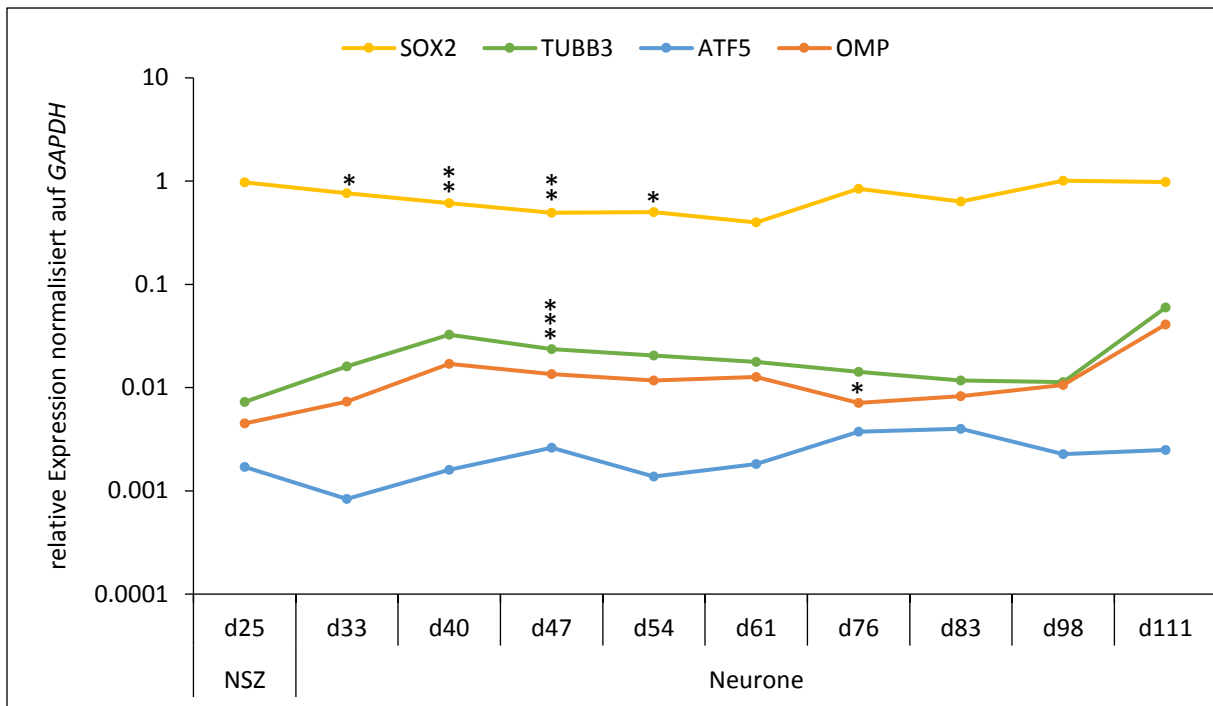


Abbildung 56: Genexpressionsanalyse Differenzierung von frühen Vorläufern zu ORN über den ATF5-Signalweg
 Die Grafik zeigt die absolute RNA Expressionen von ATF5, OMP, SOX2 und TUBB3. Die Daten wurden intern mit dem Referenzgen GAPDH verrechnet. Die Signifikanzen beziehen sich auf NSZ Tag (d) 25: $P \leq 0,5$: *, $P \leq 0,1$: **, $P \leq 0,01$: ***.

3.3.5.5. Genexpressionskaskade SOX2 → ASCL1 → KIT → OMP

Die bereits bekannte Signalkaskade SOX2 → ASCL1 → OMP/NCAM1, die während der Neurogenese im olfaktorischen System abläuft, wird im Zusammenhang mit dem Markergen KIT in der Abbildung 57 näher analysiert. Der Signalweg zur Bildung von reifen ORN kann nach Ausfall des ASCL1-vermittelten Signalweges über die Expression von KIT in den Progenitoren ablaufen [172]. Der Kurvenverlauf von SOX2, einem Marker für Stammzellen, zeigt das Maximum im späten NSZ Stadium und fällt dann signifikant ab. OMP zeigt einen tendenziellen Anstieg in der Genexpression über die gemessenen Zeitpunkte. Die Kurven von ASCL1 und KIT verhalten sich gegenläufig. Zeigt ASCL1 ein signifikantes Maximum bei Tag 33 der Differenzierung, hat KIT eine signifikante Erniedrigung der Genexpression. Dies lässt sich auch an den folgenden Tagen 47, 54, 61 und 70 beobachten.

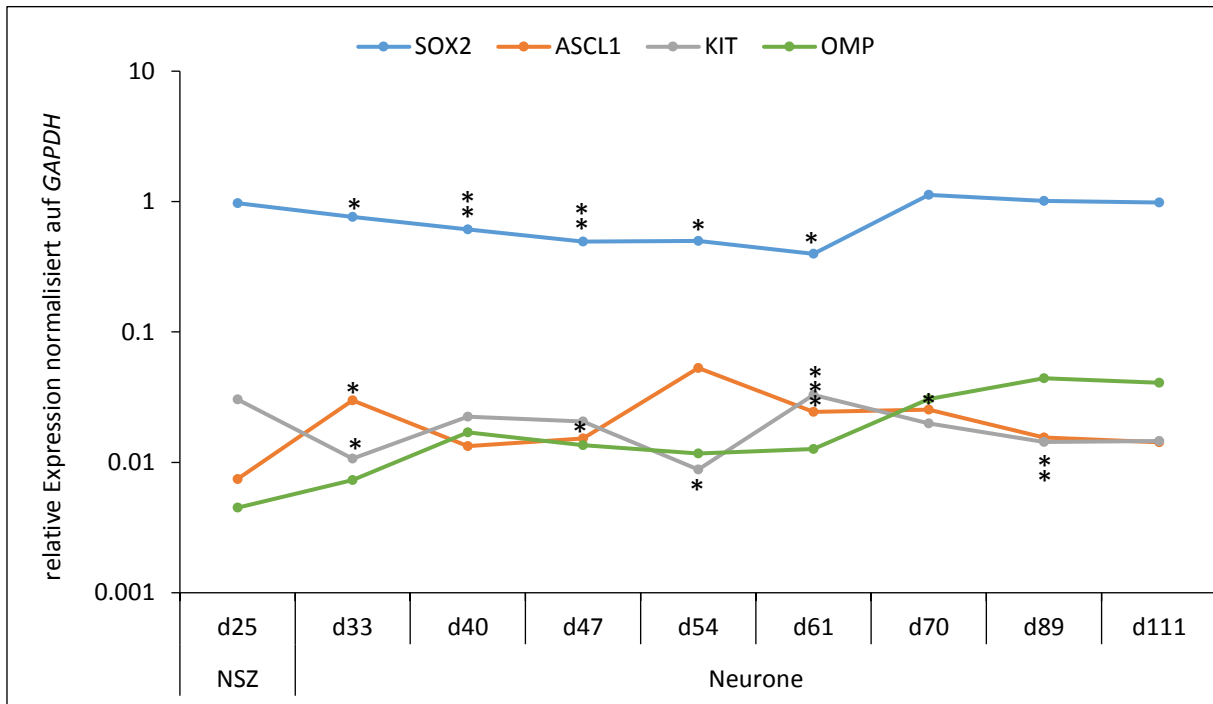


Abbildung 57: Genexpressionsanalyse Differenzierung von frühen Vorläufern zu ORN über den KIT-Signalweg
 Die Grafik zeigt die absolute RNA Expressionen von ASCL1, KIT, OMP und SOX2. Die Daten wurden intern mit dem Referenzgen GAPDH verrechnet. Die Signifikanzen beziehen sich auf NSZ Tag (d) 25: P ≤ 0,5: *, P ≤ 0,1: **, P ≤ 0,01: ***.

4. Diskussion

4.1. iPSZ als Basis für die Differenzierung

4.1.1. Generierung von iPSZ aus somatischen Zellen

Pluripotenz kommt in einem sehr kurzen, transienten Zustand während der frühen embryonalen Entwicklung *in vivo* vor. Die Technik der Entwicklung von *in vitro* generierten pluripotenten Stammzelllinien führte zu einem sehr erfolgreichen Modell für viele molekulare Fragenstellungen. Der Prozess der genetischen und morphologischen Konversion von somatischen Zellen zu Stammzellen lässt sich unter Verwendung des gentechnisch veränderten Lentivirus gut mikroskopisch nachvollziehen (Abbildung 14). Das Virus enthält einen starken retroviralen Promotor, der eine sehr effizient Expression in den primären Keratinozyten aufweist. Aufgrund von epigenetischen Umgestaltungen wird dieser sehr schnell wieder inaktiviert, sobald in den Stammzellen der Pluripotenzenmarker *OCT4* konstant und stark endogen exprimiert wird [146]. Zusätzlich verfügt das Plasmid über eine dTomato Fluoreszenzkassette, die sich hinter der Kassette der OKSM Reprogrammierungsgene (*OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, *C-MYC*) befindet. Sobald die Transkriptionsfaktoren von den reprogrammierenden Keratinozyten exprimiert werden, kann man sie über die Zeit der Reprogrammierung mit einem Fluoreszenzmikroskop detektieren. Erste positiv reprogrammierende Zellen lassen sich bereits wenige Tage nach der Virusinfektion, größere Stammzellkolonien nach zehn Tagen identifizieren. Nach weiteren ein bis zwei Wochen weisen die Stammzellkolonien eine ideale Größe auf, sind nicht mehr auf Ammenzellen angewiesen sind und können auf ein Matrigel-basiertes Kultursystem transferriert werden (Abbildung 17). Dabei handelt es sich um eine speziell für Stammzellen entwickelte basalmembranartige Matrix, die auf das Absetzen, Anhaften und Wachsen von Stammzellen abgestimmt ist. Auch eine komplett Ammenzell-freie Reprogrammierung ist möglich, jedoch in unseren Händen für Keratinozyten deutlich zu ineffizient [173]. Die Gesamtdauer der Reprogrammierung mit etwa drei Wochen entspricht dem der aktuellen Publikationen [17, 174]. Die visuellen Beobachtungen während der Reprogrammierung konnten auch auf RNA Ebene verifiziert werden (Abbildungen 15). Die Expression der viralen Kassette nimmt über die gemessene Zeit zu den Stammzellen ab, während bei allen drei Pluripotenzen genen (*NANOG*, *OCT4* und *SOX2*) ein Anstieg bis zu den Stammzellen beobachtet werden kann (Abbildung 16). In den Stammzellen selbst lässt sich die virale Kassette nicht mehr auf RNA Ebene nachweisen, was bestätigt, dass die maximale endogene *OCT4* Expression in den reprogrammierten Keratinozyten erreicht ist und sie vollständig zu Stammzellen konvertiert wurden. Man kann deutlich erkennen, dass Stammzellen mit einer sehr frühen Passage (p4) im Vergleich zu einer späten Passage (p13) noch nicht die maximale Expression der Pluripotenzenfaktoren erreicht haben (Abbildung 16). Die Eigenschaft der Pluripotenz stabilisiert sich erst sehr spät im Prozess der Reprogrammierung und führt zur Unabhängigkeit der Zellen von den ektopischen Faktoren der lentiviralen Kassette [175-177]. Über die gesamte Zeit der Reprogrammierung muss eine konstante Überexpression mit allen vier OKSM Faktoren gewährleistet werden, da sonst induzierte Zellen ihre somatischen, stadien-spezifischen Marker wieder reaktivieren. Zudem können Zwischenstadien auftreten, die sich zwar kontinuierlich teilen, jedoch nicht pluripotent sind [178]. Dies konnte bei zu früh entfernter OKSM Induktion gezeigt werden [179].

Obwohl die Expression von *NANOG*, *OCT4* und *SOX2*, den Schlüsselgenen des Pluripotenzennetzwerks entscheidend für den Prozess der Reprogrammierung und der Generierung von iPSZ ist, reicht dies noch nicht aus, um zu beweisen, dass es sich um echte Stammzellen handelt und sie funktionell auch pluripotent sind. Zur Bestimmung der Pluripotenz wurde auf Protein und RNA Ebene die Pluripotenzenfaktoren *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* und die Oberflächenmarker *SSEA4*, *TRA-1-60* und *TRA-1-81* untersucht (Abbildungen 15,16,18). Die Immunologische Färbung der induzierten Stammzellkolonien bestätigen die Expression der gemessenen Pluripotenzenmarker. Zusätzlich können positive Färbungen für alle drei Oberflächenmarker detektiert werden. Mit einer ungerichteten Differenzierung in alle drei Keimblätter lässt sich eine weitere Eigenschaft der Stammzellen überprüfen. Über den

Differenzierungsschritt der embryonalen Körper (Embryoid Bodies – EBs), eine Struktur die vergleichbar ist mit der Prä-Gastrula der Embryonalentwicklung [180]. Hier entstehen nach wenigen Tagen die Keimblatt-Vorläufer und nach etwa drei Wochen reifere Zellen des Ektoderms, Mesoderms und Endoderms. Für die Proteindetektion wird TUBB3 für das Ektoderm, DESMIN für das Mesoderm und SOX17 für das Endoderm verwendet (Abbildung 20). Zellen, die zum Ektoderm gehören bilden unter anderem später Nervensystem, Haut, Cornea und die Linse des Auges [181]. Das Endoderm bildet die Linie des späteren Verdauungs- und Respirationstraktes [182] und aus den mesodermalen Zellen entwickeln sich später Muskel, Knochen, Blut und Bindegewebe [183]. Auf RNA Ebene kann in direktem Vergleich mit undifferenzierten Stammzellen eine Überexpression aller sechs gemessenen Gene (*AFP*, *FOXA2*, *MYH6*, *PAX6*, *T*, *TUBB3*) detektiert werden (Abbildung 19). Die Beobachtungen auf RNA und Proteinebene decken sich mit den verwendeten Markern und Zeitpunkten in anderen Publikationen [184-188]. Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung der iPSZ ist die Färbung durch das Enzym Alkalische Phosphatase. In undifferenzierten Stammzellen wird dieses Enzym in hohem Maße exprimiert und kann mittels einer Substratumsetzung detektiert werden. Findet eine solche makroskopisch detektierbare Umsetzung statt, so ist das Enzym aktiv und der Farbstoff lagert sich wie erwartet in den Kolonien ab (Abbildung 21) [189].

In der Routinezellkultur wird das sogenannte „FTDA“ Medium für die Ernährung der Stammzellen genutzt [21]. Dabei bewirken die Zusätze im Medium, dass die Pluripotenz und Selbsterneuerung der iPSZ auch über lange Passagen aufrecht erhalten bleibt. Das Grundnährmedium besteht aus DMEM/F-12 mit L-Glutamin Zusatz, eine hohe Konzentration an Glukose, Aminosäuren und Vitaminen. Es enthält keine Proteine, Lipide oder Wachstumsfaktoren, was eine gezielte Zugabe von Serum ermöglicht. Als Serum zu dem Grundmedium wird Humanes Serumalbumin (HSA) und chemisch definierte Lipide zugesetzt. Mit HSA als Serumersatz bilden sich im Gegensatz zu Bovinem Serum Albumin oder anderen Albuminen größere und robustere Stammzellkolonien. Mit den Lipiden ist die Ausbeute an kompakten und großen Kolonien größer. Zu dem Nährmedium wird ITS zugegeben, ein vorgefertigter Mix aus Insulin, Transferrin und Selenit. Hierbei ist vor allem das Insulin für das Überleben der Zellen erforderlich. ActivinA wirkt zusammen mit FGF2 und TGF β und erhöht die *NANOG* Expression. Bei FGF2 handelt es sich um einen entscheidenden Faktor zur Selbsterneuerung in humanen pluripotenten Stammzellen und verbessert die Proliferation der iPSZ. Das small molecule Dorsomorphin inhibiert den BMP-Signalweg, wodurch die für Stammzellen typische spontane Differenzierung, insbesondere zu Mesoderm, unterdrückt wird und verhindert dadurch die extraembryonale Differenzierung in der Mitte der Stammzellkolonien [21].

4.1.2. Keratinozyten als primäre Zelllinie

Das Ausgangsmaterial für die Generierung von Stammzellen und der späteren olfaktorischen Differenzierung sind humane Haarwurzeln. Die Gewinnung der primären Keratinozyten aus den Haarwurzeln gelingt nur, wenn eine sichtbare äußere Wurzelscheide vorhanden ist [190]. Sobald die ersten Keratinozyten auswachsen, was teilweise bereits nach 24 Stunden zu beobachten ist, werden die Zellen auf ein spezielles Calciumfreies Kulturmedium überführt. Der große Vorteil dieses Mediums zeigt sich darin, dass es ausschließlich auf die Bedürfnisse von Keratinozyten ausgelegt ist und sie unter diesen Kulturbedingungen überleben können. Nach der lentiviralen Infektion wird auf ein Calciumhaltiges Medium gewechselt. Unter diesen geänderten Kulturbedingungen sterben die nicht erfolgreich infizierten Keratinozyten ab und nur die reprogrammierenden Zellen finden in dem Medium optimale Kulturbedingungen [191]. Dadurch, dass Kopfhaare sehr leicht zugänglich sind und die Entnahme schnell und einfach erfolgt, konnten von drei freiwilligen Spendern jeweils zehn Haarwurzeln ohne hohen Aufwand entnommen werden. Von allen drei Spendern sind erfolgreich Keratinozyten ausgewachsen und nach ungefähr zwei Wochen hatte sich eine ausreichend hohe

Zellzahl von etwa 500.000 Keratinozyten gebildet. Auch die anschließende Reprogrammierung aller drei primären Zelllinien ist erfolgreich verlaufen (Abbildung 14).

4.1.3. *iPSZ als Basis für die olfaktorische Differenzierung*

Induzierte Stammzellen dienen aus Ausgangsmaterial für die weitere olfaktorische Differenzierung. Dazu wurde die Grundexpression von olfaktorischen Markern in Stammzellen auf Protein und RNA Ebene getestet. Dies ermöglicht in den folgenden Differenzierungsschritten eine Aussage darüber zu treffen, ob sich die Expression dieser Gene im Vergleich zu den Stammzellen verändert hat. Zudem gibt es aktuell keine Publikationen mit immunologischen Färbungen von iPSZ mit olfaktorischen Markern. Ausschließlich *SOX2* zeigt im Vergleich zu den anderen gemessenen Genen (*ASCL1*, *ATF5*, *CALB2*, *GOLF*, *NGN1*, *OMP* und *TUBB3*) eine deutliche Expression in den iPSZ. Dies war zu erwarten, da es sich hierbei um einen Pluripotenzmarker handelt, der von Stammzellen exprimiert wird. Die geringsten Expressionen weisen die Marker für reife Rezeptorneurone auf, die nach bisherigen Publikationen sehr spezifisch für das olfaktorische System sind. Auf immunologischer Ebene konnte nur eine positive Reaktion für *SOX2* detektiert werden (Abbildung 45). Die andere sieben gemessene Gene sind auch in der Färbung eindeutig negativ. Zusätzlich zu den auf RNA Ebene analysierten Markern wurden Färbungen gegen *NCAM1*, *RPSA* und *PAX6* durchgeführt. Auch diese Proteine werden nicht von Stammzellen gebildet. Alle getesteten olfaktorischen Marker für frühe und späte Vorläufer und reife ORN werden sowohl auf RNA, als auch auf Protein Ebene nicht, oder zumindest nicht auf detektierbarem Level exprimiert.

4.1.4. *Zusammenfassung iPSZ als Basis für die Differenzierung*

Als Ausgangspunkt oder Basis für die Generierung eines neuen Differenzierungsprotokolls für das olfaktorische System wurden induzierte Stammzellen ausgewählt, die zuvor aus einer primären Zelllinie generiert wurden. Die erzielten Ergebnisse im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten zeigen, dass

- **die Entnahme von humanen Haarwurzeln einfach und komplikationsfrei ist**
- **die Gewinnung von Keratinozyten aus Haarwurzeln unter definierten Kulturbedingungen erfolgt und etabliert ist**
- **sich primäre Keratinozyten für die weitere Reprogrammierung eignen**

Mit der erfolgreichen Reprogrammierung von Keratinozyten zeigten die weiteren Ergebnisse, dass

- **es sich bei den generierten Zellen auch um echte Stammzellen handelt**
 - **die iPSZ keine Expression von olfaktorischen Markern aufweisen**
- ➔ **sich iPSZ als Basis für die weitere olfaktorische Differenzierung eignen**

4.2. Das gerichtete, olfaktorische Differenzierungsprotokoll

4.2.1 Verbesserungen, die das ungerichtete zu einem gerichteten Protokoll machen

In vitro Differenzierungsprotokolle werden herangezogen, um beispielsweise die humane embryonale Entwicklung artifiziell *in vitro* nachvollziehen zu können oder genetische Erkrankungen zu modellieren. Allgemein basieren solche Protokolle auf der Grundlage von gezieltem An- und Abschalten von verschiedenen Signalwegen während der Zeit der Differenzierung, meist auf Grundlage der Signalwege, die auch in der Embryonalentwicklung aktiv sind. Dies wird durch die Zugabe von kleinen Molekülen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen gesteuert. Die Basis für die Entwicklung des olfaktorischen Differenzierungsprotokolls bildete ein ungerichtetes, neuro-ektodermales Protokoll [30]. Ungerichtet ektodermal bedeutet im Kontext dieser Doktorarbeit, dass zu definierten Stadien der Differenzierung Zytokine zugegeben werden, die die Ausbildung und Reifung von Neuronen fördert. Der Begriff neuro-ektodermal soll in diesem Zusammenhang Neuronen definieren, die sich aus dem neuronalen Ektoderm, dem Neuralrohr entwickeln. Es wird nicht näher auf die weiteren ektodermalen Derivate, wie Haut, Nebennierenmark, Oberflächenektoderm und weitere eingegangen [181]. Durch den Differenzierungsprozess werden generell alle neuronalen und neuronalen Zelltypen, wie Astrozyten, Gliazellen und Neurone bei der Entwicklung und Reifung unterstützt. Es entsteht eine gemischte Population von unterschiedlichen Neuronentypen, unter anderem Motoneurone, dopaminerge Neurone oder GABAerge Neurone [192].

Im Hinblick auf die Entstehung von neuronalen und neuronalen Subtypen im olfaktorischen Protokoll wurde auf immunologischer Ebene überprüft, zu welchen Zelltypen die Stammzellen differenzieren (Abbildung 52). Neben Astrozyten und Neuronen konnten Oligodendrozyten in der neuronalen Mischkultur detektiert werden. Die Generierung wird durch die Kultivierung auf Laminin in einem Medium mit den Zusätzen von FGF2 und EGF zu den Neurosphären ermöglicht [193]. Den prozentual größten Anteil davon machen die TUBB3 positiven Neurone aus. Um festzustellen, welche neuronalen Subtypen im olfaktorischen Differenzierungsprotokoll entstehen, wurde die Kultur genauer analysiert. Einen großen Anteil machen dabei SMI positive Motoneurone aus. Zudem konnte ein kleiner Anteil an Glutamatergen Neuronen und Acetylcholinergen Neuronen gefunden werden. Zur spezifischen Detektion von dopaminergen Neuronen wird Tyrosin Hydroxylase als Marker verwendet. Zur Detektion von cholinergen Neuronen des ZNS und des PNS wird meistens CHAT verwendet. GABA ist ein Marker für reife Neurone und kommt in GABAergen Interneuronen vor. Da diese neuronalen Zelltypen jedoch in dem hier durchgeführten Differenzierungsprotokoll nicht durch eine gezielte Zugabe von Wachstumsfaktoren in ihrer Entwicklung und Ausreifung gefördert wurden, entstanden sie auch nur zu einem sehr geringen Anteil. Für eine höhere Ausbeute beispielsweise an Motoneuronen, die bis zu siebenzig Prozent erreichen kann, kann Compound-C, ein chemischer Inhibitor des ActivinA und BMP Signalweges in einem sehr frühen Differenzierungsstadium zugegeben werden. Der Wechsel zu SHH- und Retinsäure-haltigem Kulturmedium zusammen mit neurotrophen Faktoren, wie cAMP, IGF1 und GDNF nach sechs Tagen bewirkt eine Ausdifferenzierung und Reifung der neuronalen Progenitoren zu Motoneuronen [194]. Für die gezielte Differenzierung in andere neuronale Linien, wie beispielsweise dopaminerge Neurone wäre der Zusatz von SB431542, Purmorphamin, CHIR99021, FGF8 und Dorsomorphin wichtig, wodurch der SMAD Signalweg inhibiert wird. Um GABAerge Neurone zu bekommen ist der Zusatz eines Agonisten für Muskarinerge- und GluR1-Rezeptoren notwendig [193]. Für die olfaktorischen Rezeptorneurone, die durch ihre Immunreaktivität zu OMP auch in der neuronalen Mischkultur detektiert werden können, wurde ein solches Differenzierungsprotokoll entwickelt. Hierbei versuchte man, die olfaktorischen Signalwege während der Entwicklung mit Hilfe von bestimmten Faktoren zu induzieren oder zu hemmen.

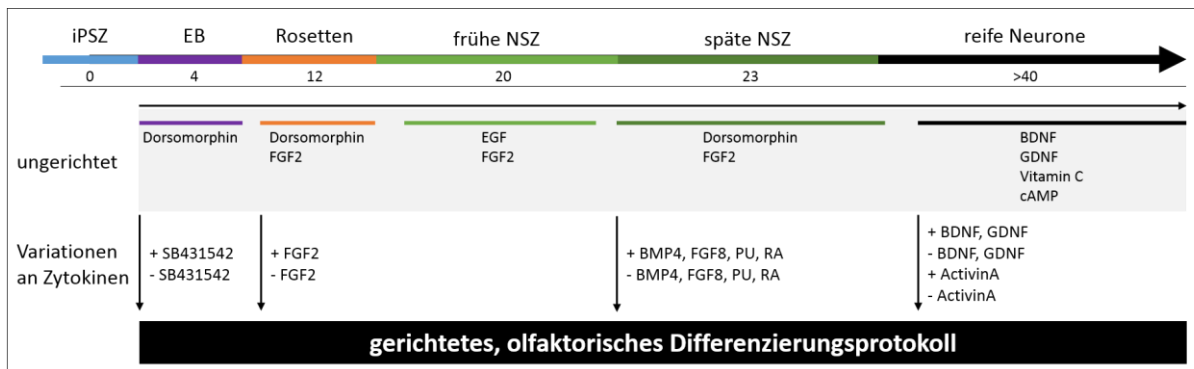


Abbildung 58: Neuronales Differenzierungsprotokoll

Ausgehend von einem ungerichteten Protokoll (mit grauem Kasten unterlegt) wurden in den unterschiedlichen Stadien des Differenzierungsprotokolls die Zugabe der Zytokine variiert. Das Ziel war es, durch diese Veränderungen in der Zusammensetzung der Wachstumsfaktoren, aus dem ungerichteten, neuro-ektodermalen Protokoll ein gerichtetes, olfaktorisches Differenzierungsprotokoll zu entwickeln.

Als Basis für die Entwicklung des Differenzierungsprotokolls wurde ein ungerichtetes, neuro-ektodermales Protokoll gewählt. In einem initialen Versuch wurde zunächst überprüft, ob sich dieses Protokoll generell für die weitere Differenzierung in die olfaktorische Richtung eignet. Dazu wurde auf RNA Ebene die Genexpression von *OMP*, ein spezifischer Marker für reife Rezeptorneurone, im ungerichteten Protokoll und einer humanen Biopsie des olfaktorischen Epithels gemessen (Abbildung 32). Wie erwartet zeigte sich bezogen auf die iPSZ die höchste Expression von *OMP* in der Biopsieprobe, da hier eine Vielzahl von reifen Rezeptorneuronen lokalisiert sind [195]. Auch in der Probe des ungerichteten Protokolls konnte bereits das *OMP* Gen detektiert werden, was dafürspricht, dass durch die gezielte Förderung der neuronalen Zelltypen auch *OMP* positive Zellen entstehen können. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde das ungerichtete neuro-ektodermale Differenzierungsprotokoll als gute Basis für die weiteren Schritte der Doktorarbeit bewertet. Für die Entwicklung des olfaktorischen Differenzierungsprotokolls ausgehend von diesem ungerichteten Protokoll wurden folgende Verbesserungen durchgeführt:

1. Pluripotenzzustand der iPSZ aufheben zum Start der Differenzierung

Pluripotente Stammzellen werden durch die Zugabe von kleinen Molekülen in dem Stammzellmedium in ihren Pluripotenzeigenschaften aufrechterhalten [21]. Zum Start einer Differenzierung müssen die Kulturbedingungen der Stammzellen insofern geändert werden, dass sie ihre Pluripotenz und ihre Kapazität zur Selbsterneuerung aufgeben müssen. Dorsomorphin wird in einer geringen Konzentration (50 nM) dem Stammzellmedium zugefügt und bewirkt dort zusammen mit den anderen Zusätzen die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und Selbsterneuerung und verhindert eine extraembryonale Differenzierung [196]. Die Zusätze ActivinA, FGF2 und TGF β führen zu einer hohen *NANOG* Expression und lassen dadurch die Pluripotenz aufrechterhalten [21]. Diese Faktoren werden im ersten Stadium der Differenzierung weggelassen, bzw. Dorsomorphin wird in einer höheren Konzentration (2 μ M) zugegeben [197]. Zusammen mit SB431542 bewirken die beiden Faktoren eine Induktion der neuronalen Differenzierung bereits im EB [198, 199].

2. Grundmedium

Generell wird serumfreies Medium verwendet, was eine Vergleichbarkeit der Differenzierungen untereinander ermöglicht, da jeder Zusatz chemisch genau definiert ist. Zur neuronalen Induktion wird dem Grundmedium durchgehend B-27 Supplement zugegeben [200]. Es enthält unter anderem Vitamine, Proteine, Antioxidantien und andere Komponente des Energiestoffwechsels, wie L-Carnithin, die Hormone Progesteron und Triiodthyronin, Putrescin und Natriumselenit [200]. Es dient

dem verbesserten Wachstum und der Viabilität von neuronalen Zellkulturen und unterstützt durch seine Zusammensetzung das Langzeitüberleben der Zellen [201]. Zusätzlich dazu wird durch den Hormonmix, besteht aus Insulin, Progesteron, Natriumselenit, Holotransferrin und Putrescin die gesamte Zellviabilität und Zellmetabolismus aufrechterhalten [202].

3. Zugabe von Dorsomorphin und SB43154

Dorsomorphin ist ein Antagonist des BMP Signalweges und wird bis zum Rosetten Stadium zugesetzt. In einer geringen Konzentration ist es im Stammzellmedium zu finden, zur Differenzierung wird es in einer vierzigfach höheren Konzentration (2 μ M) eingesetzt, was zur Induktion der neuronalen Differenzierung führt [28]. Zusätzlich zu Dorsomorphin wird SB43154 zugegeben. Bei SB43154 handelt es sich um einen selektiven und starken Inhibitor des TGF β /Activin/Nodal Signalweges. In der Differenzierung fördert es die Bildung von neuralen Progenitorzellen aus iPSZ [203]. Durch die Verwendung des TGF β Antagonisten wird der SMAD Signalweg inhibiert und führt damit zur Verbesserung und Beschleunigung der neuralen Differenzierung [204, 205]. Experimentell wurde die Zugabe von Dorsomorphin und SB43154 zum Differenzierungsprotokoll im Stadium der EBs und neuralen Rosetten untersucht. Hier zeigte sich, dass die Protokolle mit Zugabe von SB43154 eine deutlich höhere *OMP* Expression in zwei Wochen alten Neuronen im Vergleich zu den anderen gemessenen Protokollen hatten. Dieses Ergebnis konnte auch in drei Wochen alten Neuronen beobachtet werden (Abbildung 36).

4. Zugabe von FGF2 im Rosetten Stadium

Die Zugabe von *FGF2* im Rosetten Stadium bewirkt die gezielte Förderung von neuronalen Zelltypen. Neuronale Rosetten proliferieren in der Anwesenheit von FGF2 und differenzieren zu Vorläuferzellen, die neuronale Stammzell-Marker, wie *SOX1*, *SOX2* und *NESTIN* exprimieren [206]. Es wurde gezeigt, dass das Fehlen von *FGF2* in der Ausbildung von neuronalen Rosetten zu einer reduzierten Zellproliferation, einer reduzierten Anzahl von mitotisch aktiven Zellen und zu einer vorzeitigen Neurogenese führt [207]. Chen und Kollegen konnte zeigen, dass die FGF Familie, darunter FGF2 in der Lage ist, die Neurogenese von pluripotenten Stammzellen während der Serum-freien neuronalen Induktion zu fördern. Sie fanden heraus, dass die verbesserte Neurogenese durch FGF nicht durch die Förderung der proliferierenden *SOX1* positiven Zellen erfolgt, sondern durch die FGF-vermittelte Inaktivierung von JNK1 und ERK2 [208]. In der experimentellen Analyse, ob die Zugabe von FGF2 im Rosetten Stadium eine Erhöhung der *OMP* Ausbeute bewirkt, konnte eindeutig gezeigt werden, dass das cPM4E Medium mit FGF2 die besten Kulturbedingungen bietet. In zwei und drei Wochen alten Neuronen konnte hier die größte *OMP* Expression detektiert werden (Abbildung 36).

5. Zugabe von PU, RA, FGF8 und BMP4 im NSZ Stadium

Die neuronalen Stammzellen verbleiben für wenige Tage in einem Medium, dem FGF2 und EGF zugesetzt wird. Diese Zusätze im NSZ Stadium stimulieren die Proliferation und das Überleben der neuronalen Stammzellen. Für die spezifische Differenzierung in die olfaktorische Richtung wurde in den folgenden Tagen dem Kulturmedium BMP4, FGF8, Purmorphamin und Retinsäure zugegeben (Tabelle 17). Sonic Hedgehog (SHH) ist eins von drei Proteinen des Hedgehog Signalweges, bei dem es sich um einen Liganden mit Smoothed (SMO) als Rezeptor handelt. Purmorphamin ist ein kleines Molekül, das als Agonist für das Protein SMO entwickelt wurde und SHH *in vitro* ersetzen kann [209]. SHH ist ein wichtiger Bestandteil des Hedgehog Signalwegs, der beim Knochenwachstum, der Entwicklung des Gehirns, Wachstum der Gliedmaßen und vielen anderen Funktionen des Körpers beteiligt ist. Zudem kontrolliert es den Zellzyklus von adulten Stammzellen und scheint an der Bildung von einigen Krebsarten beteiligt zu sein [210]. In der sehr frühen Entwicklung des Organismus diffundiert SHH und bildet einen Konzentrationsgradienten, der je nach Konzentration unterschiedliche Einflüsse auf die

Zellen des sich entwickelnden Embryos hat [211]. Im Zusammenhang mit dem frühen olfaktorischen System ist SHH zusammen mit FGF8, BMP4 und Retinsäure bei der Definierung der Achsen im sich entwickelnden olfaktorischen Epithel und des olfaktorischen Nervs beteiligt [63]. *In vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass Retinsäure, FGF8, BMP4 und SHH zu verschiedenen Mesenchymalen-Epithelialen Signalen beitragen: Retinsäure gibt ein laterales Signal, BMP4 ein posteriores und FGF8 und SHH beide mediale Signale. Wenn das SHH-vermittelte Signal *in vitro* blockiert oder verstärkt wird, führt dies zur Beeinträchtigung von bestimmten Komponenten des olfaktorischen Signalwegs während der Differenzierung [63]. In einer anderen Studie wurde der Einfluss von SHH auf olfaktorische Axone, ihren axonalen Verzweigen und der Verschaltung der Axone in den Glomeruli näher analysiert. In primären Kulturen der sensorischen Neurone fördern SHH-Peptide die Verzweigung der olfaktorischen Axonen. Wird die Funktion von SHH *in vivo* durch dessen Antikörper neutralisiert, findet sich nahezu kein Wachstum der ORN Axonen zu den Glomeruli [212]. Folgende Ergebnisse wurden bei der Untersuchung von **Purmorphamin/SHH** im olfaktorischen System erzielt:

- **Es ist ein wichtiges Signal in der neuronalen Entwicklung**
- **Es definiert die Achsen in dem sich entwickelnden olfaktorischen Epithel**
- **Es reguliert den Eingang der Axone in die Glomeruli**
- **Es reguliert das axonale Verzweigen der ORN nachdem sie die Glomeruli erreicht haben**

Retinsäure (RA) ist ein Signalmolekül und gehört zu der Familie der Steroid/Tyroid Superfamilie und fördert *in vitro* die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu neuronalen Progenitorzellen bzw. neuronalen Stammzellen [213]. Bezüglich des olfaktorischen Systems reguliert es die Morphogenese, Differenzierung und die Regeneration verschiedener Zelltypen [213]. Finden in der frühen embryonalen Entwicklung fehlerhafte Retinsäure-vermittelte Signalkaskaden statt, so kann dies zu dramatischen Veränderungen in der olfaktorischen Entwicklung führen. Dies ist vermutlich auf die unterbrochene RA-vermittelte initiale Signalkaskade zurück zu führen, die die frühe Bildung des olfaktorischen Epithels beeinflusst. In der folgenden Entwicklung moduliert RA die Entstehung, das Wachstum und die Stabilität einer zellulären Subpopulation im olfaktorischen Epithel. Retinsäure-Rezeptoren, Cofaktoren und synthetische Enzyme werden im olfaktorischen Epithel, im Bulbus Olfactorius und in der Subventrikulären Zone gebildet. Ein Mangel an Vitamin A, der metabolische Vorläufer von Retinsäure führt zu zytologischen Veränderungen in dem olfaktorischen Epithel und zu sensorischen Defiziten im olfaktorischen System. Eine Therapie mit Vitamin A konnte in Versuchstieren mit einer Schädigung des olfaktorischen Systems diesen dramatischen Phänotyp wieder aufheben und die funktionelle Wiederherstellung beschleunigen [64]. Retinsäure-vermittelte pathologische Effekte und ihre potentielle therapeutische Wirkung können die endogene Retinsäure-Regulation der neuronalen Differenzierung, Stabilität oder Regeneration in den olfaktorischen Signalwegen von der Embryogenese bis zum Erwachsenenalter widerspiegeln [64]. Die Forschergruppe um Theus fand heraus, dass *in vitro* generierte Neurone aus Stammzellen nach Retinsäure-Induktion ein signifikant verstärktes Neuritenwachstum zeigten. Dieses Ereignis ist mit der Expression der SRC Kinase verbunden, die sich ausgehend vom Zellkörper bis zu den Neuriten ausbreitet [214]. Es wird vermutet, dass der Retinsäure Signalweg bei der Ausbildung von Neuronen über diese Proteinkinase läuft, da unter Zugabe des SRC Kinase Inhibitors PP2 keine Expression von Neurofilamenten und keine funktionellen exzitatorischen Synapsen gebildet wurden. In einer weiteren Publikation wurde gezeigt, dass die Retinsäure-induzierte neurale Differenzierung von pluripotenten Stammzellen eine anhaltende Exposition von Retinsäure benötigt. Zusätzlich braucht es zelluläre Interaktionen, die durch eine hohe Zelldichte erreicht werden können. Diese Faktoren zusammen sind für die Zunahme der Expression von verschiedenen neuronalen Genen, wie *NEUROD1*, *PAX6* und *SOX2* und der Entwicklung einer neuronalen Morphologie der Zellen erforderlich [213]. Die Arbeitsgruppe um Paschaki konnte in

zwei Modellorganismen (Maus und Huhn) zeigen, dass der Retinsäure-Signalweg, obwohl er für die Initiation der olfaktorischen Plakode entbehrlich ist, eine wichtige Rolle in der Neurogenese innerhalb des Neuroepithels spielt. Der Verlust von Retinsäure im olfaktorischen Epithel führt zur Instabilität der Progenitoren und folglich zu einer nicht anhaltenden Differenzierung der Neurone. Im Gebrauch eines Explant-Systems konnten sie zudem zeigen, dass die Erneuerung der olfaktorischen Neurone gehemmt ist, falls das olfaktorische Epithel nicht in der Lage ist, Retinsäure zu produzieren. Zusammenfassend lässt sich zur Funktion von **Retinsäure** im olfaktorischen System sagen:

- **Es ist nicht notwendig für die Initiation der olfaktorischen Plakode**
- **Es kontrolliert die Proliferation der Progenitoren und die direkten Vorläufer der ORN**
- **Die Aktivität von RA in dem olfaktorischen Epithel ist abhängig von dem Enzym RALDH3**
- **Es ist notwendig für die Aufrechterhaltung der olfaktorischen Neurogenese**

Fibroblasten Wachstumsfaktoren fördern die Proliferation, Differenzierung und das Überleben der meisten neuronalen Zelltypen während der Entwicklung. FGF8 induziert die frühe neurale Induktion und löst die Differenzierung aus, die von der ständigen Selbsterneuerung der neuronalen Zellen begleitet wird [215]. Die *FGF8* Expression ist dabei für die Neurogenese im olfaktorischen Epithel essentiell. Bereits während der Einwanderung der olfaktorischen Plakoden bei der Bildung der Nasengruben wird FGF8 im Bereich der olfaktorischen Neurogenese exprimiert. Aus diesen Beobachtungen konnte gefolgert werden, dass die *FGF8* Expression für die Morphogenese der Nasenhöhle, für das Überleben und der darauffolgenden Expansion der Stammzell-Populationen notwendig ist [151]. Der homozygote Verlust von *Fgf8* führt zu einem Fehlen von mesodermalen und endodermalen Strukturen und zu embryonaler Letalität noch vor dem E9.5 Stadium in Mäusen [216]. Auf Grund dieses schwerwiegenden Phänotyps kann man den Verlust von *Fgf8* nur in konditionalen Knockout Modellen beispielsweise unter einem *Foxg1* Promotor verfolgen. Bei diesen Tieren ist das olfaktorische Epithel stark verkleinert oder gar nicht vorhanden und die Nasenhöhle ist schwer deformiert. Die Markergene der olfaktorischen Plakode *Dlx5*, *Foxg1* und *Pax6* sind im Stadium E9.5 weitgehend unverändert. Die Größe der olfaktorischen Plakode ist jedoch geringer, was auf die verringerte Proliferation zu diesem Stadium zurück zu führen ist. Zudem findet im weiteren Verlauf der Entwicklung eine verstärkte Apoptose statt [151]. Die Beobachtungen der *Fgf8*-Mutanten lassen den Schluss zu, dass *Fgf8* am Rand der olfaktorischen Plakode für die Entwicklung der Nasenhöhle und des olfaktorischen Epithels benötigt wird. Die frühen neuronalen Zellen tragen dabei zwar zur Ausbildung des olfaktorischen Epithels bei, können aber nicht in ihrer Zahl zunehmen. Es kommt dadurch zu dramatischen Fehlverteilungen von olfaktorisch-relevanten Genen, die die Achsen und Grenzen des sich entwickelnden olfaktorischen Systems begrenzen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass neuronale Marker, wie *Ascl1*, *Ngn1* und *Neurod*, sowie *Ncam1* und *Tubb3* in ihrer Expression reduziert sind. Zusätzlich zeigt sich, dass *Fgf8* verantwortlich für die Bildung und das Überleben von neuronalen Stammzellen ist, die zu allen Zelltypen der olfaktorischen Linie werden. Die Folgen von Entwicklungsdefekten des olfaktorischen Systems nach Reduktion der **FGF8** Expression sind:

- **Ein progressives Sterben der basalen olfaktorischen Stammzellen [151]**
- **Weniger Stammzellen, die in die olfaktorische Differenzierung einsteigen [217]**
- **Veränderungen in der genetischen Identität und Verlust von olfaktorischen Vorläufern [218]**

In einem ganz anderen Kontext wird FGF8 mit der humanen, kongenitalen Form der Anosmie in Verbindung gebracht. Das Kallmann Syndrom umfasst die Syndrome des Hypogonadotropismus zusammen mit der Beeinträchtigung oder dem kompletten Fehlen des Geruchssinns. Mutationen im *FGF8* Gen können zu dieser schwerwiegenden Form der Anosmie führt [219].

Es wird vermutet, dass BMP4 und FGF8 in der frühen Entwicklung des olfaktorischen Systems bei der Ausbildung des epithelialen und neuronalen Zell-Determinierung gegensätzliche Rollen spielen. FGF8

ist an der Spezifizierung der olfaktorischen Neurone und in der Kontrolle des Überlebens der olfaktorischen Stammzellen beteiligt [220]. ORN stammen von heterogenen Populationen der olfaktorischen Grube ab. FGF8 und BMP4/TGF β -Antagonisten sind bei der Induktion des neuronalen Zellschicksals beteiligt, jedoch ist ihre genaue Rolle noch nicht vollständig geklärt. BMP Signale fördern den respiratorisch/ epithelialen Charakter, während FGF Signale für die Generation von sensorischen/epithelialen Zellen benötigt werden. Jedoch können olfaktorische Plakoden-Zellen zwischen den Schicksalen für sensorische und respiratorisch/epithelial je nach Antwort auf die FGF und BMP Aktivität wechseln. Experimentelle Analysen liefern den Beweis, dass FGFs die Fähigkeit von BMPs, das respiratorische Zellschicksal im olfaktorischen Epithel einzuführen, einschränken und unterdrücken können. In Maus- und Huhn-Modellen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von BMP oder FGF Aktivität in einer fehlerhaften Einwanderung der Plakoden resultiert [217]. BMP4 ist im Zusammenhang mit dem olfaktorischen System bei der Ausbildung der olfaktorischen Plakode beteiligt [60, 221]. Da die Funktion von BMP4 in der Entwicklung kontrovers diskutiert wird, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem der Zeitpunkt der BMP4 Zugabe getestet wurde (Abbildung 33,34; Tabelle 16). Die Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von BMP4 in einem frühen Stadium der Differenzierung eine höhere *OMP* Expression in den gemessenen Neuronen bewirkt. Bei zwei der getesteten Medien mit BMP4 Zugabe nur im Rosetten Stadium (Medium 4) oder im Rosetten und NSZ Stadium (Medium 2) konnten die höchsten Werte von *OMP* und *TUBB3* detektiert werden. Weniger gute Expressionswerte ließen sich in dem Medium beobachten, dem kein BMP4 zugesetzt wurde. Die Wichtigkeit von **BMP4** im Zusammenhang mit dem olfaktorischen System zeigt sich dadurch, dass

- **BMP4 bei der Bildung der olfaktorischen Plakode beteiligt ist**
- **BMP4 definiert die Achsen in dem sich entwickelnden olfaktorischen Epithel**

Aus der Literatur sind vier Faktoren für die exakte Entwicklung der olfaktorischen Plakoden in der frühen Embryonal-Entwicklung und die adulte Neurogenese des olfaktorischen Epithels von Bedeutung: SHH, Retinsäure, FGF8 und BMP4. In einem weiteren Mediumtest wurde überprüft, zu welchem Zeitpunkt die Zugabe dieser vier olfaktorisch relevanten Zytokine am besten ist (Abbildung 35). Hierbei konnte experimentell belegt werden, dass wie erwartet das NSZ Stadium optimal ist und die größte *OMP* Ausbeute in zwei und drei Wochen alten Neuronen im cPM4E Medium gemessen werden konnte. Zwar waren die Werte für das Medium aufgrund der großen Varianz in den differenzierten Zellen nicht signifikant, aber zusammen mit der morphologischen Beurteilung (Abbildung 37) der sechs getesteten Medien wurde diese Kulturbedingungen für die gezielte Differenzierung von ORN ausgewählt. Wir vermuten, dass durch die gezielte Differenzierung sich im NSZ Stadium neurale Stammzellen mit olfaktorischem Genprofil gebildet haben und durch die weitere Zugabe von Wachstumsfaktoren Signalwege des olfaktorischen Neurogenese induziert werden.

6. Zugabe von ActivinA

ActivinA ist ein Mitglied der TGF β -Familie, die bei der Regulation von verschiedenen biologischen Prozessen, wie der Zelldifferenzierung und Proliferation eine wichtige Rolle spielen [222, 223]. ActivinA aktiviert die gleichen Signalwege wie TGF β , nur über andere Rezeptoren. Die ActivinA Signalkaskade verläuft nach Bindung an die Typ II Rezeptoren über die Aktivierung von SMAD Molekülen. Die SMAD Moleküle wandern in den Zellkern und vermitteln dort die Transkription von einer Vielzahl von Genen. Neben der Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften durch die SMAD-aktivierte Transkription von Pluripotenzgenen, wie *OCT4* oder *NANOG*, inhibiert ActivinA auch das Zellwachstums und die Proliferation und aktiviert die Zelldifferenzierung über verschiedene Signalwege [205]. Im Zusammenhang mit dem olfaktorischen System spielt ActivinA eine Rolle bei der Differenzierung der Vorläuferzellen zu reifen sensorischen Neuronen [153]. In fünf verschiedenen Ansätzen wurde überprüft, ob ActivinA auch in der *in vitro* Differenzierung gezielte Proliferation von

olfaktorischen Vorläufern zu reifen sensorischen Neuronen fördern kann und damit die Anzahl der *OMP* positiven Zellen in zwei und drei Wochen alten Neuronen erhöhen kann (Abbildung 36, Tabelle 17). Im Vergleich zum ungerichteten Protokoll, das keinen Zusatz von ActivinA erhält, zeigen drei von fünf Protokollen (Medium2, cPMoMN, cPM4E) eine erhöhte *OMP* Expression in zwei und drei Wochen alten Neuronen (Abbildung 36). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Beobachtungen in den Versuchen des olfaktorischen Epithels von Nagern auch auf das humane *in vitro* Differenzierungsprotokoll übertragen werden können und diese auch zu einer erhöhten Expression des Markers für reife sensorische Neurone führt.

Neben den hier beschriebenen Veränderungen in den Zusätzen im gerichteten zum ungerichteten Protokoll bleiben manche Zytokine in beiden Protokollen erhalten (Abbildung 60). Dazu zählen cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) und GDNF (Glial cell-derived neurotrophic factor). Im olfaktorischen System findet die Neurogenese und die Synapsenbildung nicht nur während der Entwicklung des olfaktorischen Systems, sondern auch während des gesamten Lebens statt und vermutlich spielen auch hier diese Wachstumsfaktoren eine signifikante Rolle. cAMP ist ein Second Messenger, der bei intrazellulären Signalkaskaden involviert ist und dabei Proteinkinasen aktiviert. Im Zusammenhang mit der Differenzierung wird es von neuronalen Vorläufern gebildet und stimuliert die Proliferation und das Überleben von Neuronen [224, 225]. Das Neuronale Medium enthält zusätzlich zu cAMP noch die neurotrophen Faktoren BDNF und GDNF. Neuronale Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und der Aufrechterhaltung des Nervensystems. BDNF wird von reifen Neuronen ausgeschüttet und fördert damit das Überleben der anderen Zellen im Epithel [226]. BDNF konnte in dem olfaktorischen Epithel von Ratten auch in Horizontalen Basalzellen detektiert werden. Es wird vermutet, dass die noch unreifen Neurone in ihrer Differenzierung unterstützt werden. GDNF konnte dagegen in reifen ORN und in den synaptischen Verschaltungen im Bulbus Olfactorius gefunden werden. Das passt zu der Vorstellung, dass dieser Wachstumsfaktor so lange von den reifen ORN produziert wird, bis sich die synaptischen Kontakte zu den sekundären Neuronen im Bulbus Olfactorius gebildet haben [227]. Es wurden Experimente durchgeführt, die den Einfluss der beiden neurotrophen Faktoren auf die Differenzierung aufklären sollten (Tabelle 17). Es ließen sich morphologische Unterschiede zwischen den sechs getesteten Protokollen sowohl bei der Bildung der neuralen Stammzellen, als auch bei der Bildung der Neurone erkennen (Abbildung 37). Es zeigte sich, dass das Weglassen von BDNF und GDNF die Ausbildung von Neuronen unterbindet und es zu keiner Ausbildung von langen, verzweigten Axonen und Dendriten kommt. Aufgrund dieser Beobachtungen und der Ergebnisse der Versuche bei denen anderen Medien-Zusammensetzungen getestet wurden, konnten bereits einige der insgesamt sechs analysierten Protokolle verworfen werden. Es stellte sich heraus, dass die Zellen in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien zu den ORN unter den Kulturbedingungen cPM4E und ungerichtet morphologisch am besten aussahen. Auch auf RNA Ebene konnte dies bestätigt werden. Beide Medien, die keinen Zusatz von BDNF und GDNF hatten, zeigten sowohl bei zwei und drei Wochen alten Neuronen die geringste *TUBB3* Expression (Abbildung 36). *TUBB3* ist ein bewährter Marker der konstitutiv in neuralem Gewebe exprimiert wird. Ergänzend zu den makroskopischen Beurteilungen zeigte sich auch bei der Analyse der *OMP* Expression das Medium **cPM4E** als am besten geeignet.

4.2.2. Das gerichtete ist Protokoll effizienter als das ungerichtete

Bereits in der Entwicklungsphase des gerichteten olfaktorischen Protokolls zeichnete sich das cPM4E Protokoll gegenüber den anderen Differenzierungsprotokollen ab. Zum einen durch die Morphologie der neuralen Stammzellen und der 14 und 21 Tage alten Neurone (Abbildung 36, 37). Bereits nach dieser Differenzierungszeit zeigen sich wie erwartet die typischen axonalen Auswüchse und

dendritischen Verzweigungen aus den Neurosphären [193]. Im direkten Vergleich zwischen dem ungerichteten, neuro-ektodermalen und dem gerichteten cPM4E Protokoll wurden olfaktorisch relevante Gene in einer detaillierten Verlaufsanalyse genauer charakterisiert (Abbildungen 38- 41). In Bezug auf die Grundexpression in den Stammzellen wurden diese Gene in den Differenzierungsstadien der EBs, neuralen Rosetten, sowie zwei und drei Wochen alten Neuronen analysiert. Durchgehend in allen Versuchen zeigte sich dabei auf RNA Ebene, dass wie erwartet im neuralen Rosetten Stadium die Gene die für die frühe olfaktorische Entwicklung und die Marker für olfaktorische Vorläufer (*FOXP1*, *NGN1*, *RPSA*, *SOX2*) exprimiert sind. Zudem ist auch eine eindeutig höhere Expression dieser Gene in dem gerichteten Protokoll gegenüber dem ungerichteten zu beobachten (Abbildung 38). Dieses Ergebnis zieht sich auch in den Analysen der zwei Wochen alten Neurone weiter. Hier liegt der Fokus auf Markergene für späte Vorläufer und sensorische Rezeptorneurone (*ADCY3*, *GAP43*, *GOLF*, *OMP*, *UCHL1*, *TUBB3*) (Abbildung 39). Alle Gene zeigen in dem gerichteten Protokoll eine höhere Expression verglichen mit dem ungerichteten. Dies bestätigt, dass im direkten Vergleich zwischen den beiden Protokollen in Bezug auf olfaktorisch beschriebene Gene im gerichteten Protokoll eine höhere Expression detektiert werden kann. In einer noch größeren Studie wurden weitere Markergene in einem Verlaufsdiagramm dargestellt (Abbildungen 40, 41). Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der beiden Protokolle in fünf Stadien der Differenzierung. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Verlaufsdiagramme, dass zum einen die Expression vieler Gene, unabhängig vom Protokoll, zum späteren Zeitpunkt der Differenzierung ansteigt. Dies ist unter anderem auf die Proliferation der Zellen während der Differenzierung zurückzuführen. Während im Stadium der EBs nur wenige hundert bis tausend Zellen einen solchen EB bilden, finden sich in drei Wochen alten Neuronen etwa 100.000 Zellen in der Kulturschale. Zum anderen lässt sich gut anhand der Grafiken beurteilen, dass der Kurvenverlauf des gerichteten Protokolls eine höhere Expression der untersuchten Gene in nahezu allen Stadien der Differenzierung zeigt. Dies bestätigt zusätzlich die vorangegangenen Ergebnisse dahingehend, dass das gerichtete cPM4E Protokoll effizienter ist als das ungerichtete.

4.2.3. Zusammenfassung: Das gerichtete, olfaktorische Differenzierungsprotokoll

Die Ergebnisse der Verbesserungen des ungerichteten, neuro-ektodermalen Protokoll zu dem gerichteten, olfaktorischen Differenzierungsprotokoll zeigen, dass

- **durch das neuronales Grundmedium und dem Zusatz von Dorsomorphin und SB43154 die neurale Differenzierung gestartet wird**
- **die Zugabe von FGF2 im neuralen Rosetten Stadium die *OMP* Expression signifikant erhöht**
- **cAMP, BDNF und GDNF für die Ausbildung von neuronalen Strukturen essentiell ist**
- **die gezielte Zugabe von PU, RA, FGF8 und BMP4 im NSZ Stadium die *OMP* Expression signifikant erhöht**
- **die Zugabe von ActivinA im Neuronen Stadium die *OMP* Expression signifikant erhöht**

➔ **das gerichtet, olfaktorische Protokoll effizienter ist**

4.3. Verlaufsanalysen in der gerichteten Differenzierung

4.3.1. *Spiegelt das Differenzierungsprotokoll die frühe olfaktorische Entwicklung wieder?*

In den vorangehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass das ungerichtete, neuro-ektodermale Differenzierungsprotokoll als Basis für die weitere Etablierung eines gerichteten, olfaktorischen Protokolls geeignet ist. Auf RNA Ebene konnte bei dem gerichteten cPM4E Protokoll in zwei und drei Wochen alten Neuronen die höchste *OMP* Expression detektiert werden, zudem zeigten diese Zellen eine charakteristische neuronale Morphologie.

In den folgenden Experimenten sollte nun überprüft werden, ob RNA Signaturen der olfaktorischen Entwicklung *in vivo* in den frühen Stadien der *in vitro* Differenzierung zu finden sind. Olfaktorische Neurone entstehen nicht aus dem Neuralrohr wie andere ZNS Neurone, sondern aus der Präplakodalen Region (PPR), ein Bereich, der sich parallel zum Neuralrohr entwickelt [228]. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich neben der PPR und dem Neuralrohr die Neuralleiste und das Oberflächenektoderm durch spezifische Marker voneinander unterscheiden [229]. Die Marker für die unterschiedlichen Entwicklungsbereiche während der späten Neuralplatte, frühen und späten Neurogenese wurden auf Expressionsebene in dem Protokoll genauer analysiert (Abbildungen 22, 28, 30). Erwartet wurde die höchste Expression dieser Markergene zum Zeitpunkt der neuralen Rosetten, da diese dem embryonalen Neuralrohr entsprechen und alle Zelltypen zu diesem Zeitpunkt auch in der Differenzierung vertreten sein sollten [161]. Auf Grund der embryonalen Entwicklung des olfaktorischen Systems sind die PPR Marker von großer Bedeutung für die Entwicklung des Differenzierungsprotokolls. Als Marker für die Präplakodale Region sind viele Gene publiziert worden (Tabelle 18), wobei *EYA1/2* und *SIX1/4* am besten untersucht sind und am häufigsten für solche Fragestellungen herangezogen werden [35, 41, 228]. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen lassen die Vermutung zu, dass sich die Zellen der neuralen Rosetten voneinander in ihrer Proteinexpression unterscheiden und diese sich in unterschiedlichen Bereichen anordnen. Bei den ringförmigen Gebilden, die aus den ausplattierten EBs auswachsen, handelt es sich um Zellen, die neuro-ektodermale Marker exprimieren und aus denen in der weiteren Entwicklung Neurone des ZNS hervorgehen können. Die Zellen, die positiv sind für Neuralleisten Marker, PPR Marker und Marker für das Oberflächenektoderm sind in einem Ring um die einzelnen Rosetten und in einem Ring um das gesamte Rosettengebilde herum locker angeordnet (Abbildung 59). Auf Protein Ebene wurde diese Hypothese für die PPR Marker (*EYA1/2*, *SIX1/4*) überprüft und es konnte eine eindeutig positive Färbung von *SIX1* am Rand der Rosetten beobachtet werden (Abbildung 24). Dies deckt sich mit den RNA Ergebnissen von *SIX1*, dessen Expression im Vergleich zu Stammzellen an zwei gemessenen Zeitpunkten (Tag 8 und 12) während des Rosetten Stadiums signifikant ansteigt. Für das Gen *EYA1* konnte dies ebenfalls auf RNA Ebene bestätigt werden, auch hier zeigt sich ein hoch signifikanter Anstieg des Gens über den Zeitraum der neuralen Rosetten (Abbildung 26). Die Genexpressionswerte von *SIX4* und *EYA2* sind gegensätzlich zu den zwei vorherigen, da diese entweder signifikant reduziert werden (*SIX4*) oder kein Unterschied zum Grundlevel in pluripotenten Stammzellen (*EYA2*) detektiert werden kann. Auf Proteinebene gibt es unter den vier analysierten PPR Markern nur eine eindeutig positive Färbung für *SIX1*. Aufgrund der Erstbeschreibung der Detektion von PPR Markern in neuralen Rosetten kann nur spekuliert werden, ob die anderen Proteine im Stadium der Rosetten noch nicht gebildet werden, oder ob es sich um ein technisches Problem mit dem Primärantikörper handelt. Aus fortführenden Versuchen zu olfaktorischen Organoiden kann jedoch definitiv gesagt werden, dass die *SIX1/SIX4* und *EYA1* Antikörper PPR positive Zellen in einem frühen Differenzierungsstadium von olfaktorischen Organoiden unter adhärennten Kulturbedingungen detektieren, wodurch ein technisches Problem ausgeschlossen werden kann. Bei *EYA2* kann es vermutlich an dem zu früh oder zu spät gewählten Zeitpunkt liegen in dem die Rosetten analysiert und gefärbt wurden. Bei beiden Genen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die bei einer starken Expression im Zellkern detektiert werden sollten. In weiterführenden Versuchen wurde beobachtet, dass in einem frühen

Differenzierungsschritt die Proteine im Zytoplasma zu finden sind und sie erst später, bei Voranschreiten der Differenzierung in Richtung PPR, in den Kern wandern. Diese Beobachtungen werden durch publizierten Daten unterstützt die zeigen, dass EYA2 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert ist. Die SIX Proteine transportieren aktiv die EYA Proteine in den Nukleus für eine SIX/EYA vermittelte transkriptionale Aktivierung [230, 231].

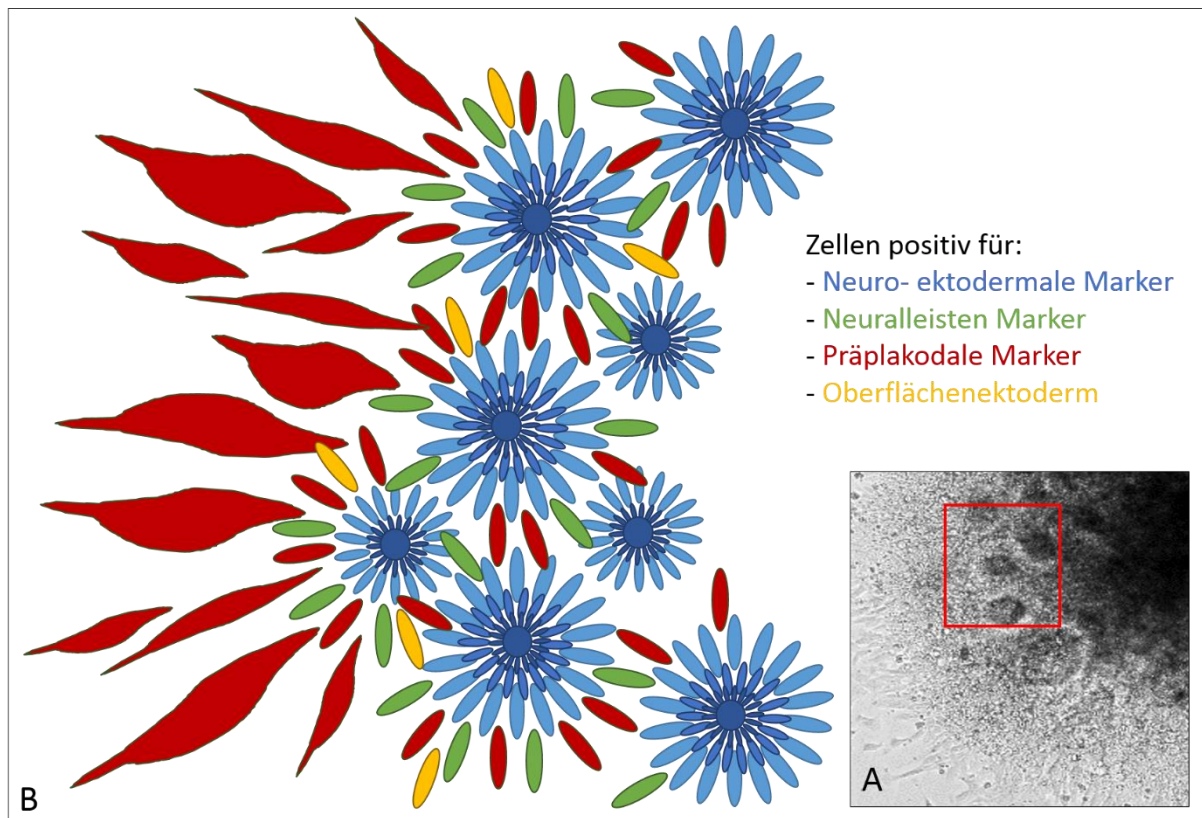


Abbildung 59: Schematische Verteilung der Marker im Stadium der neuralen Rosetten

(A) Lichtmikroskopische Aufnahme einer neuralen Rosette. (B) Ausschnitt aus (A), der schematisch die Verteilung der Zellen, die positiv sind für neuro-ektodermale Marker (Blau), Neuralleisten Marker (Grün), Präplakodale Marker (Rot) und Marker für das Oberflächenektoderm (Gelb) zeigt.

Das *in vitro* generierte Differenzierungsprotokoll zielt darauf aus, die Stadien der embryonalen Entwicklung (frühe und späte Neuralplatte, frühe und späte Neurulation) in der Kulturschale durch die gezielte Zugabe von Wachstumsfaktoren nachzubilden. Neben den PPR Markern, die zur Ausbildung der olfaktorischen Plakode und damit zur Reifung von ORN am wichtigsten sind, wurden auch Marker des Neuro-Ektoderms/Neuralplatte, der Neuralleiste und des Oberflächenektoderms auf RNA Ebene analysiert (Abbildung 23). Für die verschiedenen Stadien und definierten Bereiche innerhalb dieser Entwicklungsphasen gibt es viele publizierte Marker. Eine Auswahl davon ist in Tabelle 18 zusammengestellt worden. Einige davon (grau hinterlegt) wurden in einer detaillierten Genexpressionsanalyse während der gerichteten Differenzierung zu verschiedenen Zeitpunkten näher angeschaut. Marker bei denen ein Plus (+) vermerkt sind, aber nicht grau hinterlegt wurden, wurden aus Gründen der Darstellung nicht gezeigt und sind im Anhang zu finden. Marker mit einem Minuszeichen (-) wurden in der Genexpressionsanalyse nicht gemessen.

Tabelle 18: Potentielle Marker zur Charakterisierung der embryonalen Stadien

Die Tabelle fasst einen Großteil der publizierten Marker zusammen die in der Genexpressionsanalyse verwendet wurden (grau hinterlegt). Marker bei denen ein Plus (+) vermerkt sind, aber nicht grau hinterlegt wurden, sind im Anhang zu finden. Marker mit einem Minuszeichen (-) wurden nicht in der Genexpressionsanalyse gemessen.

Stadium	Marker	Analysiert	Marker	Analysiert
Neuralplatte	NCAM1	+	SOX2	+
	SOX1	+	ZIC1	-
Neuralleiste	FOXD3	+	SOX9	+
	PAX7	-	TFAP2A	+
	SOX10	+		
Oberflächenektoderm	CDH1	-	GATA3	+
	DLX3	-	KRT19	+
	DLX5	-	KRT8	-
	GATA2	+		
Präplakodale Region	EYA1	+	SIX1	+
	EYA2	+	SIX2	-
	FOXI1	-	SIX4	+
PPR anterior	DMRT4	+	PAX6	+
	FOXE3	+	PITX3	-
	OTX2	-	SIX3	-
	PAX3	-	SIX6	-
PPR posterior	FOXI1	-	PAX2	-
	FOXI3	+	PAX8	+
	GBX2	+		
Adenohypophyse	EYA2	+	MSX1	-
	LHX1	-		
Linsen Plakode	FOXE3	-	SIX3	-
	MAFB	-	SOX1	+
Olfaktorische Plakode	FOXC1	+	EMX2	+
	EBF2	+		
Trigeminale Plakode	ISL1	-	TBX2	+
Epibranchiale Plakode	FOXI2	+	PAX2	-
Ohr Plakode	FOXI1	-	PAX2	-
	FOXI3	+		

Will man die einzelnen Stadien und Zeitpunkte der Differenzierung einem embryonalen Entwicklungsstadium zuordnen, so lassen sich keine klaren Grenzen definieren, da ein fließender Übergang zwischen den einzelnen Tagen und den Stadien der Differenzierung stattfindet. Möglicherweise lassen sich einige Zeitpunkte durch eine signifikant ansteigende Genexpression spezifischer Markergene näher eingrenzen. Für die Analysen der PPR Marker in unserem Differenzierungsprotokoll wurden drei Zeitpunkte während des Stadium der neuralen Rosetten näher untersucht (Abbildung 23). Dieses Stadium entspricht dem embryonalen Zeitpunkt der späten Neuralplatte, wenn neben der Neuralplatte (aus der später das Neuralrohr wird), die Neuralleiste, die PPR und das Oberflächenektoderm bereits definiert sind. In der Genexpressionsanalyse lassen sich die Marker aller Bereiche der späten Neuralplatte detektieren. Die Problematik bei manchen Verlaufskurven ist, dass relativ auf Stammzellen bezogen keine Signifikanzen berechnet werden können, da diese keine oder nur einen biologischen Expressionswert haben. Für die Marker der Neuralplatte (*SOX1/2*, *NCAM1*) sieht man einen durchgehenden Anstieg aller drei gemessenen Gene ausgehend von den Stammzellen. Die hohe Grundexpression von *SOX2* im Vergleich zu den beiden anderen Genen erklärt sich dadurch, dass *SOX2* in den Stammzellen eine Pluripotenzfaktor ist und für die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften essentiell ist. Ausgehend von diesem hohen Grundlevel steigt die Expression bis zum späten Stadium der neuralen Rosetten noch weiter an. In

Abbildung 29 sieht man den weiteren Kurvenverlauf der beiden Gene bis Tag 33 der Differenzierung. Dies umfasst die weiteren Stadien der neuralen Stammzellen und frühen Neurone. Im weiteren Expressionsverlauf von *SOX2* sieht man, dass das Maximum bei Tag 19 erreicht ist und dann wieder abfällt, die Werte von *NCAM1* fallen an Tag 25 der Differenzierung und steigen dann wieder bis zu den Neuronen an. Aufgrund der Genexpressionsdaten für die Marker der Neuralplatte lässt sich folgern, dass dieses Stadium bis zum Tag 19 der Differenzierung geht. Eine stetige Zunahme in der Genexpression findet sich auch in der Verlaufskurve von *KRT19*, repräsentativ für das Oberflächenektoderm wieder. Zwei (*FOXD3*, *SOX9*) der drei Marker für die Neuralleiste haben ein deutliches Maximum nach sechs Tagen der Differenzierung, fallen dann sehr stark wieder ab und steigen wieder an. Der dritte Marker *SOX10* zeigt ein konstantes Ansteigen der Genexpression im Stadium der neuralen Rosetten. Hier lässt sich vermuten, dass Zellen, die diese drei Marker der Neuralleiste exprimieren, generell eine niedrige Grundexpression ausweisen, oder nur in sehr geringer Anzahl vorhanden sind, was den zackigen Verlauf der Kurve und die sehr geringen Werte der y-Achse erklären. Bei den Markern (*EYA1/2*, *SIX4*) für die Präplakodale Region zeigt sich ein konstanter Anstieg in den gemessenen Werten, mit Ausnahme von *SIX4*, dass sein Maximum bei Tag sieben der Differenzierung hat und dann wieder abfällt. Insgesamt lässt sich dadurch schlussfolgern, dass das Stadium der späten Neuralplatte, bei dem die Bereiche der Neuralplatte, Neuralleiste, Oberflächenektoderm und PPR während der embryonalen Entwicklung definiert sind parallel in dem Stadium der neuralen Rosetten zu finden ist (Abbildung 60).

In der weiteren Entwicklung, zum Zeitpunkt der frühen Neurulation, definieren sich einige Bereiche genauer. Die PPR differenziert sich in einen anterioren und einen posterioren Bereich, während die Neuralplatte, die Neuralleiste und das Oberflächenektoderm immer noch vorhanden sind. Die Kurven der Marker für die PPR und der Marker für die anterioren und posterioren Bereiche der PPR überschneiden sich, da zum einen in der Differenzierung und in der embryonalen Entwicklung zwischen den einzelnen Abschnitten keine klaren Grenzen gesetzt werden können. Zum anderen sind nicht alle Zellen synchron geschaltet, wodurch Populationen mit unterschiedlichem Genexpressionsmuster entstehen. Aus der posterioren Präplakodalen Region differenzieren in der späten Neurulation die Ohr- und Epibranchiale Plakode und lassen sich mit den Markern *PAX8*, *GBX2* und *FOXI3* charakterisieren [232]. *FOXI3* dient auch als Marker für die Ohr-Plakode und wird durchgehend exprimiert, während *FOXI2* spezifisch für die Epibranchiale Plakode ist [229]. Bei diesem Marker sieht man sehr deutlich, (Abbildungen 29, 30) dass die maximale Expression zum späten Zeitpunkt der Rosetten detektiert werden kann und dann drastisch wieder abfällt. Zu diesem Zeitpunkt überschneiden sich die Bereiche der posterioren PPR und der Ohr-Plakode in der Differenzierung. Dieses Ergebnis wird durch den Kurvenverlauf der weiteren posterioren PPR Marker unterstützt. *PAX8* zeigt ebenfalls seine maximale Expression an Tag elf und fällt zu den Neuronen hin ab. Neben dem posterioren Bereich definiert sich aus der PPR ein anteriorer Bereich zum Zeitpunkt der frühen Neurulation. Die Zellen, die diese Marker (*FOXE3*, *DMRTA1*, *PAX6*) exprimieren werden auch im gerichteten Differenzierungsprotokoll durch verschiedenen Zusätze gefördert. Es zeigt sich in der Abbildung 29, dass alle drei Gene ihr Maximum nach 19 Tagen haben, was zeitlich deutlich später ist als bei den Markern der posterioren PPR. Zwischen diesen gemessenen Zeitpunkten der Differenzierung werden den Zellen FGF8, PU, BMP4 und RA zugegeben, was eine Differenzierung in die olfaktorische Richtung bewirken soll. Die Ergebnisse zeigen, dass diese exogene Zugabe einen Anstieg der Gene für die anteriore Plakode bewirkt, aus der sich unter anderem die Adenohypophyse und die olfaktorische Plakode mit den Zelltypen des olfaktorischen Epithels entwickeln [233]. Die Genexpressionen aller drei Genen zeigen nach dem Stadium der neuralen Stammzellen auch keinen Wert in den Neuronen mehr. Zum Zeitpunkt der späten Neurulation haben sich aus dem posterioren und anterioren Bereich der PPR die spezifischen Plakoden herausgebildet (Abbildung 30). Hier zeigen sich eindeutige Maxima der Marker für die Adenohypophyse (*EYA2*), Linsen- (*SOX1*) und Ohr-Plakode (*FOXI3*) an Tag elf und fallen dann zu den

Neuronen stark ab. Ein Maximum der Genexpression an Tag 19 ist bei *FOXI2* für die epibranchiale Plakode und *FOXG1* für die olfaktorische Plakode zu beobachten (Abbildung 31). Durch die gezielte Förderung der olfaktorischen Linie während der gesamten Differenzierung wurden die Zellen, die Markergene der anterioren PPR und der olfaktorischen Plakode exprimieren, gefördert. *FOXG1* ist auch bereits an Tag elf hoch exprimiert, wie die anderen Plakodengene, steigt aber nochmals deutlich im Vergleich zu den anderen bis Tag 19 an, um dann im Stadium der Neurone abzufallen. Ab diesem Zeitpunkt wird dann eine Zunahme der frühen olfaktorischen Vorläufergene, wie *ASCL1* oder *NGN1* erwartet. Dass nur *FOXG1* so stark ansteigt und sein Maximum eine Woche später detektiert werden kann liegt vermutlich an der gezielten Zugabe der vier Faktoren zu Beginn des neuralen Stammzell Stadiums. Die Zellen dieser Plakode werden begünstigt, während die anderen nicht gefördert, bzw. durch die Zusätze gehemmt werden. Aus den ermittelten Datensätzen der Genexpressionsanalyse lässt sich ein vereinfachtes Schema (Abbildung 60) erstellen, das den Zusammenhang der *in vitro* Differenzierung und der *in vivo* Entwicklungsbereiche vereint. Dabei werden die Maxima der Kurvenverläufe der entsprechenden Entwicklungsbereiche den Stadien der olfaktorischen Differenzierung zugeordnet.

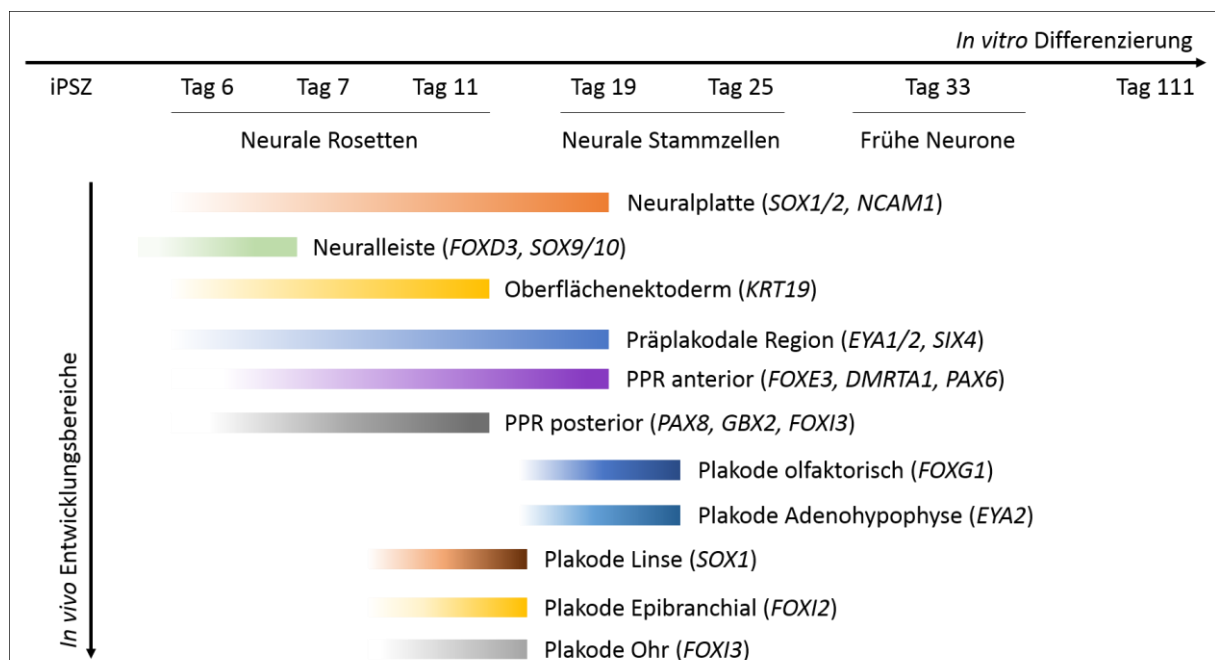


Abbildung 60: Schematischer Zusammenhang zwischen der olfaktorischen Differenzierung und der embryonalen Entwicklung. Das Schema basiert auf den Genexpressionsdaten verschiedener Marker während der 111 Tage andauernden, gerichteten Differenzierung. Dabei wird ausgehend von den iPSZ das Stadium der neuralen Rosetten (Tag 6, 7, 11), neuralen Stammzellen (Tag 19, 25) und frühen Neurone (Tag 33) durchlaufen. Die Balken der Marker für das jeweilige embryonale Entwicklungsstadium soll die ungefähre maximale Expression der Marker während der Differenzierung aufzeigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass

- die Markergene der Neuralplatte, Neuralleiste, Präplakodalen Region, Oberflächenektoderm, anteriore/posteriore PPR und die Marker für die einzelnen Plakoden in dem gerichteten Differenzierungsprotokoll detektiert werden können
- nur eine geringe Expression der Neuralleistenzellen detektiert werden kann
- Marker der Neuralplatte lange exprimiert werden, da es sich um eine neuro-ektodermales Protokoll handelt
- die Zellen der posterioren PPR und der Linsen, Epibrachialen- und Ohr Plakode weniger gefördert bzw. durch die vier Faktoren in ihrer Differenzierung gehemmt werden
- die Zellen der anteriore PPR und der olfaktorische Plakode durch die Zugabe der vier Faktoren bevorzugt, stärker und länger exprimiert werden

→ das Differenzierungsprotokoll die frühe olfaktorische Differenzierung widerspiegelt

4.3.2. Entsprechen einzelne Differenzierungsschritte den embryonalen Entwicklungsstufen?

4.3.2.1. Charakterisierung von neuralen Rosetten

Neurale Rosetten entstehen durch die adhärenente Kultivierung von vier Tage alten embryonalen Körpern (Embryoid Bodies - EBs). EBs entsprechen der frühen Gastrula der *in vivo* Entwicklung im Embryo, während es sich *in vitro* um eine hohle Kugel handelt, die Zellen aus allen drei Keimblättern enthält [234], mit Ausnahme des extraembryonalen Gewebes [235, 236]. Die Differenzierung von EBs erfolgt in definierten Schritten: Sie beginnt mit der Spezifizierung der Zellen der Außenseite in Richtung primitives Endoderm, wofür exogenes FGF2 zugegeben werden muss [237, 238]. Zudem fördert die Zugabe von FGF2 zum Rosettenmedium die Bildung von Neuroprogenitoren und erhöht ihre Anzahl [239]. Die Zugabe von FGF2 zum Medium hat sich auch in unseren Kulturbedingungen bestätigt. In den Etablierungsversuchen für das gerichtete Differenzierungsprotokoll wurde die FGF2 Zugabe zum Stadium der neuralen Rosetten variiert. Das Ergebnis dieser Versuche war, dass die Zugabe von FGF2 die Entwicklung und Proliferation der neuralen Rosetten fördert und eine Erhöhung der *OMP* Expression in den späteren Neuronen bewirkt. Ein weiterer Einfluss auf die neuralen Rosetten nimmt der BMP Signalweg, indem er ihre Entwicklung inhibiert und *in vivo* die Spezifizierung des Neuro-Ektoderms verhindert [240]. Wegen der großen Ähnlichkeiten zwischen der Entwicklung des Neuralrohrs aus dem Neuro-Ektoderm und der Bildung der neuralen Rosetten liegt es nahe, dass BMP auch darauf einen negativen Einfluss hat. Im weiteren Differenzierungsschritt der EBs bilden sich Zellen der drei Keimblätter (Gastrulation). Ohne spezielle Medienzusätze entstehen dabei vermehrt ektodermale Zelltypen, die dann in die neurale Linie differenzieren können [241]. Unter adhärenenten Kulturbedingungen kann man bereits einen Tag nach dem Ausplattieren der EBs die ersten neuralen Rosetten beobachten. Dabei handelt es sich um radiale Anordnungen von säulenartigen Zellen, die dem sagittalen Schnitt des Neuralrohrs entsprechen und Markerproteine (*NESTIN*, *NCAM1*, *SOXB1*) exprimieren, die auch von neuroepithelialen Zellen des Neuralrohr gebildet werden (Abbildung 62) [242]. Zusätzlich zu der ähnlichen Morphologie differenzieren Neuroprogenitoren innerhalb der neuralen Rosette zu den drei Klassen der Nachkommen von neuralen Zellen: Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten [161]. Auf Proteinebene konnte gezeigt werden, dass die neuralen Rosetten des gerichteten Differenzierungsprotokolls positiv für die neuralen Zellmarker Marker *ASCL1*, *NESTIN*, *PAX6*, *SOX2* und *TUBB3* sind (Abbildung 47). Auf RNA Ebene konnte dies bestätigt werden, es gibt einen signifikanten Anstieg der Genexpression von *NCAM1*, *NESTIN* und *SOX2* im Vergleich zwischen EBs und neuralen Rosetten (Abbildung 46 A). Dies legt den Schluss nahe, dass hier Zellpopulationen generiert wurden, die in die weitere neurale Richtung differenzieren können. In Bezug auf die Marker des olfaktorischen Systems (Abbildung 46 B) wird ebenfalls ein Anstieg im

Stadium der neuralen Rosetten gegenüber den EBs erwartet. Die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche zeigten, dass zum Zeitpunkt der neuralen Rosetten die Marker der anterioren PPR sinken und die der olfaktorischen Plakode ihr Maximum besitzen (Abbildung 59). Es wird erwartet, dass parallel dazu die Marker der frühen olfaktorischen Vorläufer, wie *ASCL1* und *NGN1* langsam ansteigen. Tatsächlich findet sich ein signifikanter Anstieg in den Genen *SOX2* und *ATF5*, eine tendenzielle Zunahme in der Genexpression bei den Markern für die frühen olfaktorischen Vorläufer *ASCL1* und *NGN1* (Abbildung 46 B). Da *ASCL1* auch ein genereller neuraler Vorläufermarker ist und neurale Rosetten hauptsächlich aus den neuro-ektodermalen Zellen bestehen, kann der gemessene Anstieg in der Genexpression und die Detektion dieses Proteins auch darauf zurückzuführen sein [243]. Die Isolierung von neuralen Progenitoren aus den Rosetten erfolgt durch Behandlung mit Dispase, wobei das Enzym relativ selektiv für neurale Zellen ist und die Zellen, die das Gebilde umgeben nicht abgelöst werden [244]. Vermutet wird, dass diese Selektivität durch Zell-Zellkontakte zueinander durch das Zelladhäsionsmolekül NCAM und/oder Tight junctions und Adhärenz-Gürtel gebildet werden. Ähnliche Interaktionen zwischen den Zellen führt auch zur Bildung der neuralen Stammzellen aus den abgespülten Rosettenzellen [161]. Aufgrund dieses Wissens werden für die Generierung der ORN nicht nur selektiv die Zellen abgespült, die weiter in die neuronale Linie differenzieren können, sondern auch die Zellen, die sich am Rand der Rosetten und in einem Ring um den auswachsenden EB befinden (Abbildung 62). Dadurch wird erhofft, dass die Zellen des späten Rosetten Stadiums, also alle die positiv sind für die PPR, anteriore PPR und olfaktorische Plakode sich mit den anderen neuralen Zellen zu NSZ anlagern und dann weiter in die olfaktorische Richtung differenzieren.

4.3.2.2. Charakterisierung von neuralen Stammzellen

Neurale Stammzellen bilden sich in Suspensionskultur aus abgelösten und vereinzelt neuralen Rosetten. Für die Generierung des spezifischen olfaktorischen Protokolls wurden nicht nur selektiv die Zelltypen des Neuro-Ektoderms abgespült, sondern auch die Zellen, die positiv für die Präplakodale Region, anteriore PPR und olfaktorische Plakode sind (Abbildung 62). Im Differenzierungsprotokoll wird den NSZ für wenige Tage EGF und FGF2 ins Kulturmedium zugesetzt, wodurch sie mit der Bildung von Kugeln anfangen und proliferieren. Diese Gebilde sind dann durchschnittlich 100- 200 µm groß und umfassen 10,000- 100,000 Zellen. Sie können passagiert werden, da sie sonst zu groß und nekrotisch aufgrund von fehlendem Sauerstoff und Nährstoffaustausch in der Mitte der Neurosphären werden [245]. Der nächste Schritt des Differenzierungsprotokolls zielt darauf ab, durch die Zugabe der vier Faktoren (BMP4, FGF8, PU, RA) gewebsspezifische NSZ zu bekommen, die den Globosen und Horizontalen Basalzellen des olfaktorischen Epithels ähnlich sein sollten. Aus diesen neuralen/olfaktorischen- Basal/Stammzellen sollten dann die weiteren Vorläuferzelltypen (GBZ-TA, GBZ-INP, IN) der olfaktorischen Neurone entstehen. Auf RNA und Protein Ebene konnte gezeigt werden, dass die generierten neuralen Stammzellen des gerichteten Protokolls die spezifischen Marker dieses Zellstadiums bilden (Abbildung 48 A, 49). Erwartet wird die Expression von *NESTIN*, *PAX6*, *SOX1/2/9*, aber auch von Markern für mehr differenzierte Linien, wie *TUBB3*, *GAP43*, *NEUROD1* für Neurone, *GFAP* für Astrozyten und *O1* für Oligodendrozyten [246, 247]. Obwohl *NESTIN* überwiegend in Stammzellen des ZNS exprimiert ist, fehlt dessen Expression jedoch in nahezu allen reifen ZNS Zellen, was es zu einem effektiven Marker für NSZ macht. Dies kann auch in unserer Differenzierung beobachtet werden, so zeigt sich eine hohe *NESTIN* Expression im Stadium der NSZ auf RNA und Protein Level, jedoch fällt diese signifikant im Neuronen Stadium wieder ab (Abbildung 50 A). Zusätzlich zu *NESTIN* wird auf RNA Ebene in NSZ signifikant höher *GAP43* und *NCAM1* gebildet. Wie bereits zuvor erläutert, kann die hohe *NCAM* Expression auf die Bildung der neuronalen Kugeln unter Zuhilfenahme der Zell-Zelladhäsionsmoleküle erklärt werden. Einen tendenziellen Anstieg in der Genexpression gegenüber den neuralen Rosetten findet sich bei *NEUROD1*, *NGN1*, *PAX6* und

SOX1/2/9. Auf Proteinebene stimmt dies mit positiven Zellen für *PAX6* und *SOX2* überein (Abbildung 49). Nicht nur in pluripotenten Stammzellen, sondern auch während der Neurogenese sind *SOX1* und *SOX2* in allen sich entwickelnden Zellen des Neuralrohrs und in allen proliferierenden ZNS Progenitorzellen exprimiert, was die Vermutung zulässt, dass *SOX2* für die Proliferation und Differenzierung von NSZ sehr wichtig ist [248]. Da nach einigen Tagen den neuralen Stammzellen die Wachstumsfaktoren für die Differenzierung zugegeben werden, ist in Abbildung 48 B die Expression der olfaktorischen Marker zu diesem Zeitpunkt dargestellt. Es lässt sich ein signifikanter Anstieg von *ASCL1*, ein Marker für frühe olfaktorische Vorläuferpopulationen detektieren. Auch finden sich *ASCL1* und *CALB2* positive Zellen in der NSZ Kultur. Die generierten neuralen Stammzellen zeigen eine positive Genexpression der erwarteten Marker zu diesem Stadium, zudem lassen sich Zellen finden, die positiv für Marker der frühen und späten olfaktorischen Vorläufer sind.

4.3.2.3. Charakterisierung von Neuronen

Die Charakterisierung der Neurone soll in dieser Arbeit kurzgehalten werden, da sich der Fokus auf die Entwicklung des Differenzierungsprotokolls beschränkt. Auch wird nicht auf die weitere funktionelle Charakterisierung der entstandenen olfaktorischen Rezeptorneurone eingegangen, da dies ein Bestandteil einer weiterführenden Doktorarbeit ist. In Abbildung 52 sieht man, dass auf Proteinebene neben den neuralen und neuronalen Zelltypen in der sechzig Tage alten Differenzierungskultur *OMP* positive Neurone detektiert werden können. Zudem wurde auf RNA Ebene in einem Verlaufsdiagramm bezogen auf die Grundexpression in Stammzellen *OMP* und *TUBB3* dargestellt (Abbildung 55). Hier kann man sehr deutlich erkennen, dass über zehn gemessene Zeitpunkt im Neuronen Stadium die *OMP* und *TUBB3* Expression signifikant ansteigen und nach 88 Tagen Differenzierung eine 55-fache Expression von *TUBB3* und eine 65-fache Expression von *OMP* gegenüber dem Stammzell Level detektiert werden kann. Im Zusammenhang mit der neuronalen Entwicklung von Nervenzellen dient *TUBB3* als Marker für neu gebildete, unreife postmitotischen Neurone und im olfaktorischen System ist es ein Marker für reife ORN, wobei nicht alle reifen sensorischen Neurone, die *OMP* positiv auch gleichzeitig *TUBB3* positiv sein müssen [249, 250]. Es ist bekannt, dass es unter den olfaktorischen Neuronen Teilpopulationen gibt, die *OMP*⁺/*TUBB3*⁺ oder *OMP*⁺/*TUBB3*⁻ sind. Der Grund dafür ist bisher noch nicht erforscht [66]. Im Rahmen der Genexpressionsanalyse wurden zur Identifikation der Neurone im Zeitraum von 33 bis 98 Tagen in direkt Vergleich zueinander *CALB2* [93], *GAP43* [251], *NCAM1/2* [104], *NEUROD1* [252], *NGFR* [253] und *UCHL1* [254] analysiert (Abbildung 51 A). Es lässt sich eine signifikante Zunahme dieser neuronalen Gene *CALB2*, *GAP43*, *NCAM2*, *NEUROD1*, *NGFR*, *TUBB3* und *UCHL1* beobachten. Alle Gene sind im Zusammenhang mit der neuronalen Entwicklung beschrieben worden. Dies deckt sich mit der vergleichenden Grafik zwischen den NSZ und frühen Neuronen (Tag 45) der Differenzierung (Abbildung 50 A). Auch kann man hier einen signifikanten Anstieg bei den gemessenen neuronalen Markern *GAP43* und *NCAM1* beobachten. In Bezug auf die olfaktorischen Markergene zeigt sich in Abbildung 50 B und 51 B ein signifikanter Anstieg der Marker für die späten olfaktorischen Vorläufer (*CALB2*) und für die reifen sensorischen Neurone (*GOLF*). *ATF5* und *TUBB3*, die ebenfalls späten Vorläuferpopulationen markieren und *OMP* (reife ORN) zeigen eine starke Zunahme ihrer Expression im Neuronen Stadium. Dieser späte Anstieg der Marker für reife ORN liegt vermutlich daran, dass zunächst durch die Zugabe der vier Wachstumsfaktoren im NSZ Stadium olfaktorische Vorläuferzellen entstehen und diese im Neuronen Stadium durch Zugabe von ActivinA und viel Zeit zu reifen ORN differenzieren.

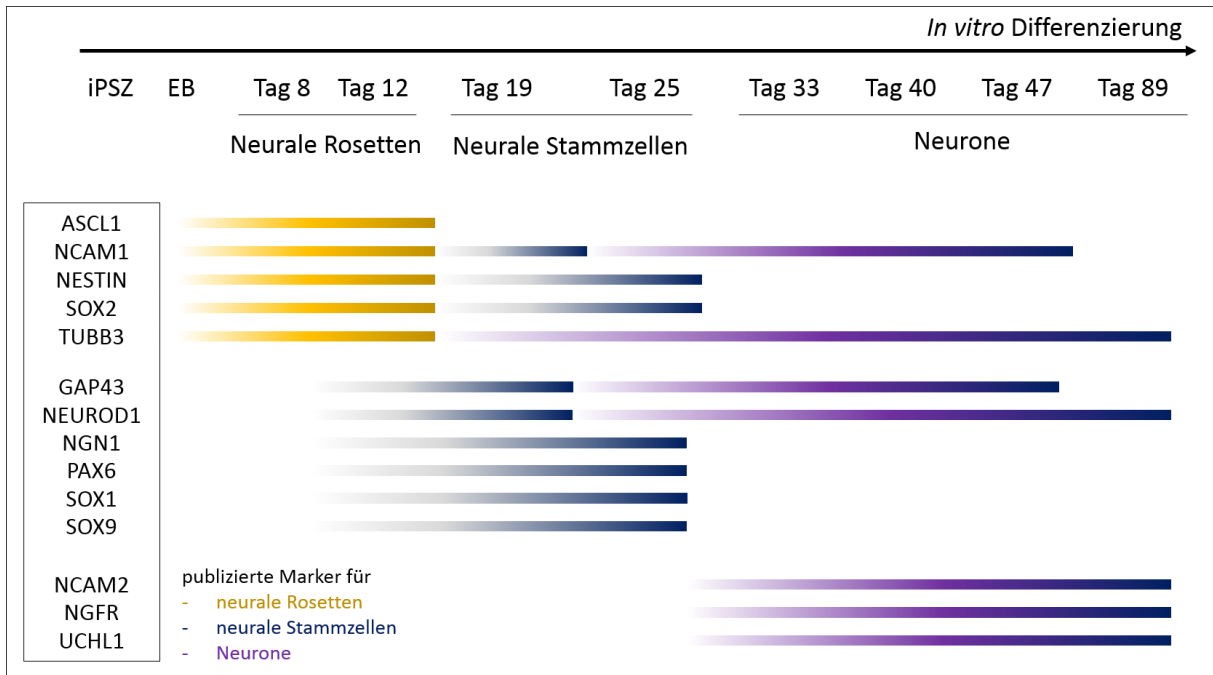


Abbildung 61: Schematische Zusammenfassung der Expression von publizierten Markern in den Differenzierungsstadien
Die maximale Expression der erwarteten, publizierten Marker für die jeweiligen Stadien (neurale Rosetten, neurale Stammzellen, Neurone) während der 89 Tage Differenzierungszeit sind als Balken dargestellt. In Gelb sind die publizierten Marker für neurale Rosetten, in Blaugrau für neurale Stammzellen und in Violett für Neurone zu sehen.

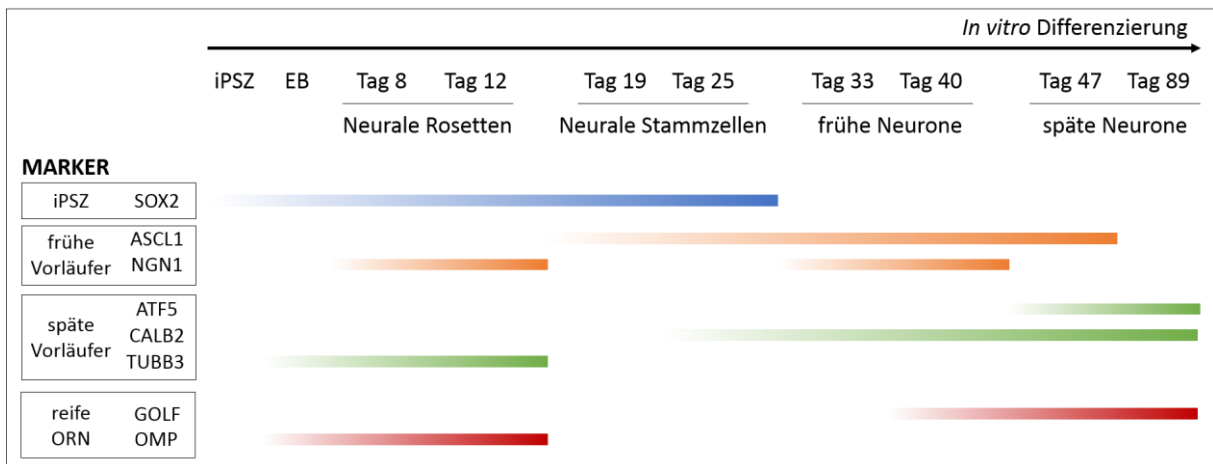


Abbildung 62: Schematischer Zusammenhang zwischen den olfaktorischen Markern und den Differenzierungsstadien
Das Schema basiert auf den Genexpressionsdaten verschiedener Marker während der 89 Tage andauernden, gerichteten Differenzierung. Dabei wird ausgehend von iPSZ das Stadium der Embryoid Bodies (EBs), neuralen Rosetten (Tag 8,12), neuralen Stammzellen (Tag 19, 25), frühen Neuronen (Tag 33- 40) und späten Neuronen (TAG 47- 89) durchlaufen. Die Balken der Marker für das jeweilige embryonale Entwicklungsstadium soll die ungefähre maximale Expression der Marker während der Differenzierung aufzeigen.

In den Abbildungen 61 und 62 wird schematisch versucht, die Expression der analysierten Markergene während der verschiedenen Differenzierungsstadien mit den embryonalen Entwicklungsstadien zu korrelieren. Darüber hinaus wird gezeigt, inwiefern die Markergene, die spezifisch für bestimmte olfaktorische Populationen während der olfaktorischen Neurogenese sind, mit dem Differenzierungsprotokoll übereinstimmen. In dem etablierten Differenzierungsprotokoll werden die publizierten Marker für neurale Rosetten, neurale Stammzellen und Neurone zu dem Zeitpunkt

exprimiert, zu dem sie auch erwartet wurden. Es lassen sich ganz klar die einzelnen Stadien voneinander anhand des Schemas abgrenzen (Abbildung 61). Zum Teil sind einige Marker (*NCAM1*, *NESTIN*, *SOX2*) nicht nur auf ein Stadium begrenzt, sondern deren Expression weitet sich auch in die angrenzenden Stadien aus. Dies ist auch zu erwarten, da bei dem Differenzierungsprotokoll nicht alle Zellen gleich schnell wachsen und sich Teilpopulationen bilden können, die unterschiedlich reif bzw. weit in der Differenzierung sind.

Einige Markergene wurden ausgewählt und den Entwicklungsstadien der olfaktorischen Neurogenese (frühe/späte Vorläufer, reife ORN) zugeordnet (Abbildung 62). Dabei zeigt sich die Genexpression von einigen Markern wie erwartet. *SOX2* ist nicht nur ein Marker für pluripotente Stammzellen, sondern ist auch als Marker für Basalzellen und frühen Progenitoren des olfaktorischen Epithels beschrieben [95]. Dabei ist die Expression von *SOX2* nicht ausschließlich in den Globosen und Horizontalen Basalzellen zu finden, auch Stützzellen und andere epitheliale Zellen des olfaktorischen Epithels weisen diesen Marker auf [88, 172]. Dies erklärt die gemessene Expression von *SOX2* in den Stammzellen, wo es wie bereits diskutiert als Pluripotenzmarker agiert und für die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften essentiell ist. Die Expression zieht sich bis zu den neuralen Stammzellen weiter, wo es zum einen auch für die Selbsterneuerung und Potenz dieser Stammzellen fungiert [248]. Die Expression der frühen Vorläufergene *ASCL1* und *NGN1* wird zum Zeitpunkt der späten neuralen Rosetten und der NSZ erwartet, die späten Vorläufermarker (*ATF5*, *CALB2*, *TUBB3*) im späten NSZ Stadium und bis in das Stadium der Neurone. Betrachtet man die Vorläuferpopulationen zusammen, so sieht man, dass im Differenzierungsprotokoll die Marker *NGN1* und *TUBB3*, die bis zum Ende des neuralen Rosetten Stadiums exprimiert werden, charakteristisch für die frühen Vorläufer sein sollten. *ASCL1*, *ATF5*, *CALB2* und *NGN1* sind kaum im NSZ Stadium, dafür teilweise über die gemessene Zeit der Neurone exprimiert. Es lässt sich bei den Markern keine klare Zuordnung für die jeweiligen Differenzierungsstadien beobachten, tendenziell aber stimmen sie mit den Erwartungen überein. Marker für reife olfaktorische Rezeptorneurone (*OMP*, *GOLF*) werden erst spät in der Differenzierung erwartet. Diese Vermutung wird durch die *GOLF* Expression unterstützt, das Transkript entsteht erst nach einer Differenzierungszeit von 89 Tagen, wenn die ORN ihre Reife durch die Expression der benötigten Teilkomponenten der olfaktorischen Signalkaskade zeigen. Dagegen hat *OMP* seine höchste Expression zum Zeitpunkt der neuralen Rosetten, was nicht erklärt werden kann. In diesem Stadium konnte experimentell gezeigt werden, dass die Markergene der Präplakodalen Region, der anterioren PPR und der olfaktorischen Plakode exprimiert werden. Die anschließende Neurogenese sollte ausgehend von der olfaktorischen Plakode in den weiteren Differenzierungsschritten stattfinden. Möglicherweise hat *OMP* bisher nicht untersuchte Aufgaben in der Embryonalentwicklung, auch außerhalb des olfaktorischen Systems.

4.3.3. Analyse der Signalkaskaden

In Abbildung 65 werden die publizierten Signalkaskaden der olfaktorischen Neurogenese schematisch dargestellt. Alle Experimente wurden in Modellorganismen, vorwiegend in Mäusen durchgeführt. Das Vorhandensein dieser aufeinanderfolgenden Genexpressionen wurde in der gerichteten olfaktorischen Differenzierung überprüft und wird im Einzelnen näher diskutiert.

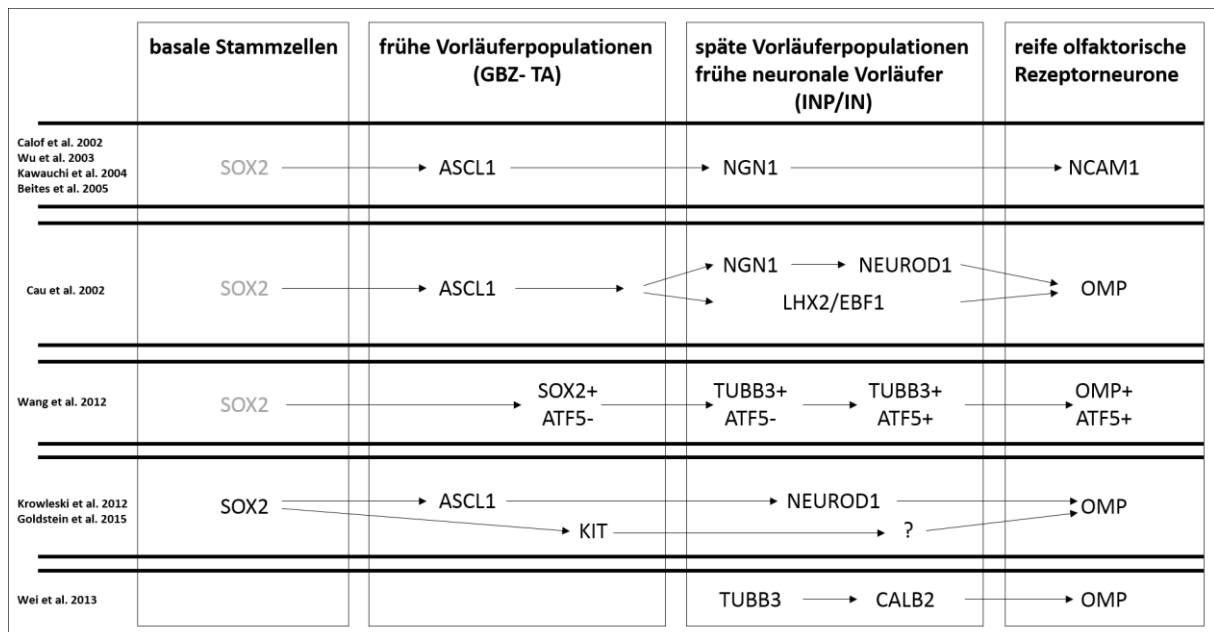


Abbildung 63: Publierte Signalkaskaden in der olfaktorischen Neurogenese

Die Abbildung fasst die publizierten Signalkaskaden zusammen, die während der olfaktorischen Neurogenese durchlaufen werden. Dabei exprimieren bestimmte Subpopulationen (GBZ-TA, INP, IN) während der Differenzierung von Basalzellen zu reifen olfaktorischen Rezeptorneuronen spezifische Marker. Die Publikationsquellen zur jeweiligen Signalkaskade sind angegeben.

4.3.3.1. Signalkaskade ASCL1 → NGN1 → NEUROD1 → NCAM1

Olfaktorische Vorläufer durchlaufen bis zu ihrer Reifung eine bestimmte Genexpressionskaskade und exprimieren dabei unterschiedliche Marker. Der Signalweg der neuronalen Differenzierung im olfaktorischen Epithel ist: ASCL1 → NGN1 → NEUROD1 → OMP/NCAM1 (Abbildung 66) [85]. Der Verlauf dieser Gene in unserem olfaktorischen Differenzierungsprotokoll ist in Abbildung 56 dargestellt. Die meisten Publikationen beschreiben drei Stadien der neuronalen Progenitorzellen in der olfaktorischen Linie: GBZ-TA (Transient Amplifying, vorübergehend sich ausdehnende Globöse Basalzellen), GBZ-INP (Immediate Neuronal Precursor, unmittelbare neuronale Vorläufer) und IN (direkte neurale Vorläufer). Dabei bilden sich ausgehend von proliferierenden Stammzellen zunächst ASCL1 positive Progenitoren. ASCL1 ist für die Bildung einer Subpopulation von basalen Progenitorzellen des olfaktorischen Epithels erforderlich [50]. NGN1 positive Zellen, die als GBZ-INP interpretiert werden, lassen sich am häufigsten in frühen Neuronen finden. INP sind die letzten proliferierenden Zellen in der olfaktorischen Linie, sie durchlaufen eine oder mehrere Zellteilungen und ihre Nachkommen differenzieren weiter zu NCAM1 exprimierenden, postmitotischen ORN [148]. In der Abwesenheit von NGN1 können die Progenitoren nicht alle regulatorischen Gene, wie NEUROD1 exprimieren, die vermutlich für die Spezifizierung und Differenzierung von ORN wichtig sind. Will man die Signalkaskade der olfaktorischen Neurogenese auf das Differenzierungsprotokoll übertragen, könnten man annehmen, dass diese Gene zu unterschiedlichen Stadien während der Differenzierung wellenhaft und aufeinanderfolgend exprimiert werden. Vermutlich ist dies jedoch nicht der Fall, da die neuronale Mischkultur unterschiedlich reife Neurone und deren Vorläuferpopulationen enthält. Zudem wird auch im gerichteten Protokoll keine reine olfaktorische Zellpopulation untersucht, sondern eine neuronale Mischpopulation mit einem höheren, aber dennoch geringen Anteil an OMP positiven Zellen. Es wurde zwar versucht, ab dem Stadium der neuralen Stammzellen durch die Zugabe von bestimmten Wachstumsfaktoren eine höhere Anzahl von neuronalen Progenitoren in die olfaktorische Richtung zu lenken und durch Zugabe von ActivinA im Neuronen Stadium die olfaktorischen Vorläufer gezielt zur weiteren Differenzierung in Richtung ORN zu fördern, jedoch wird

es innerhalb der Kultur immer noch Zellpopulationen geben, die schneller oder langsamer differenzieren. Dies wird eine konstante Expression der Markergene zur Folge haben, was man auch in dem Verlaufsdiagramm (Abbildung 56) beobachten kann. Bezogen auf das späte Stadium der neuronalen Stammzellen (Tag 25) zeigt *ASCL1* einen signifikanten Anstieg in der Genexpression, der zum Ende der Differenzierung wieder abnimmt. Die anderen gemessenen Gene *NGN1*, *NEUROD1* und *NCAM1*, die theoretisch in der neuronalen Differenzierung auf die *ASCL1* Expression folgen sollten, zeigen keinen signifikanten Anstieg. Die Expression von *NGN1* und *NEUROD1* nimmt über die Zeit der Neuronen ab. *NCAM1* ist konstant signifikant hoch exprimiert.

4.3.3.2. Signalkaskade *TUBB3* → *CALB2* → *OMP*

Der Zusammenhang zwischen den publizierten Markern für die Reifung der olfaktorischen Neurone wird durch die folgende Signalkaskade beschrieben: *TUBB3* → *CALB2* → *OMP* (Abbildung 66) [93]. *TUBB3* und *CALB2* markieren den Übergang zu reifen, *OMP* positiven Neuronen. Diese aufeinanderfolgende Genexpression wurde durch das Zählen der jeweiligen immunpositiven Zellen der einzelnen Entwicklungsstadien im olfaktorischen Epithel von Mäusen entdeckt [93]. Das Ergebnis dieser Zählung zeigte, dass die Expression von *Tubb3* abnimmt, während die von *Omp* mit der Reifung der ORN ansteigt. Die *Calb2* Expression zeigt ihr Maximum an Tag E14.5 (mittlerer gemessener Zeitpunkt) und konnte an den anderen analysierten Tagen kaum detektiert werden [93]. Calretinin positive Zellen im olfaktorischen Epithel wurde auch in adulten Guppys und Neunaugen (Fische) gefunden und als Subpopulation von ORN identifiziert. Sie befinden sich in der oberen Schicht der sensorischen Schleimhaut, vermutlich handelt es sich dabei um Neurone mit Mikrovilli, die die Glomerulusschicht des Bulbus Olfactorius innervieren [255]. *TUBB3* ist eine Neuronen-spezifische Isoform des Tubulins und ist als Marker für unreife Neurone beschrieben. Im olfaktorischen System wird es in unreifen ORN gebildet. Auch gibt es unter den reifen ORN Teilpopulationen, die *TUBB3*⁺/*OMP*⁺ und *TUBB3*⁻/*OMP*⁺ sind. *OMP* ist ein allgemein anerkannter Marker für reife sensorische Neurone des olfaktorischen Epithels. Die Deletion des Gens führt zu einer veränderten Aktivität der olfaktorischen Rezeptorneurone. In den Verlaufskurven der Differenzierung (Abbildung 57) sieht man, dass alle drei Gene einen Anstieg in der Genexpression zum Ende der Differenzierung haben, wenn die Neurone immer reifer werden. Für *OMP* wird dies auch erwartet, je reifer die olfaktorischen Neurone werden, desto mehr *OMP* Expression sollte detektiert werden können. *TUBB3* zeigt über das Neuronen Stadium einen ähnlichen Kurvenverlauf wie *OMP*. Da es Teilpopulationen gibt, die positiv für *TUBB3* und *OMP* sind, könnte dies ein Hinweis für den ähnlichen Kurvenverlauf sein und es vermutlich nur wenige *TUBB3*⁻/*OMP*⁺ Zellpopulationen unter den ORN in unserer Kultur geben. Jedoch hat sich nur die Expression von *CALB2* signifikant an Tag 89 der Differenzierung gegenüber den sieben Tage alten Neuronen (Tag 33) verändert. Das sich keine klaren aufeinanderfolgenden Genexpressionskurven von *TUBB3*, *CALB2* und *OMP* in dem Differenzierungsprotokoll detektieren lassen, kann darauf zurückgeführt werden, dass eine Mischpopulation von Neuronen analysiert wird und die Marker *CALB2* und *TUBB3* auch in anderen Neuronen exprimiert werden [256].

4.3.3.3. Signalkaskade *SOX2* → *TUBB3* → *ATF5* → *OMP*

Wang und Kollegen publizierten 2012 ein Modell, bei dem die Expression von Progenitoren, unreifen und reifen ORN näher untersucht wurde (Abbildung 66) [95]. Die Verlaufskurven der Markergene *SOX2*, *TUBB3*, *ATF5* und *OMP* aus der Differenzierung sind in Abbildung 58 dargestellt. Das Modell basiert auf einer *ATF5* gerichteten Differenzierung von ORN im olfaktorischen Epithel. Sie konnten auf Proteinebene zeigen, dass *ATF5* in allen reifen ORN und in einigen, aber nicht allen unreifen ORN exprimiert wird. Daraus schlussfolgerten sie, dass *ATF5* zunächst in unreifen ORN exprimiert wird und

dass das gebildete Protein die weitere Differenzierung zu reifen ORN fördert [95]. Das Fehlen von *ATF5* führt zu einem massiven Verlust von reifen ORN, was auf einen Fehler in der Differenzierung zu reifen Zellen und der Einleitung von Apoptose in ORN zurück zu führen ist. *SOX2* ist ein Transkriptionsfaktor, der in Stammzellen zum Erhalt der Pluripotenz und Selbsterneuerung essentiell ist und im Bezug zum olfaktorischen System wird es als Marker für multipotente, zur Teilung befähigte Basalzellen verwendet [155, 257]. Sobald die frühen Vorläuferpopulationen der olfaktorischen Linie den Zellzyklus verlassen, um zu GBZ-INP zu werden, fällt ihre *SOX2* Expression. Direkte Vorläuferzellen von reifen ORN sind *SOX2* negativ, jedoch zeigen Stützzellen, Globose und Horizontale Basalzellen auch eine *SOX2* Expression. Eindeutig kann man Globose Basalzellen, aus denen die olfaktorischen Neurone hervorgehen nur identifizieren, wenn ihre *ASCL1* Expression und *NGN1* Expression ansteigt und parallel die *SOX2* Expression fällt. Die beiden anderen analysierten Marker sind *TUBB3* und *OMP*. *TUBB3* wird hier wieder als Marker für unreife ORN und *OMP* als Marker für reife ORN beschrieben. Theoretisch würden man eine aufeinanderfolgende Genexpression von *SOX2*, *TUBB3* und *OMP* und eine parallele Expression von *ATF5* mit *TUBB3* und *ATF5* mit *OMP* erwarten. Anhand der Verlaufsgrafik lässt sich sagen, dass *SOX2* am stärksten in den NSZ exprimiert ist und dann über die Zeit der Neurone signifikant abfällt. Parallel dazu steigt ein wenig zeitlich versetzt die signifikant ansteigende *TUBB3* Expression in den frühen Neuronen und einer signifikanten Erhöhung der *OMP* Expression später im Neuronen Stadium. *ATF5* zeigt einen unveränderten, gleichbleibenden Kurvenverlauf. Generell zeigt *ATF5* in der Verlaufsanalyse des Differenzierungsprotokolls eine sehr geringe Expression, wodurch das abnehmen oder zunehmen der Expression nicht von der niedrigen basalen Expression zu unterscheiden ist. Orientiert nur an den signifikanten Genveränderungen spiegelt die Genexpression von *SOX2*, *TUBB3* und *OMP* die beschriebene Kaskade der Entwicklung von Vorläufern zu reifen ORN wieder.

4.3.3.4. Signalkaskade *SOX2* → *ASCL1* → *KIT* → *OMP*

Die bereits beschriebenen Marker *SOX2* (basale Stammzellen), *ASCL1* (früher Vorläufer) und *OMP* (reife ORN) werden mit dem Markergen *KIT* (Basalzellen) im Zusammenhang mit der olfaktorischen Neurogenese näher diskutiert (Abbildung 66). In einer aktuellen Publikation von Goldstein und Kollegen wurde der Einfluss von *KIT* auf das olfaktorische System der Maus näher experimentell untersucht. Sie konnten zeigen, dass *Kit* positive Progenitor Zellen für die Aufrechterhaltung des adulten, olfaktorischen Neuroepithels erforderlich ist. In adulten Tieren, unter normalen Bedingungen, gib es nur eine sehr geringe *Kit* positive Progenitor Zellaktivität. Jedoch werden *Kit* positive Progenitor Zellen nach experimentell induzierter Verletzung aktiviert und stellen die neuronale Population wieder her. Sie kamen zu dem Schluss, dass sich die meisten *Kit* positiven Progenitor Zellen zwischen der Globosen Basalzell Population befindet und auch als Stammzellen fungieren können [172]. In einem Modell beschreiben Krolewski und Kollegen wie die olfaktorische Zelldifferenzierung durch den neuronalen Ausfall in *Ascl1* knockout Mäusen beeinflusst wird. Durch den Verlust von *Ascl1* werden weniger olfaktorische Neurone gebildet und die Abwesenheit dieser Neurone hat einen dramatischen Effekt auf die Differenzierung von vielen anderen Zelltypen des olfaktorischen Epithels. Es kommt zu einer verringerten Population von *Sox2* positiven Horizontalen und Globose Basalzellen. In den *Ascl1* knockout Mäusen kann keine Expression von *Kit* in den Basalzellen detektiert werden, mit der Ausnahme von kleinen Flächen mit aktiver Neurogenese. In diesen Bereichen läuft vermutlich unabhängig vom *Ascl1* Mangel ein alternativer Signalweg über *Kit* ab, der es ermöglicht, olfaktorische Neurone zu bilden [88]. Aufgrund dieser Beobachtungen könnte man vermuten, dass im Differenzierungsprotokoll parallel zu der *ASCL1* vermittelten olfaktorischen Neurogenese auch der *KIT* Signalweg ablaufen kann, über den die reifen ORN gebildet werden. Würde *KIT* eine Art alternativer Signalweg zu *ASCL1* einleiten, wäre ein Expressionsmuster gegensätzlich zu dem von *ASCL1* zu erwarten. Zu den Zeitpunkten, in denen *ASCL1* nicht hoch exprimiert ist würde durch eine erhöhte

Genexpression von *KIT* in dessen Signalweg eingreifen und somit am Ende der Differenzierung *OMP* positive Neurone entstehen. Dies wäre auch plausibel, dass es für die *in vitro* und *in vivo* Neurogenese von olfaktorischen Neuronen nicht nur eine ablaufende Signalkaskade gibt. Wie in Abbildung 66 dargestellt sind bereits mehrere Gene und deren aufeinanderfolgende Signalwege für die Reifung der ORN beschrieben worden. Tatsächlich sieht man auch in dem Verlaufsdiagramm eine wechselseitige Genexpression von *ASCL1* und *KIT*. Besitz *ASCL1* an Tag 33 der Differenzierung eine signifikant erhöhte Expression, ist zu diesem Zeitpunkt *KIT* signifikant herunter reguliert. Dieses Wechselspiel in der Genexpression zeigt sich auch an den folgenden Tagen im Neuronen Stadium. An Tag 89 und 111 der Differenzierung zeigen sich die Genverläufe von *ASCL1* und *KIT* auf einem gleichen niedrigen Level, während die *OMP* Expression zu diesen Zeitpunkten erhöht ist.

4.3.4. Zusammenfassung: Verlaufsanalysen in der gerichteten Differenzierung

Es wurde versucht, publizierte, aufeinanderfolgende Genexpressionskaskaden der olfaktorischen Neurogenese im gerichteten Differenzierungsprotokoll wiederzuspiegeln. Es lässt sich anhand der Ergebnisse sagen, dass

- **es signifikante Veränderungen der Genexpression über die Zeit der Differenzierung gibt**
 - **es keine klar voneinander abgrenzbaren, aufeinanderfolgenden Genexpressionsverläufe gibt**
 - **mehrere Signalwege in der Differenzierung parallel ablaufen**
 - **eine mögliche Ursache in der gemessenen neuronalen Mischpopulation liegt**
 - **es in der Mischpopulation Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien gibt**
- ➔ **es sehr schwierig ist, diese Signalkaskaden in der Differenzierung nachzuvollziehen**

5. Ausblick

5.1. Weitergehende, zeitnahe Versuche

5.1.1. Genauere Charakterisierung der generierten OMP positiven Neurone

Es konnte sowohl auf Genexpressions- als auch auf Protein Ebene gezeigt werden, dass im gerichteten, olfaktorischen Epithel eine erhöhte Anzahl an OMP positiven Neuronen generiert werden konnte. Diese Neurone müssen nun im nächsten Schritt mit den charakteristischen Eigenschaften der sensorischen Neurone des olfaktorischen Epithels verglichen werden. Dazu zählt, dass sie die gleichen Marker (*ATF5*, *TUBB3*, *UCHL1*) exprimieren sollten, die für reife olfaktorische Neurone publiziert sind. Zudem sollten sie auch über die spezifischen Marker für die olfaktorische Signalkaskade verfügen, wie das olfaktorische G-Protein (*GOLF*), die Adenylatzyklase 3 (*ADCY3*), ein Calcium-aktivierter Chloridkanal (*TMEM16B*), oder olfaktorische Rezeptoren (*OR1A1*, *OR1G1*, *OR13C5*).

Sind diese grundlegenden olfaktorischen Marker in den Zellen exprimiert, kann man zu einer funktionellen Beschreibung der Neurone übergehen. Hierbei ist vor allem die elektrophysiologische Charakterisierung von Bedeutung. Man würde bei funktionell aktiven Neurone nach der Zugabe einer Odorantenmischung in das Kulturmedium einen Einstrom von Calcium in das Zytoplasma erwarten, dem die Öffnung von Chloridkanälen und der Ausstrom von Cl⁻-Ionen folgt und somit ein Aktionspotential auslöst. Diesen Nachweis könnte man durch die direkte Ableitung der Ströme einer einzelnen OMP positiven Zelle oder durch das Sichtbarmachen der Calciumströme (Calcium-Imaging) erbringen.

5.1.2. Anreicherung der OMP positiven Zellen

Mithilfe des etablierten Protokolls konnte im Vergleich zu Stammzellen und dem ungerichteten, neuroektodermalen Protokoll mehr OMP positive Zellen generiert werden. Ein noch höherer Prozentsatz an reifen olfaktorischen Neuronen in der Kultur ermöglicht es, ein potentielles Werkzeug für die weitere Forschung zu werden. Diese Anreicherung der sensorischen Neurone kann mit einem Sortierungsschritt innerhalb des Differenzierungsprotokolls erfolgen, wobei nur die Zellen weiter kultiviert werden, die für einen definierten Vorläufermarker, wie *ATF5*, *ASCL1* oder *CALB2* positiv sind. In einem frühen Differenzierungsstadium würde mithilfe von durchflusszytometrischer Sortierung die Zellen, die immunreaktiv gegen den ausgewählten Marker sind, aus der Mischpopulation isoliert und gezielt weiterkultiviert werden. Damit würde man im besten Fall am Ende des Differenzierungsprozesses eine höhere Anzahl der gewünschten olfaktorischen Population erhalten. Neben der immunologischen Färbung der Kultur mit anschließender durchflusszytometrischer Sortierung wäre das Einbringen eines Promotor-Reporter-Konstruktes in die Stammzellen eine weitere Methode zur Aufreinigung der olfaktorischen Zelllinien. Dafür werden stabile Stammzelllinien mit einem lentiviralen Konstrukt erzeugt, die beispielweise eine grünfluoreszierendes (GFP)-Protein bei der Aktivität des OMP-Promotor exprimieren. Sobald der OMP-Promotor in den differenzierenden Zellen aktiv ist wird das GFP-Gen transkribiert, das translatierte Protein verbleibt im Zytoplasma und ist mit einem Fluoreszenzmikroskop detektierbar. Somit können die Zellen aus dem Zellgemisch isoliert werden, die GFP positiv sind. Dies kann auch mit Promotor-Konstrukten erfolgen, die zu einem viel früheren Zeitpunkt in der olfaktorischen Entwicklung, beispielsweise der anterioren Präplakodalen Region, exprimiert werden. Hier wäre der *SIX1*-, oder *SIX4*-Promotor vorstellbar. Damit könnte schon sehr früh in der Differenzierung durch Selektion der fluoreszierenden Zellpopulationen eine reinere Kultur erzielt werden. Es würden nur die olfaktorischen Vorläuferzellen in Kultur bleiben und diese würden zu den reifen Rezeptorneuronen weiter differenziert werden.

5.2. Weitergehende, zeitlich weiter entfernte Versuche

5.2.1. Generierung von Patienten-spezifische Zellen und Nachspielen von Krankheits-Modellen

Das große Potential von induzierten Stammzellen liegt in der Generation von Patienten-spezifischen Zellen. Bei genetisch bedingten Erkrankungen, die beispielsweise auf eine bestimmte Punktmutation zurückzuführen sind, tragen die Keratinozyten, die reprogrammierten Stammzellen und die nachfolgend differenzierten Zellen ebenfalls diese Mutation. Daraus ergibt sich eine große Möglichkeit für die Erzeugung eines humanen, zellulären Modellsystems für spezifische Erkrankungen und zur Entwicklung von Zellersatz Therapien. Da sich unser Forschungsinteresse auf das olfaktorische System fokussiert, bietet sich die Untersuchung von genetisch bedingter Anosmie an. Beim Kallmann Syndrom handelt es sich um eine kongenitale Form der Anosmie, die autosomal dominant mit unvollständiger Expressivität vererbt wird. Bei diesem Krankheitsbild handelt es sich um eine Entwicklungsstörung, die neben der Entwicklung des Riechsystems auch die Produktion von bestimmten Hormonen beeinflusst. Es kommt zu pathologischen Veränderungen des olfaktorischen Systems, wie der Anwesenheit von unreifen Vorläuferzellen, die keine Zilien aufweisen oder einer reduzierten Anzahl von reifen olfaktorischen Neuronen. Es kann auch zu einem vollständigen Verlust des olfaktorischen Systems kommt aufgrund von Anomalitäten in der Entwicklung des olfaktorischen und des Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) Signalweges kommen. Während der Embryogenese wachsen olfaktorische und GnRH Neurone von der gleichen Stammzellpopulation aus der olfaktorischen Plakode aus. GnRH Neurone wandern dann in den Hypothalamus, während die Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone zum Bulbus Olfactorius wandern. Finden in dieser frühen embryonalen Entwicklung Störungen statt, können diese zum Kallmann Syndrom führen. Die betroffenen Patienten weisen Punktmutationen in den Genen *KAL1*, *ANOS1* und *FGFR1* (20 %), Prokineticin2 (*PROK2*) und seinem Rezeptor (*PROKR2*) (10 %) auf. Darüber hinaus sind Mutationen im *FGF8* Gen bekannt. Mit einem etablierten olfaktorischen Differenzierungsprotokoll lassen sich Patienten-spezifische ORN Kulturen generieren, die als zelluläres Modellsystem für Störungen des olfaktorischen Systems dienen können. Im direkten Vergleich zwischen Kontroll- und Patienten Zellen wären mögliche Untersuchungsparameter die Markergen Expression von frühen unreifen Zellen oder die Anzahl von reifen und unreifen Rezeptorneuronen.

5.2.2. Versuche zur adulten Neurogenese

Ein klinisch interessantes Forschungsgebiet mit Teilaspekten des olfaktorischen Systems sind die olfaktorischen Hüllzellen, die die Fila Olfactoria umgeben. Diese besitzen neben den Rezeptorneuronen ebenfalls die Fähigkeit zu einer lebenslangen Erneuerung. In aktuellen klinischen Studien werden die olfaktorischen Hüllzellen von Patienten isoliert, die an einer Rückenmarksverletzung oder degenerativen Motoneuron-Erkrankungen leiden und in die geschädigte Stelle des Rückenmarks transplantiert. Es kam zum teilweisen Zusammenwachsen der geschädigten Nervenfasern und Empfindungen in den unteren Extremitäten. Der große Vorteil dieser Hüllzellen liegt darin, dass diese Zellen ohne großen operativen Eingriff leicht in der Nasenhöhle zu erreichen sind. Zudem werden sie aus dem eigenen olfaktorischen Epithel entnommen und stammen somit von dem jeweiligen Patienten direkt ab, was eine autologe Transplantation ermöglicht und möglichen Abstoßungsreaktionen vorbeugt. Jedoch ist wenig Wissen über die Entstehung, der Funktionsweise, der adulten Neurogenese und dem Zusammenwirken zwischen den Hüllzellen und den Rezeptorneuronen vorhanden, weshalb es für die kommende Forschung und klinischen Behandlungen wichtig ist, an *in vitro* generierten olfaktorischen Neurone diese noch offenen Fragen zu klären.

6. Literaturverzeichnis

1. Smith, Z.D., C. Sindhu, and A. Meissner, *Molecular features of cellular reprogramming and development*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(3): p. 139-54.
2. Mitalipov, S. and D. Wolf, *Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2009. **114**: p. 185-99.
3. Bai, Q., et al., *Embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells? A DNA integrity perspective*. Curr Gene Ther, 2013. **13**(2): p. 93-8.
4. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
5. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
6. Park, I.H., et al., *Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors*. Nature, 2008. **451**(7175): p. 141-6.
7. Looijenga, L.H., et al., *POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(9): p. 2244-50.
8. Pesce, M. and H.R. Scholer, *Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development*. Stem Cells, 2001. **19**(4): p. 271-8.
9. Draper, J.S., et al., *Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture*. J Anat, 2002. **200**(Pt 3): p. 249-58.
10. Pan, G. and J.A. Thomson, *Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency*. Cell Res, 2007. **17**(1): p. 42-9.
11. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
12. Raab, S., et al., *A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation*. Stem Cells Int, 2014. **2014**: p. 768391.
13. Huangfu, D., et al., *Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(7): p. 795-7.
14. Bhutani, N., et al., *Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation*. Nature, 2010. **463**(7284): p. 1042-7.
15. Randall, V.A., *Androgens and hair growth*. Dermatol Ther, 2008. **21**(5): p. 314-28.
16. Aasen, T., et al., *Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(11): p. 1276-84.
17. Aasen, T. and J.C. Izpisua Belmonte, *Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells*. Nat Protoc, 2010. **5**(2): p. 371-82.
18. Stein, G.S., et al., *The architectural organization of human stem cell cycle regulatory machinery*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(13): p. 1679-85.
19. Assou, S., et al., *A meta-analysis of human embryonic stem cells transcriptome integrated into a web-based expression atlas*. Stem Cells, 2007. **25**(4): p. 961-73.
20. Marti, M., et al., *Characterization of pluripotent stem cells*. Nat Protoc, 2013. **8**(2): p. 223-53.
21. Frank, S., et al., *Small molecule-assisted, line-independent maintenance of human pluripotent stem cells in defined conditions*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41958.
22. Hochedlinger, K. and K. Plath, *Epigenetic reprogramming and induced pluripotency*. Development, 2009. **136**(4): p. 509-23.
23. Henderson, J.K., et al., *Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens*. Stem Cells, 2002. **20**(4): p. 329-37.
24. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 313-7.

25. Schopperle, W.M. and W.C. DeWolf, *The TRA-1-60 and TRA-1-81 human pluripotent stem cell markers are expressed on podocalyxin in embryonal carcinoma*. *Stem Cells*, 2007. **25**(3): p. 723-30.
26. Lee, D.S., et al., *An epigenomic roadmap to induced pluripotency reveals DNA methylation as a reprogramming modulator*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 5619.
27. Lian, X., et al., *Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions*. *Nat Protoc*, 2013. **8**(1): p. 162-75.
28. Katsuda, T., Y. Sakai, and T. Ochiya, *Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes as an alternative to human adult hepatocytes*. *J Stem Cells*, 2012. **7**(1): p. 1-17.
29. Ghaedi, M., et al., *Human iPS cell-derived alveolar epithelium repopulates lung extracellular matrix*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(11): p. 4950-62.
30. Kim, J.E., et al., *Investigating synapse formation and function using human pluripotent stem cell-derived neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(7): p. 3005-10.
31. Nejadnik, H., et al., *Improved approach for chondrogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells*. *Stem Cell Rev*, 2015. **11**(2): p. 242-53.
32. Hu, B.Y., et al., *Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(9): p. 4335-40.
33. Clarke, D.L., et al., *Generalized potential of adult neural stem cells*. *Science*, 2000. **288**(5471): p. 1660-3.
34. Brugmann, S.A. and S.A. Moody, *Induction and specification of the vertebrate ectodermal placodes: precursors of the cranial sensory organs*. *Biol Cell*, 2005. **97**(5): p. 303-19.
35. Esteve, P. and P. Bovolenta, *cSix4, a member of the six gene family of transcription factors, is expressed during placode and somite development*. *Mech Dev*, 1999. **85**(1-2): p. 161-5.
36. Mishima, N. and S. Tomarev, *Chicken Eyes absent 2 gene: isolation and expression pattern during development*. *Int J Dev Biol*, 1998. **42**(8): p. 1109-15.
37. Streit, A., *The cranial sensory nervous system: specification of sensory progenitors and placodes*. *Stem Book*, 2008.
38. Saint-Jeannet, J.P. and S.A. Moody, *Establishing the pre-placodal region and breaking it into placodes with distinct identities*. *Dev Biol*, 2014. **389**(1): p. 13-27.
39. Bailey, A.P., et al., *Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity*. *Dev Cell*, 2006. **11**(4): p. 505-17.
40. Kobayashi, M., et al., *Expression of three zebrafish Six4 genes in the cranial sensory placodes and the developing somites*. *Mech Dev*, 2000. **98**(1-2): p. 151-5.
41. Pandur, P.D. and S.A. Moody, *Xenopus Six1 gene is expressed in neurogenic cranial placodes and maintained in the differentiating lateral lines*. *Mech Dev*, 2000. **96**(2): p. 253-7.
42. McLarren, K.W., A. Litsiou, and A. Streit, *DLX5 positions the neural crest and preplacode region at the border of the neural plate*. *Dev Biol*, 2003. **259**(1): p. 34-47.
43. Cuschieri, A. and L.H. Bannister, *The development of the olfactory mucosa in the mouse: light microscopy*. *J Anat*, 1975. **119**(Pt 2): p. 277-86.
44. Klein, S.L. and P.P. Graziadei, *The differentiation of the olfactory placode in Xenopus laevis: a light and electron microscope study*. *J Comp Neurol*, 1983. **217**(1): p. 17-30.
45. Mulrenin, E.M., J.W. Witkin, and A.J. Silverman, *Embryonic development of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system in the chick: a spatio-temporal analysis of GnRH neuronal generation, site of origin, and migration*. *Endocrinology*, 1999. **140**(1): p. 422-33.
46. Hilal, E.M., J.H. Chen, and A.J. Silverman, *Joint migration of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and neuropeptide Y (NPY) neurons from olfactory placode to central nervous system*. *J Neurobiol*, 1996. **31**(4): p. 487-502.
47. Toba, Y., et al., *Immunohistochemical localization of calbindin D-28k in the migratory pathway from the rat olfactory placode*. *J Neuroendocrinol*, 2001. **13**(8): p. 683-94.

48. Farbman, A.I., *Developmental biology of olfactory sensory neurons*. Semin Cell Biol, 1994. **5**(1): p. 3-10.
49. Schwob, J.E., *Neural regeneration and the peripheral olfactory system*. Anat Rec, 2002. **269**(1): p. 33-49.
50. Graziadei, P.P. and G.A. Graziadei, *Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons*. J Neurocytol, 1979. **8**(1): p. 1-18.
51. Smith, T.D. and K.P. Bhatnagar, *The human vomeronasal organ. Part II: prenatal development*. J Anat, 2000. **197 Pt 3**: p. 421-36.
52. Fields, K.L. and M. Dammerman, *A monoclonal antibody equivalent to anti-rat neural antigen-1 as a marker for Schwann cells*. Neuroscience, 1985. **15**(3): p. 877-85.
53. Kim, C.H., et al., *Early development of the nose in human embryos: a stereomicroscopic and histologic analysis*. Laryngoscope, 2004. **114**(10): p. 1791-800.
54. Beites, C.L., et al., *Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium*. Exp Cell Res, 2005. **306**(2): p. 309-16.
55. Balmer, C.W. and A.S. LaMantia, *Noses and neurons: induction, morphogenesis, and neuronal differentiation in the peripheral olfactory pathway*. Dev Dyn, 2005. **234**(3): p. 464-81.
56. Litsiou, A., S. Hanson, and A. Streit, *A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head*. Development, 2005. **132**(18): p. 4051-62.
57. Niswander, L. and G.R. Martin, *Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse*. Development, 1992. **114**(3): p. 755-68.
58. Streit, A. and C.D. Stern, *Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: involvement of FGF and BMP activity*. Mech Dev, 1999. **82**(1-2): p. 51-66.
59. Ahrens, K. and G. Schlosser, *Tissues and signals involved in the induction of placodal Six1 expression in Xenopus laevis*. Dev Biol, 2005. **288**(1): p. 40-59.
60. Sjodal, M., T. Edlund, and L. Gunhaga, *Time of exposure to BMP signals plays a key role in the specification of the olfactory and lens placodes ex vivo*. Dev Cell, 2007. **13**(1): p. 141-9.
61. Burd, G.D., *Development of the olfactory nerve in the clawed frog, Xenopus laevis: II. Effects of hypothyroidism*. J Comp Neurol, 1992. **315**(3): p. 255-63.
62. Knecht, A.K. and M. Bronner-Fraser, *Induction of the neural crest: a multigene process*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 453-61.
63. LaMantia, A.S., et al., *Mesenchymal/epithelial induction mediates olfactory pathway formation*. Neuron, 2000. **28**(2): p. 411-25.
64. Rawson, N.E. and A.S. LaMantia, *Once and again: retinoic acid signaling in the developing and regenerating olfactory pathway*. J Neurobiol, 2006. **66**(7): p. 653-76.
65. Paschaki, M., et al., *Retinoic acid regulates olfactory progenitor cell fate and differentiation*. Neural Dev, 2013. **8**: p. 13.
66. Holbrook, E.H., et al., *Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue*. Laryngoscope, 2011. **121**(8): p. 1687-701.
67. Moran, D.T., et al., *The fine structure of the olfactory mucosa in man*. J Neurocytol, 1982. **11**(5): p. 721-46.
68. Murrell, W., et al., *Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa*. Dev Dyn, 2005. **233**(2): p. 496-515.
69. Murdoch, B. and A.J. Roskams, *Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology*. J Mol Histol, 2007. **38**(6): p. 581-99.
70. Holbrook, E.H., K.E. Szumowski, and J.E. Schwob, *An immunochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium*. J Comp Neurol, 1995. **363**(1): p. 129-46.
71. Carter, L.A., J.L. MacDonald, and A.J. Roskams, *Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype*. J Neurosci, 2004. **24**(25): p. 5670-83.
72. Mackay-Sim, A., *Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa*. Arch Ital Biol, 2010. **148**(2): p. 47-58.

73. Suzuki, J., et al., *Neural crest-derived horizontal basal cells as tissue stem cells in the adult olfactory epithelium*. *Neurosci Res*, 2013. **75**(2): p. 112-20.
74. Fletcher, R.B., et al., *p63 regulates olfactory stem cell self-renewal and differentiation*. *Neuron*, 2011. **72**(5): p. 748-59.
75. Chen, X., H. Fang, and J.E. Schwob, *Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium*. *J Comp Neurol*, 2004. **469**(4): p. 457-74.
76. Schwartz Levey, M., D.M. Chikaraishi, and J.S. Kauer, *Characterization of potential precursor populations in the mouse olfactory epithelium using immunocytochemistry and autoradiography*. *J Neurosci*, 1991. **11**(11): p. 3556-64.
77. Goldstein, B.J., et al., *Transplantation of multipotent progenitors from the adult olfactory epithelium*. *Neuroreport*, 1998. **9**(7): p. 1611-7.
78. Mackay-Sim, A. and P. Kittel, *Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographic study*. *J Neurosci*, 1991. **11**(4): p. 979-84.
79. Jang, W., K.P. Kim, and J.E. Schwob, *Nonintegrin laminin receptor precursor protein is expressed on olfactory stem and progenitor cells*. *J Comp Neurol*, 2007. **502**(3): p. 367-81.
80. Nelson, J., et al., *The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease*. *Biosci Rep*, 2008. **28**(1): p. 33-48.
81. Huard, J.M., et al., *Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells*. *J Comp Neurol*, 1998. **400**(4): p. 469-86.
82. Caggiano, M., J.S. Kauer, and D.D. Hunter, *Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus*. *Neuron*, 1994. **13**(2): p. 339-52.
83. Verhaagen, J., et al., *The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats*. *J Neurosci*, 1989. **9**(2): p. 683-91.
84. Roskams, A.J., X. Cai, and G.V. Ronnett, *Expression of neuron-specific beta-III tubulin during olfactory neurogenesis in the embryonic and adult rat*. *Neuroscience*, 1998. **83**(1): p. 191-200.
85. Cau, E., S. Casarosa, and F. Guillemot, *Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage*. *Development*, 2002. **129**(8): p. 1871-80.
86. Fode, C., et al., *The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons*. *Neuron*, 1998. **20**(3): p. 483-94.
87. Ma, Q., et al., *Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands*. *J Neurosci*, 1997. **17**(10): p. 3644-52.
88. Krolewski, R.C., et al., *Ascl1 (Mash1) knockout perturbs differentiation of nonneuronal cells in olfactory epithelium*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e51737.
89. Manglapus, G.L., S.L. Youngentob, and J.E. Schwob, *Expression patterns of basic helix-loop-helix transcription factors define subsets of olfactory progenitor cells*. *J Comp Neurol*, 2004. **479**(2): p. 216-33.
90. Packard, A., et al., *Progenitor cell capacity of NeuroD1-expressing globose basal cells in the mouse olfactory epithelium*. *J Comp Neurol*, 2011. **519**(17): p. 3580-96.
91. Miyata, T., T. Maeda, and J.E. Lee, *NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus*. *Genes Dev*, 1999. **13**(13): p. 1647-52.
92. Cau, E., et al., *Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors*. *Development*, 1997. **124**(8): p. 1611-21.
93. Wei, H., M.F. Lang, and X. Jiang, *Calretinin is expressed in the intermediate cells during olfactory receptor neuron development*. *Neurosci Lett*, 2013. **542**: p. 42-6.
94. Angelastro, J.M., et al., *Regulated expression of ATF5 is required for the progression of neural progenitor cells to neurons*. *J Neurosci*, 2003. **23**(11): p. 4590-600.
95. Wang, S.Z., et al., *Transcription factor ATF5 is required for terminal differentiation and survival of olfactory sensory neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(45): p. 18589-94.

96. Hansen, M.B., et al., *Mouse Atf5: molecular cloning of two novel mRNAs, genomic organization, and odorant sensory neuron localization*. Genomics, 2002. **80**(3): p. 344-50.
97. Katsetos, C.D., M.M. Herman, and S.J. Mork, *Class III beta-tubulin in human development and cancer*. Cell Motil Cytoskeleton, 2003. **55**(2): p. 77-96.
98. Lee, M.K., et al., *The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis*. Cell Motil Cytoskeleton, 1990. **17**(2): p. 118-32.
99. Lewis, S.A., M.G. Lee, and N.J. Cowan, *Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development*. J Cell Biol, 1985. **101**(3): p. 852-61.
100. Lee, V.M. and S.K. Pixley, *Age and differentiation-related differences in neuron-specific tubulin immunostaining of olfactory sensory neurons*. Brain Res Dev Brain Res, 1994. **83**(2): p. 209-15.
101. Cunningham, B.A., et al., *Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing*. Science, 1987. **236**(4803): p. 799-806.
102. Paz, D.A., et al., *Expression of isoforms of the neural cell adhesion molecule (NCAM) and polysialic acid during the development of the Bufo arenarum olfactory system*. Int J Dev Biol, 1995. **39**(6): p. 1005-13.
103. Miragall, F., et al., *Expression of cell adhesion molecules in the olfactory system of the adult mouse: presence of the embryonic form of N-CAM*. Dev Biol, 1988. **129**(2): p. 516-31.
104. Gong, Q. and M.T. Shipley, *Expression of extracellular matrix molecules and cell surface molecules in the olfactory nerve pathway during early development*. J Comp Neurol, 1996. **366**(1): p. 1-14.
105. Chuah, M.I., A.I. Farbman, and B.P. Menco, *Influence of olfactory bulb on dendritic knob density of rat olfactory receptor neurons in vitro*. Brain Res, 1985. **338**(2): p. 259-66.
106. Buck, L. and R. Axel, *A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition*. Cell, 1991. **65**(1): p. 175-87.
107. Mombaerts, P., *Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited*. Curr Opin Neurobiol, 2004. **14**(1): p. 31-6.
108. Margolis, F.L., *Solid-phase radioimmune assay. Using 3 H-labeled antigen for the mouse olfactory bulb specific protein*. Anal Biochem, 1972. **50**(2): p. 602-7.
109. Danciger, E., et al., *Olfactory marker protein gene: its structure and olfactory neuron-specific expression in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(21): p. 8565-9.
110. Farbman, A.I. and F.L. Margolis, *Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization*. Dev Biol, 1980. **74**(1): p. 205-15.
111. Verhaagen, J., et al., *Neuroplasticity in the olfactory system: differential effects of central and peripheral lesions of the primary olfactory pathway on the expression of B-50/GAP43 and the olfactory marker protein*. J Neurosci Res, 1990. **26**(1): p. 31-44.
112. Baker, H., M. Grillo, and F.L. Margolis, *Biochemical and immunocytochemical characterization of olfactory marker protein in the rodent central nervous system*. J Comp Neurol, 1989. **285**(2): p. 246-61.
113. Graziadei, G.A., R.S. Stanley, and P.P. Graziadei, *The olfactory marker protein in the olfactory system of the mouse during development*. Neuroscience, 1980. **5**(7): p. 1239-52.
114. Reisert, J., K.W. Yau, and F.L. Margolis, *Olfactory marker protein modulates the cAMP kinetics of the odour-induced response in cilia of mouse olfactory receptor neurons*. J Physiol, 2007. **585**(Pt 3): p. 731-40.
115. St John, J.A. and B. Key, *Olfactory marker protein modulates primary olfactory axon overshooting in the olfactory bulb*. J Comp Neurol, 2005. **488**(1): p. 61-9.
116. Lee, A.C., J. He, and M. Ma, *Olfactory marker protein is critical for functional maturation of olfactory sensory neurons and development of mother preference*. J Neurosci, 2011. **31**(8): p. 2974-82.
117. Kwon, H.J., et al., *Ca extrusion by NCX is compromised in olfactory sensory neurons of OMP mice*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4260.

118. Youngentob, S.L. and F.L. Margolis, *OMP gene deletion causes an elevation in behavioral threshold sensitivity*. Neuroreport, 1999. **10**(1): p. 15-9.
119. Youngentob, S.L., F.L. Margolis, and L.M. Youngentob, *OMP gene deletion results in an alteration in odorant quality perception*. Behav Neurosci, 2001. **115**(3): p. 626-31.
120. Scholz, P., et al., *Transcriptome Analysis of Murine Olfactory Sensory Neurons during Development Using Single Cell RNA-Seq*. Chem Senses, 2016.
121. Jones, D.T. and R.R. Reed, *Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction*. Science, 1989. **244**(4906): p. 790-5.
122. Wekesa, K.S. and R.R. Anholt, *Differential expression of G proteins in the mouse olfactory system*. Brain Res, 1999. **837**(1-2): p. 117-26.
123. Belluscio, L., et al., *Mice deficient in G(olf) are anosmic*. Neuron, 1998. **20**(1): p. 69-81.
124. Rafols, J.A. and T.V. Getchell, *Morphological relations between the receptor neurons, sustentacular cells and Schwann cells in the olfactory mucosa of the salamander*. Anat Rec, 1983. **206**(1): p. 87-101.
125. Costanzo, R.M. and E.E. Morrison, *Three-dimensional scanning electron microscopic study of the normal hamster olfactory epithelium*. J Neurocytol, 1989. **18**(3): p. 381-91.
126. Forni, P.E., et al., *Neural crest and ectodermal cells intermix in the nasal placode to give rise to GnRH-1 neurons, sensory neurons, and olfactory ensheathing cells*. J Neurosci, 2011. **31**(18): p. 6915-27.
127. Hempstead, J.L. and J.I. Morgan, *Monoclonal antibodies to the rat olfactory sustentacular cell*. Brain Res, 1983. **288**(1-2): p. 289-95.
128. Goldstein, B.J. and J.E. Schwob, *Analysis of the globose basal cell compartment in rat olfactory epithelium using GBC-1, a new monoclonal antibody against globose basal cells*. J Neurosci, 1996. **16**(12): p. 4005-16.
129. Doucette, J.R., *The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb*. Anat Rec, 1984. **210**(2): p. 385-91.
130. Ramon-Cueto, A. and M. Nieto-Sampedro, *Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells*. Neuroscience, 1992. **47**(1): p. 213-20.
131. Mackay-Sim, A. and J.A. St John, *Olfactory ensheathing cells from the nose: clinical application in human spinal cord injuries*. Exp Neurol, 2011. **229**(1): p. 174-80.
132. Lindsay, S.L., J.S. Riddell, and S.C. Barnett, *Olfactory mucosa for transplant-mediated repair: a complex tissue for a complex injury?* Glia, 2010. **58**(2): p. 125-34.
133. Raisman, G., *Olfactory ensheathing cells - another miracle cure for spinal cord injury?* Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(5): p. 369-75.
134. Au, E. and A.J. Roskams, *Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro*. Glia, 2003. **41**(3): p. 224-36.
135. Barnett, S.C. and J.S. Riddell, *Olfactory ensheathing cells (OECs) and the treatment of CNS injury: advantages and possible caveats*. J Anat, 2004. **204**(1): p. 57-67.
136. Miller, M.L., et al., *Microvillar cells of the olfactory epithelium: morphology and regeneration following exposure to toxic compounds*. Brain Res, 1995. **669**(1): p. 1-9.
137. Moran, D.T., J.C. Rowley, 3rd, and B.W. Jafek, *Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: the microvillar cell*. Brain Res, 1982. **253**(1-2): p. 39-46.
138. Lin, W., et al., *TRPM5-expressing microvillous cells in the main olfactory epithelium*. BMC Neurosci, 2008. **9**: p. 114.
139. Tegoni, M., et al., *Mammalian odorant binding proteins*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1482**(1-2): p. 229-40.
140. Hermann, A., et al., *Mesodermal cell types induce neurogenesis from adult human hippocampal progenitor cells*. J Neurochem, 2006. **98**(2): p. 629-40.
141. Kirschenbaum, B., et al., *In vitro neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain*. Cereb Cortex, 1994. **4**(6): p. 576-89.

142. Westerlund, U., et al., *Stem cells from the adult human brain develop into functional neurons in culture*. *Exp Cell Res*, 2003. **289**(2): p. 378-83.
143. Arsenijevic, Y., et al., *Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain*. *Exp Neurol*, 2001. **170**(1): p. 48-62.
144. Petreanu, L. and A. Alvarez-Buylla, *Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction*. *J Neurosci*, 2002. **22**(14): p. 6106-13.
145. Wolozin, B., et al., *Continuous culture of neuronal cells from adult human olfactory epithelium*. *J Mol Neurosci*, 1992. **3**(3): p. 137-46.
146. Warlich, E., et al., *Lentiviral vector design and imaging approaches to visualize the early stages of cellular reprogramming*. *Mol Ther*, 2011. **19**(4): p. 782-9.
147. Quintana-Urzaínqui, I., I. Rodríguez-Moldes, and E. Candal, *Developmental, tract-tracing and immunohistochemical study of the peripheral olfactory system in a basal vertebrate: insights on Pax6 neurons migrating along the olfactory nerve*. *Brain Struct Funct*, 2014. **219**(1): p. 85-104.
148. Calof, A.L., et al., *Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage*. *Microsc Res Tech*, 2002. **58**(3): p. 176-88.
149. Ekberg, J.A., et al., *OMP-ZsGreen fluorescent protein transgenic mice for visualisation of olfactory sensory neurons in vivo and in vitro*. *J Neurosci Methods*, 2011. **196**(1): p. 88-98.
150. Zhang, P., et al., *Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells*. *Blood*, 2008. **111**(4): p. 1933-41.
151. Kawauchi, S., et al., *Fgf8 expression defines a morphogenetic center required for olfactory neurogenesis and nasal cavity development in the mouse*. *Development*, 2005. **132**(23): p. 5211-23.
152. Cornesse, Y., T. Pieler, and T. Hollemann, *Olfactory and lens placode formation is controlled by the hedgehog-interacting protein (Xhip) in Xenopus*. *Dev Biol*, 2005. **277**(2): p. 296-315.
153. Gokoffski, K.K., et al., *Activin and GDF11 collaborate in feedback control of neuroepithelial stem cell proliferation and fate*. *Development*, 2011. **138**(19): p. 4131-42.
154. Kawauchi, S., et al., *Foxg1 promotes olfactory neurogenesis by antagonizing Gdf11*. *Development*, 2009. **136**(9): p. 1453-64.
155. Guo, Z., et al., *Expression of pax6 and sox2 in adult olfactory epithelium*. *J Comp Neurol*, 2010. **518**(21): p. 4395-418.
156. Wong, S.T., et al., *Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice*. *Neuron*, 2000. **27**(3): p. 487-97.
157. Weiler, E. and A. Benali, *Olfactory epithelia differentially express neuronal markers*. *J Neurocytol*, 2005. **34**(3-5): p. 217-40.
158. Wu, H.H., et al., *Autoregulation of neurogenesis by GDF11*. *Neuron*, 2003. **37**(2): p. 197-207.
159. Goldstein, B.J., et al., *Contribution of Polycomb group proteins to olfactory basal stem cell self-renewal in a novel c-KIT+ culture model and in vivo*. *Development*, 2016. **143**(23): p. 4394-4404.
160. Leung, A.W., D. Kent Morest, and J.Y. Li, *Differential BMP signaling controls formation and differentiation of multipotent preplacodal ectoderm progenitors from human embryonic stem cells*. *Dev Biol*, 2013. **379**(2): p. 208-20.
161. Wilson, P.G. and S.S. Stice, *Development and differentiation of neural rosettes derived from human embryonic stem cells*. *Stem Cell Rev*, 2006. **2**(1): p. 67-77.
162. Yuan, S.H., et al., *Cell-surface marker signatures for the isolation of neural stem cells, glia and neurons derived from human pluripotent stem cells*. *PLoS One*, 2011. **6**(3): p. e17540.
163. Numakawa, T., et al., *BDNF function and intracellular signaling in neurons*. *Histol Histopathol*, 2010. **25**(2): p. 237-58.
164. Matheson, C.R., et al., *Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a neurotrophic factor for sensory neurons: comparison with the effects of the neurotrophins*. *J Neurobiol*, 1997. **32**(1): p. 22-32.
165. Eng, L.F., R.S. Ghirnikar, and Y.L. Lee, *Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)*. *Neurochem Res*, 2000. **25**(9-10): p. 1439-51.

166. Lu, Q.R., et al., *Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system*. *Neuron*, 2000. **25**(2): p. 317-29.
167. Ichikawa, T., et al., *Localization of two cholinergic markers, choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in the central nervous system of the rat: in situ hybridization histochemistry and immunohistochemistry*. *J Chem Neuroanat*, 1997. **13**(1): p. 23-39.
168. Cossette, M., D. Levesque, and A. Parent, *Neurochemical characterization of dopaminergic neurons in human striatum*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2005. **11**(5): p. 277-86.
169. Arcelli, P., et al., *GABAergic neurons in mammalian thalamus: a marker of thalamic complexity?* *Brain Res Bull*, 1997. **42**(1): p. 27-37.
170. Hetzenauer, A., et al., *Individual contribution of metabotropic glutamate receptor (mGlu) 2 and 3 to c-Fos expression pattern evoked by mGlu2/3 antagonism*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2008. **201**(1): p. 1-13.
171. Carriedo, S.G., H.Z. Yin, and J.H. Weiss, *Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro*. *J Neurosci*, 1996. **16**(13): p. 4069-79.
172. Goldstein, B.J., et al., *Adult c-Kit(+) progenitor cells are necessary for maintenance and regeneration of olfactory neurons*. *J Comp Neurol*, 2015. **523**(1): p. 15-31.
173. Sun, N., et al., *Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(37): p. 15720-5.
174. Piao, Y., et al., *Efficient generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from keratinocytes by simple transfection of episomal vectors*. *Stem Cells Transl Med*, 2014. **3**(7): p. 787-91.
175. Jaenisch, R. and R. Young, *Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming*. *Cell*, 2008. **132**(4): p. 567-82.
176. Liu, P., et al., *Passage number is a major contributor to genomic structural variations in mouse iPSCs*. *Stem Cells*, 2014. **32**(10): p. 2657-67.
177. Bar-Nur, O., et al., *Lineage conversion induced by pluripotency factors involves transient passage through an iPSC stage*. *Nat Biotechnol*, 2015. **33**(7): p. 761-8.
178. Brambrink, T., et al., *Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells*. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(2): p. 151-9.
179. Hansson, J., et al., *Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency*. *Cell Rep*, 2012. **2**(6): p. 1579-92.
180. ten Berge, D., et al., *Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies*. *Cell Stem Cell*, 2008. **3**(5): p. 508-18.
181. Pispas, J. and I. Thesleff, *Mechanisms of ectodermal organogenesis*. *Dev Biol*, 2003. **262**(2): p. 195-205.
182. Zorn, A.M. and J.M. Wells, *Vertebrate endoderm development and organ formation*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009. **25**: p. 221-51.
183. Doss, M.X., et al., *Specific gene signatures and pathways in mesodermal cells and their derivatives derived from embryonic stem cells*. *Stem Cell Rev*, 2012. **8**(1): p. 43-54.
184. Pekkanen-Mattila, M., et al., *Spatial and temporal expression pattern of germ layer markers during human embryonic stem cell differentiation in embryoid bodies*. *Histochem Cell Biol*, 2010. **133**(5): p. 595-606.
185. Shao, H., et al., *Generation and characterization of mouse parthenogenetic embryonic stem cells containing genomes from non-growing and fully grown oocytes*. *Cell Biol Int*, 2007. **31**(11): p. 1336-44.
186. Lai, D., et al., *Derivation and characterization of human embryonic stem cells on human amnion epithelial cells*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 10014.
187. Chakraborty, S., et al., *A robust strategy for negative selection of Cre-loxP recombination-based excision of transgenes in induced pluripotent stem cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e64342.
188. Tonge, P.D., et al., *Corrigendum: Divergent reprogramming routes lead to alternative stem-cell states*. *Nature*, 2015. **523**(7562): p. 626.

189. Singh, U., et al., *Novel live alkaline phosphatase substrate for identification of pluripotent stem cells*. Stem Cell Rev, 2012. **8**(3): p. 1021-9.
190. Limat, A. and F.K. Noser, *Serial cultivation of single keratinocytes from the outer root sheath of human scalp hair follicles*. J Invest Dermatol, 1986. **87**(4): p. 485-8.
191. Zare, S., et al., *Isolation, cultivation and transfection of human keratinocytes*. Cell Biol Int, 2014. **38**(4): p. 444-51.
192. Reinhardt, P., et al., *Derivation and expansion using only small molecules of human neural progenitors for neurodegenerative disease modeling*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59252.
193. Denham, M. and M. Dottori, *Neural differentiation of induced pluripotent stem cells*. Methods Mol Biol, 2011. **793**: p. 99-110.
194. Qu, Q., et al., *High-efficiency motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells and the function of Islet-1*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3449.
195. Bushdid, C., et al., *Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli*. Science, 2014. **343**(6177): p. 1370-2.
196. Gonzalez, R., et al., *Dorsomorphin promotes human embryonic stem cell self-renewal*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(15): p. 3439-41.
197. Hao, J., et al., *Dorsomorphin, a selective small molecule inhibitor of BMP signaling, promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2904.
198. Zhang, M., H.R. Scholer, and B. Greber, *Rapid and efficient generation of neurons from human pluripotent stem cells in a multititre plate format*. J Vis Exp, 2013(73): p. e4335.
199. Sato, H., et al., *Microfabric Vessels for Embryoid Body Formation and Rapid Differentiation of Pluripotent Stem Cells*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 31063.
200. Dhara, S.K. and S.L. Stice, *Neural differentiation of human embryonic stem cells*. J Cell Biochem, 2008. **105**(3): p. 633-40.
201. Xie, C., W.R. Markesbery, and M.A. Lovell, *Survival of hippocampal and cortical neurons in a mixture of MEM+ and B27-supplemented neurobasal medium*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(5): p. 665-72.
202. Wu, J.Q., et al., *Dynamic transcriptomes during neural differentiation of human embryonic stem cells revealed by short, long, and paired-end sequencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(11): p. 5254-9.
203. Chambers, S.M., et al., *Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors*. Nat Biotechnol, 2012. **30**(7): p. 715-20.
204. Chambers, S.M., et al., *Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(3): p. 275-80.
205. Vallier, L., M. Alexander, and R.A. Pedersen, *Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 19): p. 4495-509.
206. Elkabetz, Y., et al., *Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage*. Genes Dev, 2008. **22**(2): p. 152-65.
207. Grabiec, M., et al., *Stage-specific roles of FGF2 signaling in human neural development*. Stem Cell Res, 2016. **17**(2): p. 330-341.
208. Chen, C.W., et al., *The signals of FGFs on the neurogenesis of embryonic stem cells*. J Biomed Sci, 2010. **17**: p. 33.
209. Hu, B.Y. and S.C. Zhang, *Directed differentiation of neural-stem cells and subtype-specific neurons from hESCs*. Methods Mol Biol, 2010. **636**: p. 123-37.
210. Komada, M., *Sonic hedgehog signaling coordinates the proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells by regulating cell cycle kinetics during development of the neocortex*. Congenit Anom (Kyoto), 2012. **52**(2): p. 72-7.
211. Choudhry, Z., et al., *Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network*. Ann Neurosci, 2014. **21**(1): p. 28-31.
212. Gong, Q., H. Chen, and A.I. Farbman, *Olfactory sensory axon growth and branching is influenced by sonic hedgehog*. Dev Dyn, 2009. **238**(7): p. 1768-76.

213. Tonge, P.D. and P.W. Andrews, *Retinoic acid directs neuronal differentiation of human pluripotent stem cell lines in a non-cell-autonomous manner*. *Differentiation*, 2010. **80**(1): p. 20-30.
214. Theus, M.H., et al., *Critical roles of Src family tyrosine kinases in excitatory neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells*. *Exp Cell Res*, 2006. **312**(16): p. 3096-107.
215. Chuang, J.H., L.C. Tung, and Y. Lin, *Neural differentiation from embryonic stem cells in vitro: An overview of the signaling pathways*. *World J Stem Cells*, 2015. **7**(2): p. 437-47.
216. Meyers, E.N., M. Lewandoski, and G.R. Martin, *An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination*. *Nat Genet*, 1998. **18**(2): p. 136-41.
217. Maier, E., et al., *Opposing Fgf and Bmp activities regulate the specification of olfactory sensory and respiratory epithelial cell fates*. *Development*, 2010. **137**(10): p. 1601-11.
218. Tucker, E.S., et al., *Proliferative and transcriptional identity of distinct classes of neural precursors in the mammalian olfactory epithelium*. *Development*, 2010. **137**(15): p. 2471-81.
219. Hardelin, J.P. and C. Dode, *The complex genetics of Kallmann syndrome: KAL1, FGFR1, FGF8, PROKR2, PROKR2, et al*. *Sex Dev*, 2008. **2**(4-5): p. 181-93.
220. Forni, P.E., et al., *The indirect role of fibroblast growth factor-8 in defining neurogenic niches of the olfactory/GnRH systems*. *J Neurosci*, 2013. **33**(50): p. 19620-34.
221. Peretto, P., et al., *BMP mRNA and protein expression in the developing mouse olfactory system*. *J Comp Neurol*, 2002. **451**(3): p. 267-78.
222. Bertacchi, M., et al., *Activin/Nodal Signaling Supports Retinal Progenitor Specification in a Narrow Time Window during Pluripotent Stem Cell Neuralization*. *Stem Cell Reports*, 2015. **5**(4): p. 532-45.
223. Brown, C.W., et al., *Activins are critical modulators of growth and survival*. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(12): p. 2404-17.
224. Dugan, L.L., et al., *Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(36): p. 25842-8.
225. Jia, C., A.R. Cussen, and C.C. Hegg, *ATP differentially upregulates fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor alpha in neonatal and adult mice: effect on neuroproliferation*. *Neuroscience*, 2011. **177**: p. 335-46.
226. Newman, M.P., F. Feron, and A. Mackay-Sim, *Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium*. *Neuroscience*, 2000. **99**(2): p. 343-50.
227. Buckland, M.E. and A.M. Cunningham, *Alterations in expression of the neurotrophic factors glial cell line-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor, in the target-deprived olfactory neuroepithelium*. *Neuroscience*, 1999. **90**(1): p. 333-47.
228. Chen, B., E.H. Kim, and P.X. Xu, *Initiation of olfactory placode development and neurogenesis is blocked in mice lacking both Six1 and Six4*. *Dev Biol*, 2009. **326**(1): p. 75-85.
229. Moody, S.A. and A.S. LaMantia, *Transcriptional regulation of cranial sensory placode development*. *Curr Top Dev Biol*, 2015. **111**: p. 301-50.
230. Ohto, H., et al., *Cooperation of six and eya in activation of their target genes through nuclear translocation of Eya*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(10): p. 6815-24.
231. Fougousse, F., et al., *Six and Eya expression during human somitogenesis and MyoD gene family activation*. *J Muscle Res Cell Motil*, 2002. **23**(3): p. 255-64.
232. Ealy, M., et al., *Single-cell analysis delineates a trajectory toward the human early otic lineage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(30): p. 8508-13.
233. Whitlock, K.E., *A new model for olfactory placode development*. *Brain Behav Evol*, 2004. **64**(3): p. 126-40.
234. Itskovitz-Eldor, J., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers*. *Mol Med*, 2000. **6**(2): p. 88-95.
235. Leahy, A., et al., *Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation*. *J Exp Zool*, 1999. **284**(1): p. 67-81.

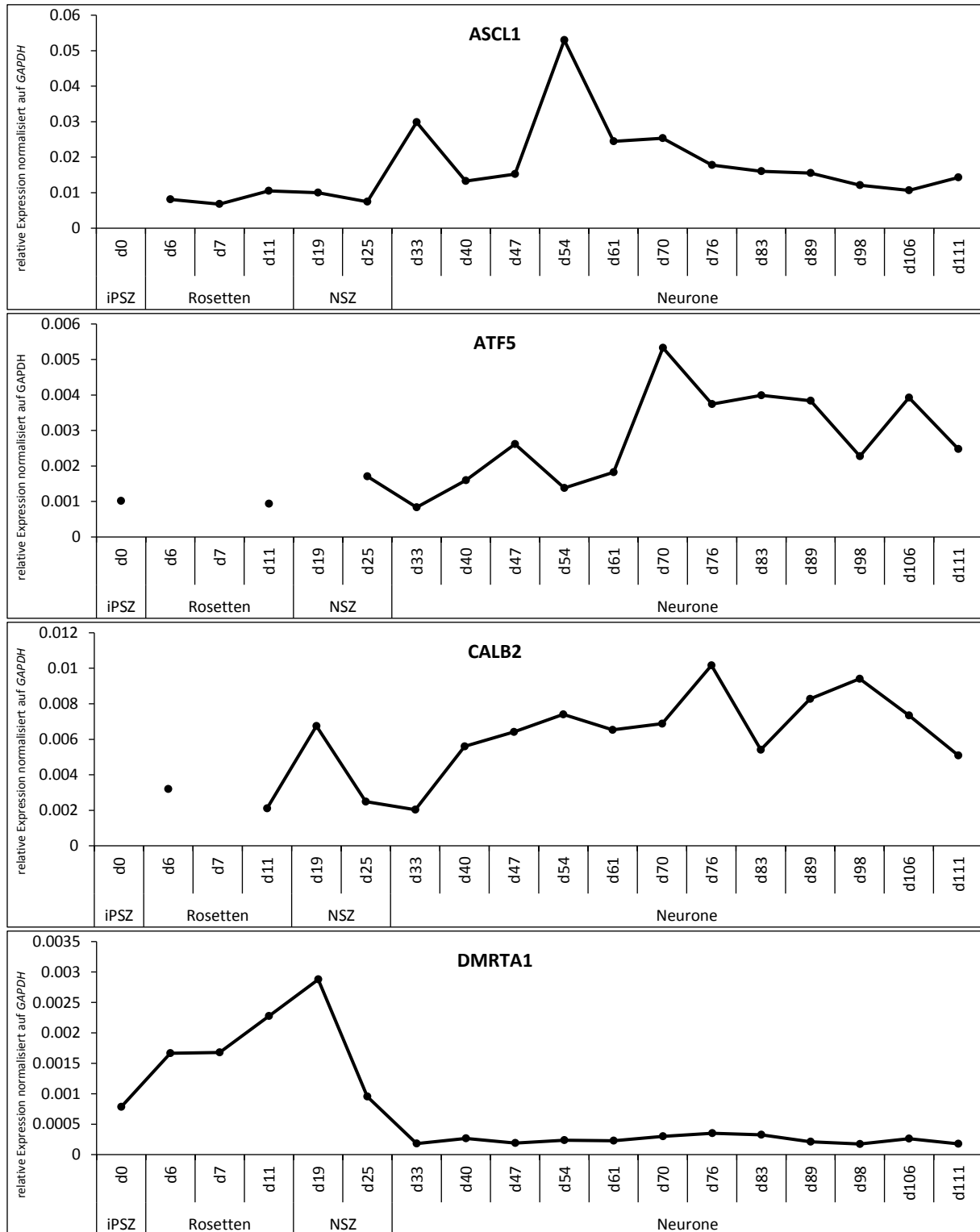
236. Keller, G.M., *In vitro differentiation of embryonic stem cells*. Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(6): p. 862-9.
237. Esner, M., et al., *Targeted disruption of fibroblast growth factor receptor-1 blocks maturation of visceral endoderm and cavitation in mouse embryoid bodies*. Int J Dev Biol, 2002. **46**(6): p. 817-25.
238. Chen, Y., et al., *Fibroblast growth factor (FGF) signaling through PI 3-kinase and Akt/PKB is required for embryoid body differentiation*. Oncogene, 2000. **19**(33): p. 3750-6.
239. Gerrard, L., L. Rodgers, and W. Cui, *Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling*. Stem Cells, 2005. **23**(9): p. 1234-41.
240. Zhang, J. and L. Li, *BMP signaling and stem cell regulation*. Dev Biol, 2005. **284**(1): p. 1-11.
241. Wiles, M.V. and G. Keller, *Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture*. Development, 1991. **111**(2): p. 259-67.
242. Lendahl, U., L.B. Zimmerman, and R.D. McKay, *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. Cell, 1990. **60**(4): p. 585-95.
243. Battiste, J., et al., *Ascl1 defines sequentially generated lineage-restricted neuronal and oligodendrocyte precursor cells in the spinal cord*. Development, 2007. **134**(2): p. 285-93.
244. Zhang, S.C., et al., *In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(12): p. 1129-33.
245. M, L.V., *Neural stem cells* StemCell Technologies, 2015.
246. Hulspas, R. and P.J. Quesenberry, *Characterization of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry*. Cytometry, 2000. **40**(3): p. 245-50.
247. Wright, L.S., et al., *Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor*. J Neurochem, 2003. **86**(1): p. 179-95.
248. Thiel, G., *How Sox2 maintains neural stem cell identity*. Biochem J, 2013. **450**(3): p. e1-2.
249. Marei, H.E. and A.E. Ahmed, *Transcription factors expressed in embryonic and adult olfactory bulb neural stem cells reveal distinct proliferation, differentiation and epigenetic control*. Genomics, 2013. **101**(1): p. 12-9.
250. von Bohlen Und Halbach, O., *Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus*. Cell Tissue Res, 2007. **329**(3): p. 409-20.
251. McIntyre, J.C., W.B. Titlow, and T.S. McClintock, *Axon growth and guidance genes identify nascent, immature, and mature olfactory sensory neurons*. J Neurosci Res, 2010. **88**(15): p. 3243-56.
252. Boutin, C., et al., *NeuroD1 induces terminal neuronal differentiation in olfactory neurogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(3): p. 1201-6.
253. Hosomi, S., et al., *The p75 receptor is required for BDNF-induced differentiation of neural precursor cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(4): p. 1011-5.
254. Thompson, R.J., et al., *PGP 9.5--a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells*. Brain Res, 1983. **278**(1-2): p. 224-8.
255. Pombal, M.A., et al., *Immunocytochemical localization of calretinin in the olfactory system of the adult lamprey, Lampetra fluviatilis*. Brain Res Bull, 2002. **57**(3-4): p. 281-3.
256. Brandt, M.D., et al., *Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice*. Mol Cell Neurosci, 2003. **24**(3): p. 603-13.
257. Zhang, S. and W. Cui, *Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation*. World J Stem Cells, 2014. **6**(3): p. 305-11.

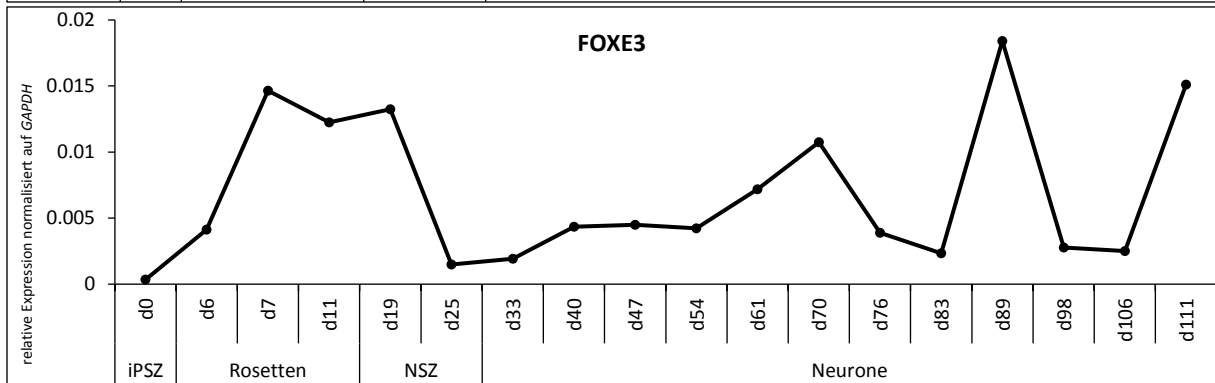
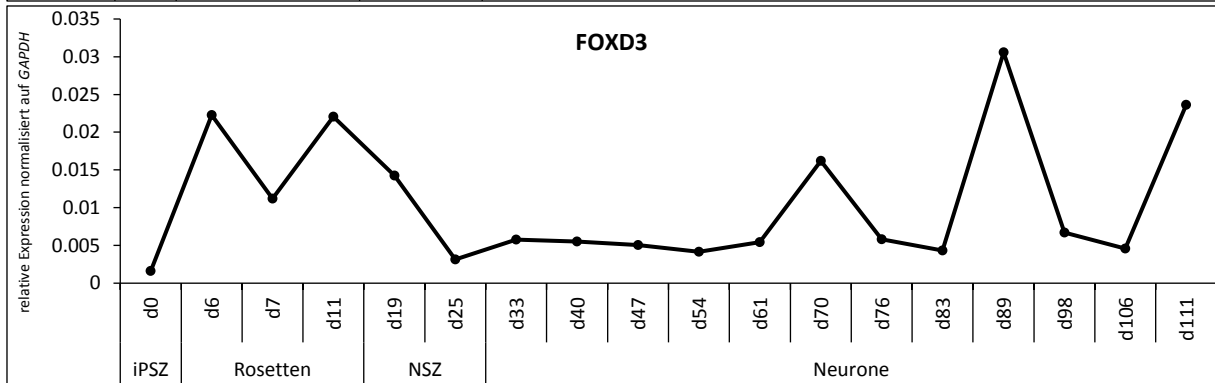
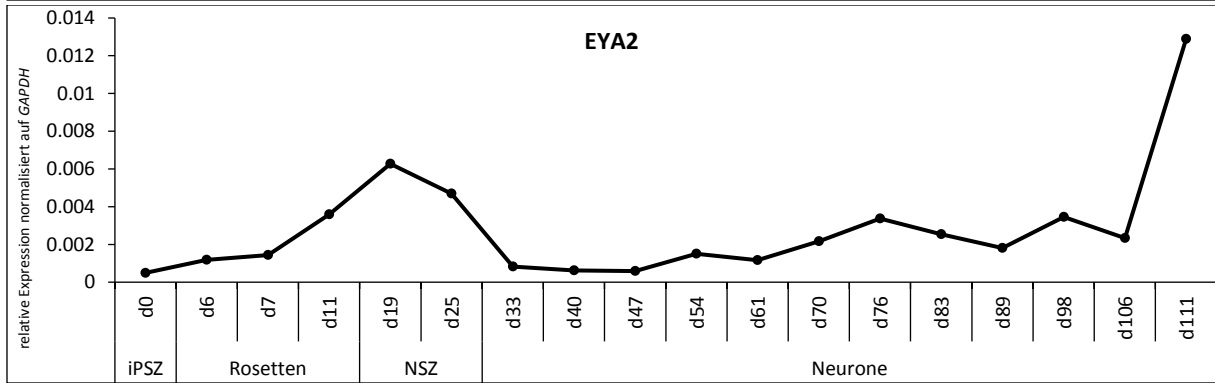
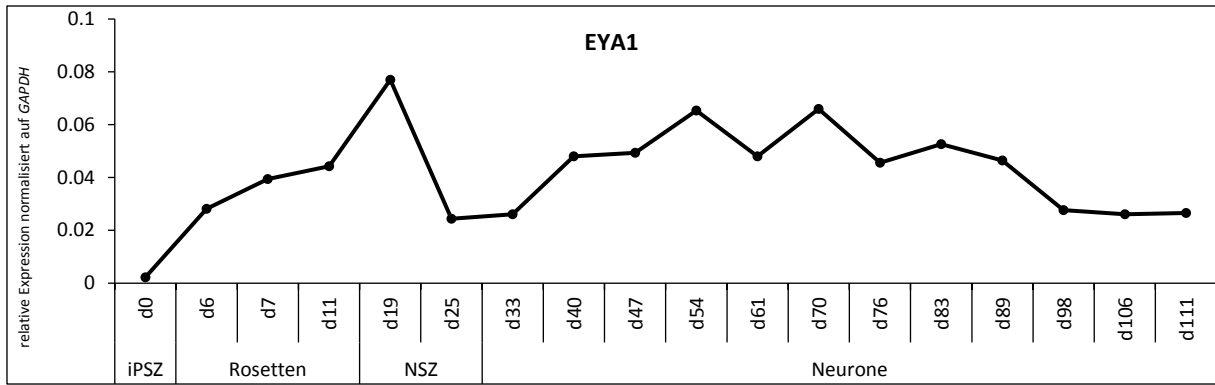
Handbook of Olfaction and Gustation, Richard L. Doty, Dritte Auflage 2015, Kapitel 4.

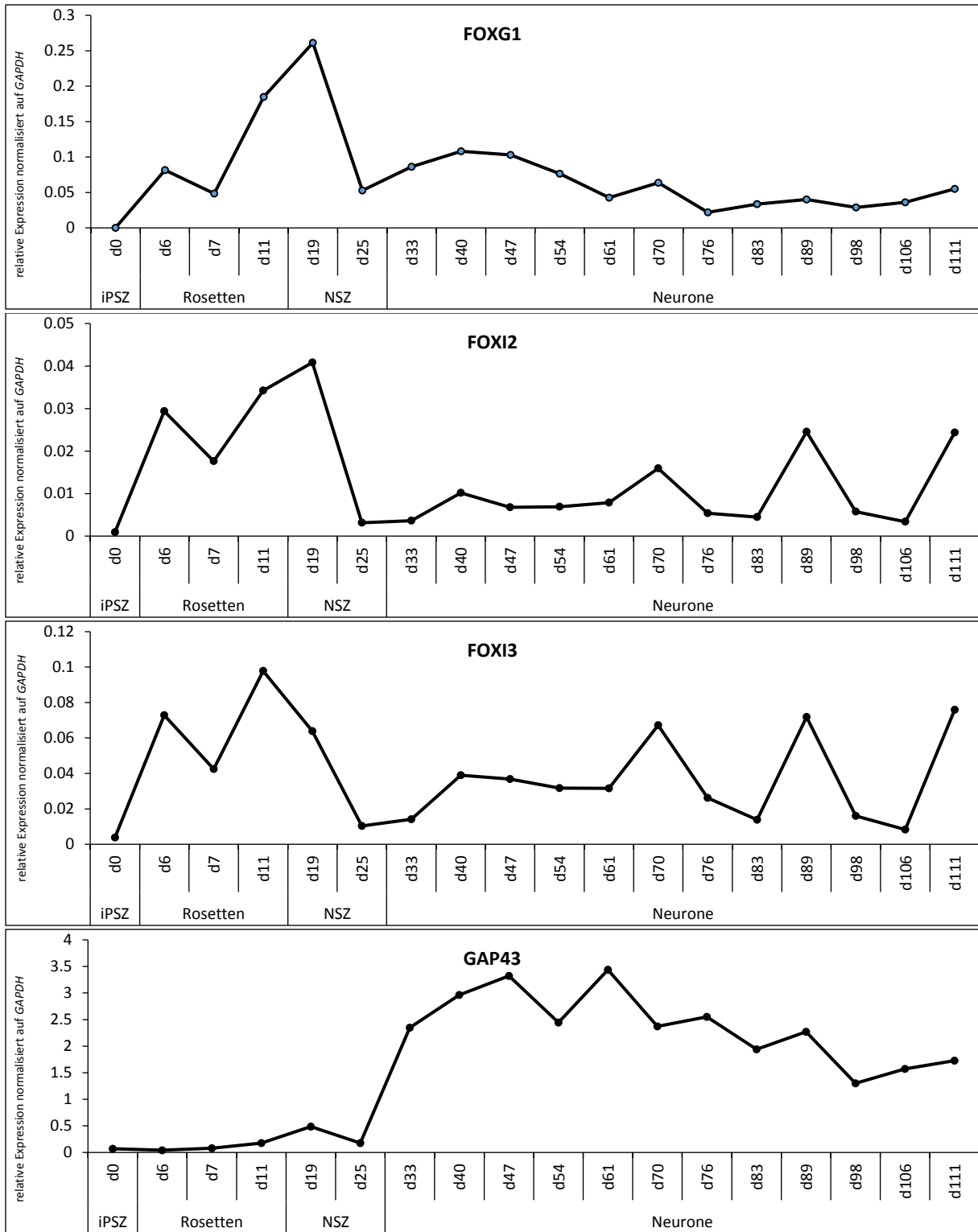
7. Anhang

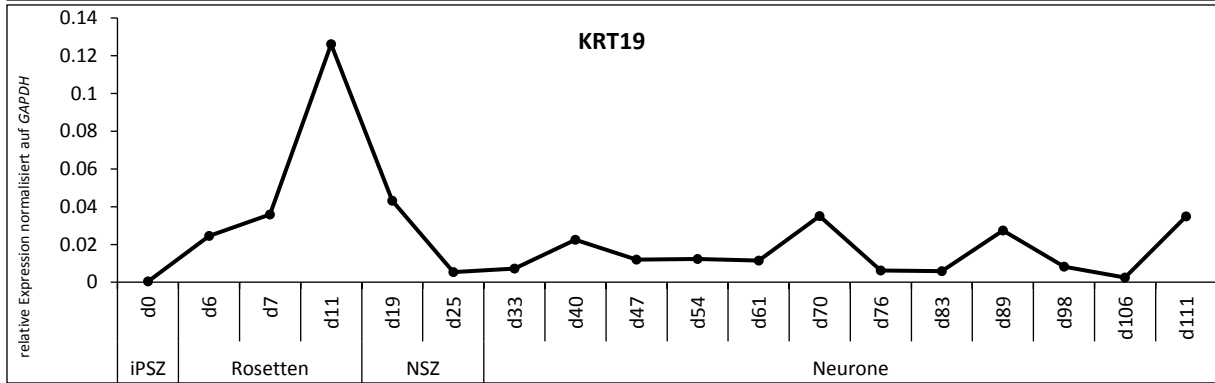
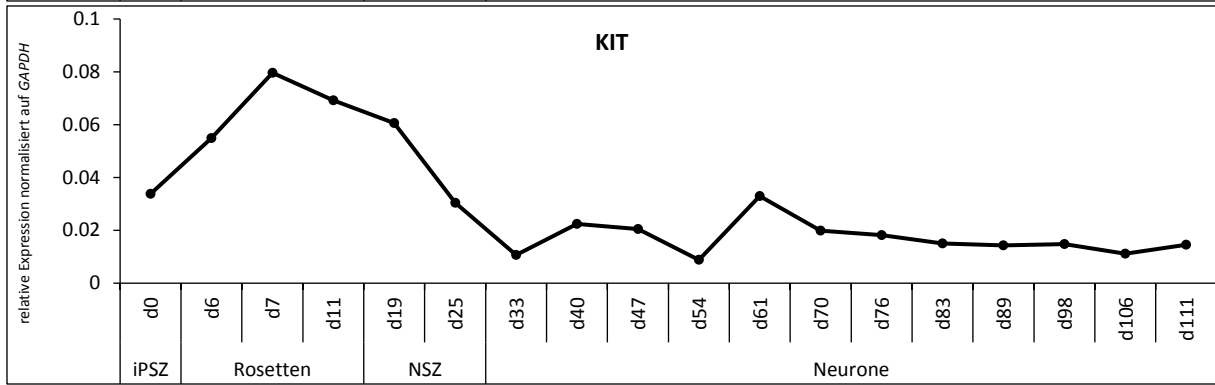
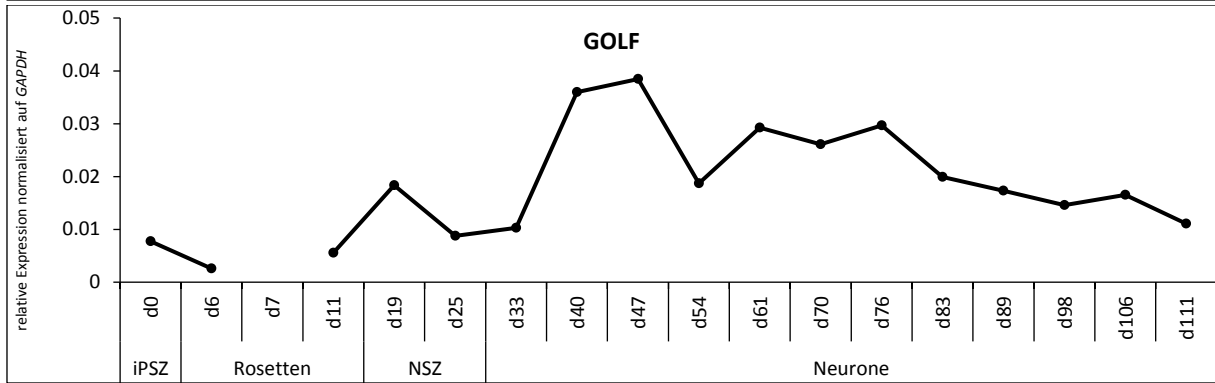
7.2. Verlaufsdiagramme von untersuchten Genen der Genexpressionsanalyse

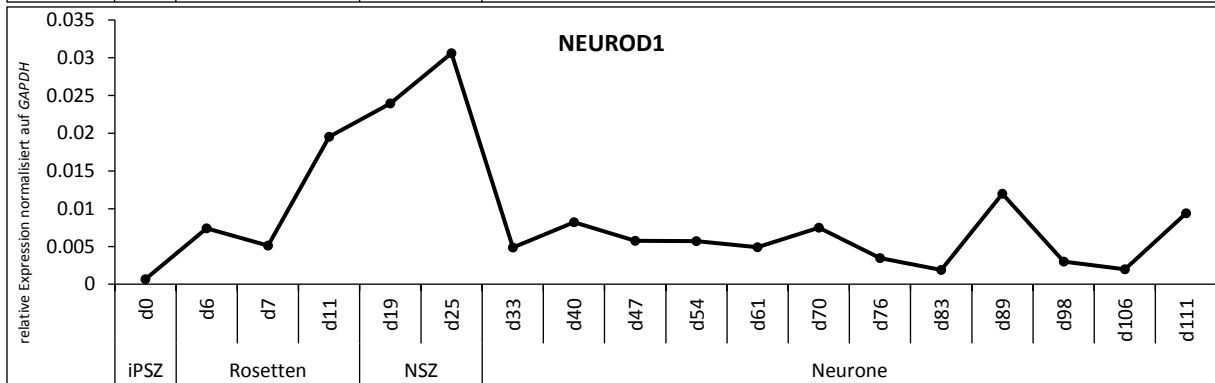
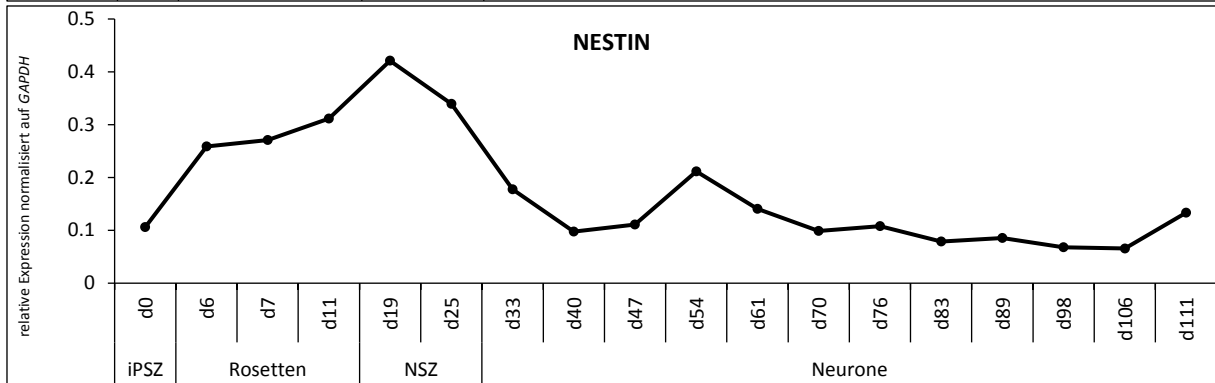
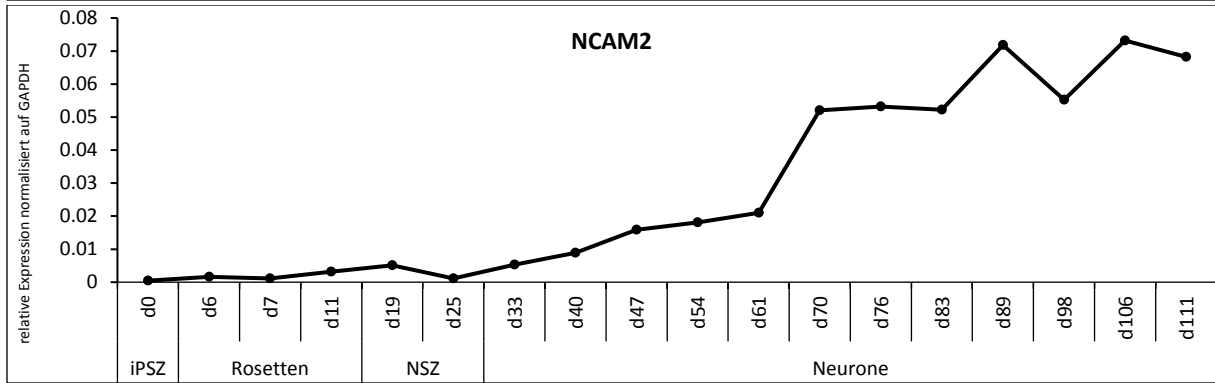
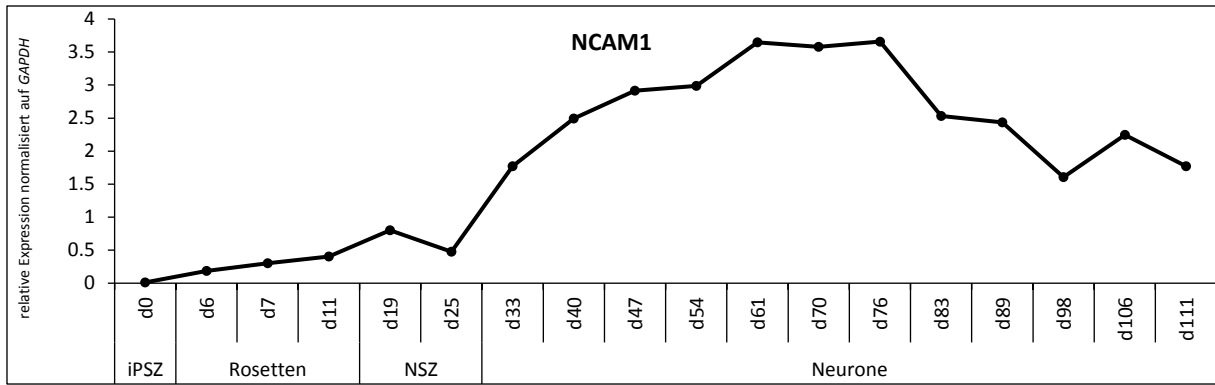
Die Grafiken zeigen die absolute Genexpression, intern verrechnet mit dem Referenzgen *GAPDH*. Von den Verlaufskurven der dargestellten Gene wurden Ausschnitte bereits gezeigt und diskutiert.

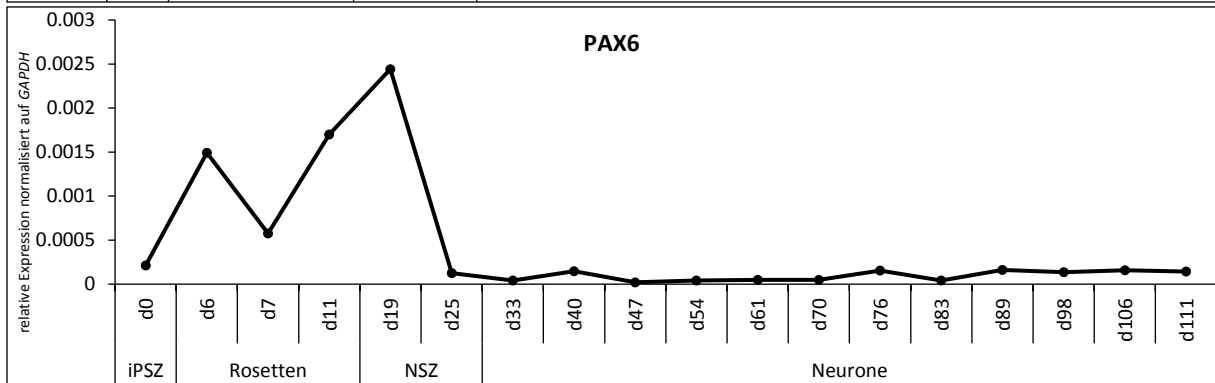
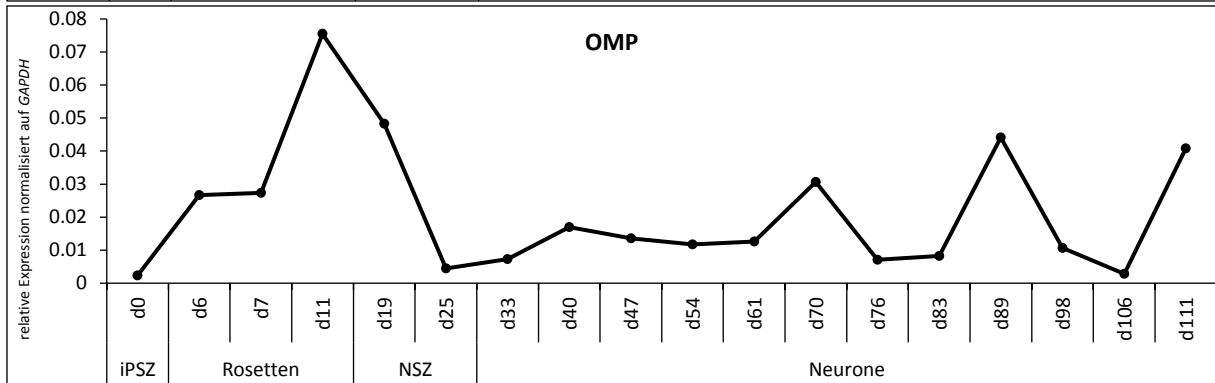
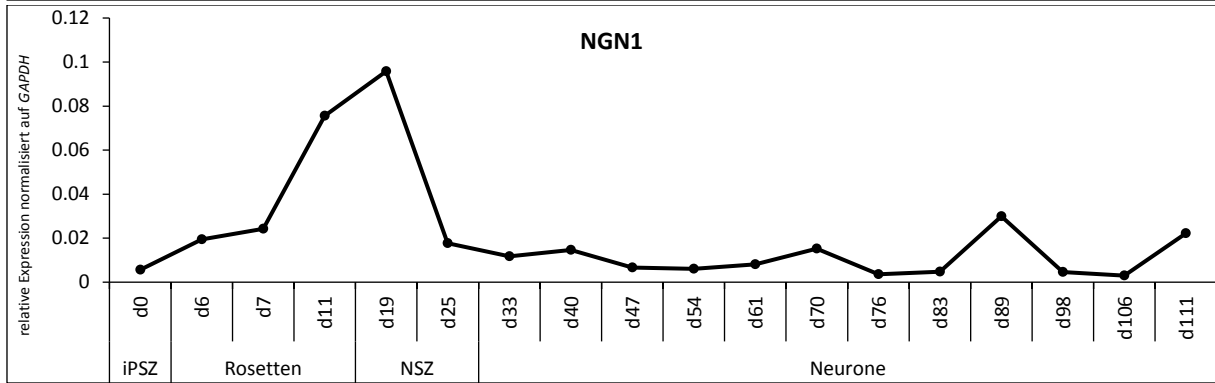
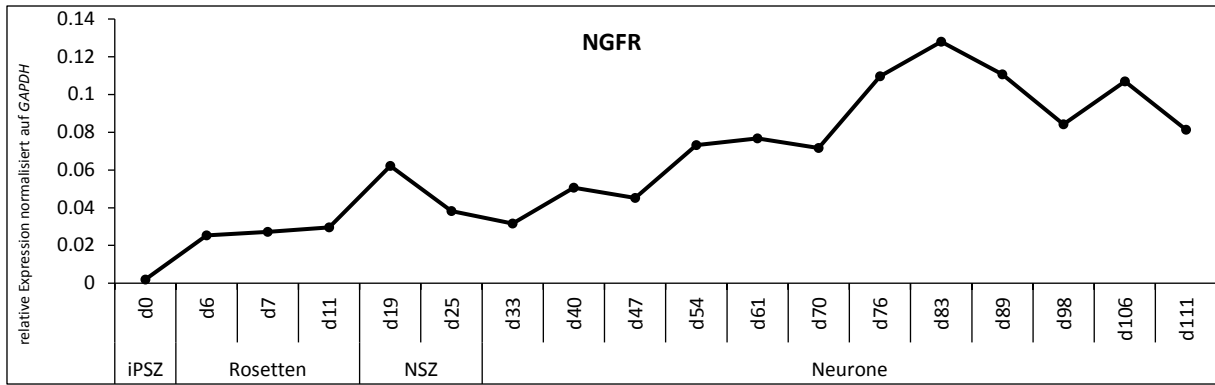


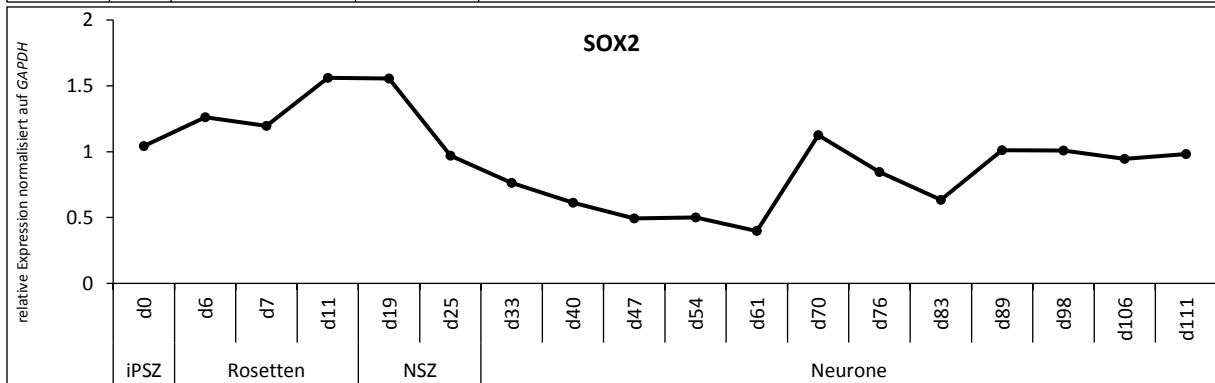
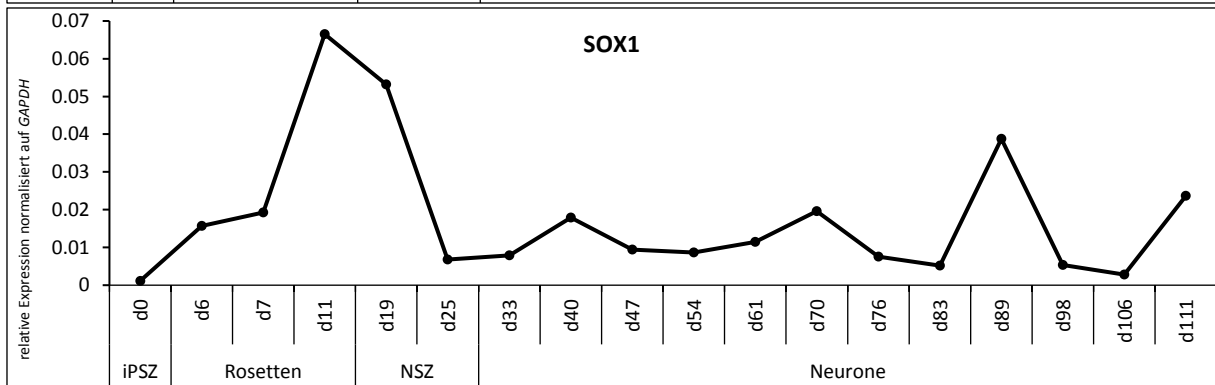
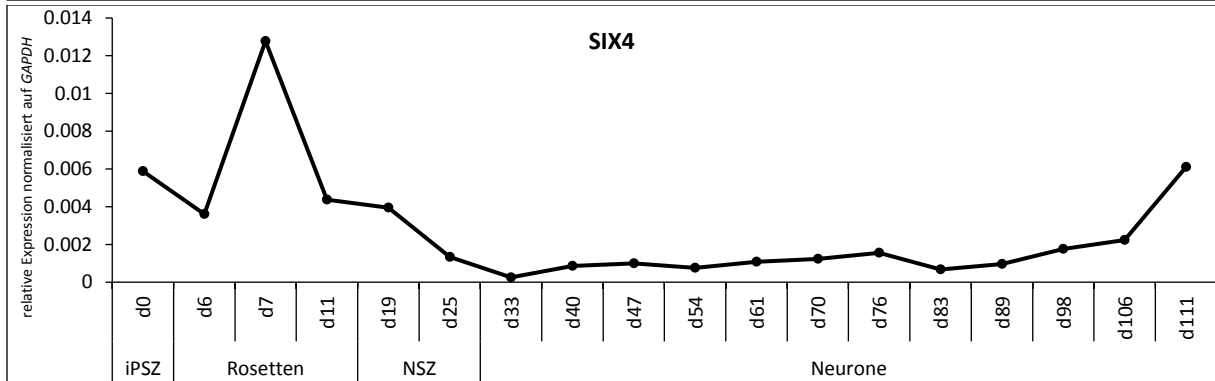
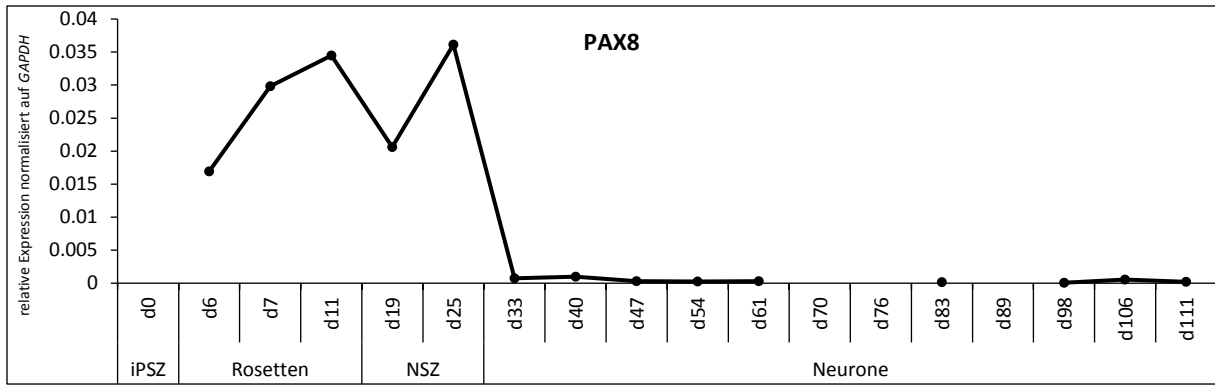


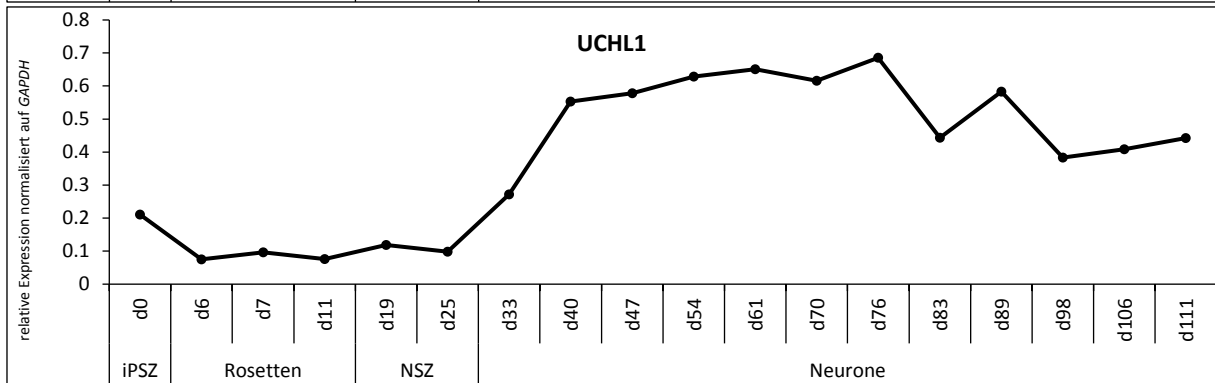
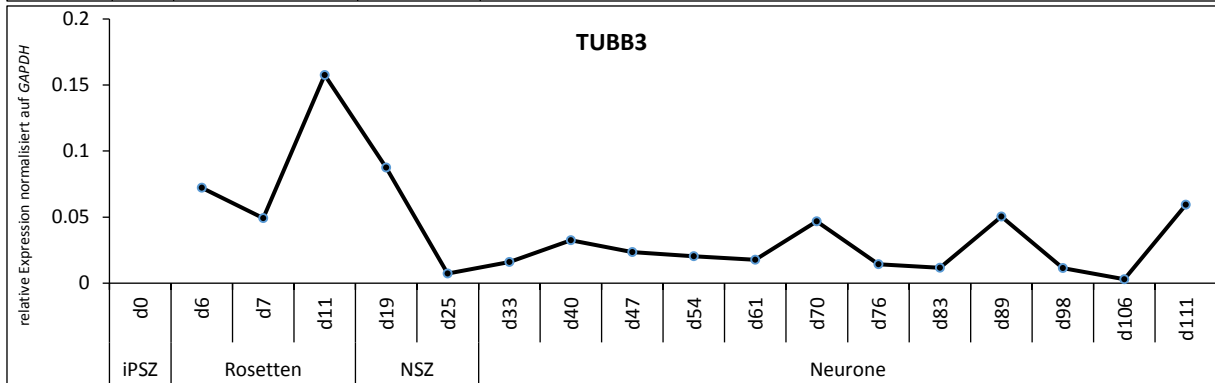
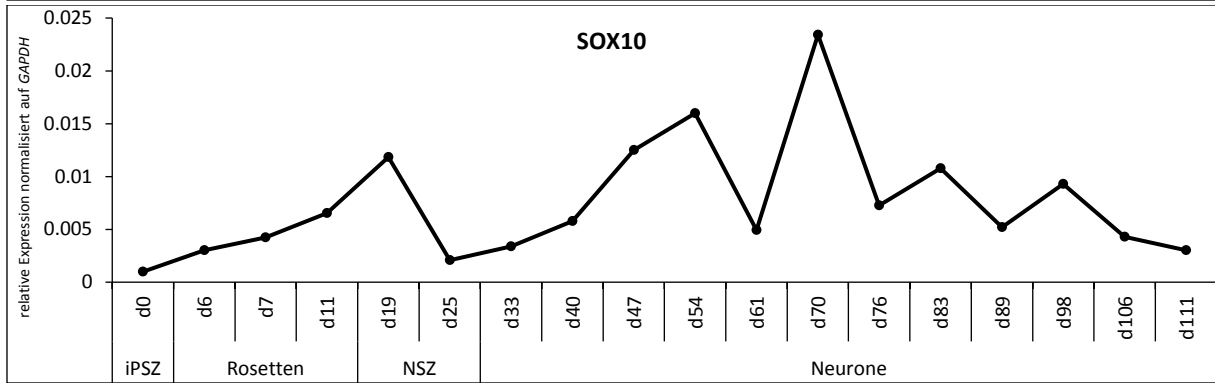
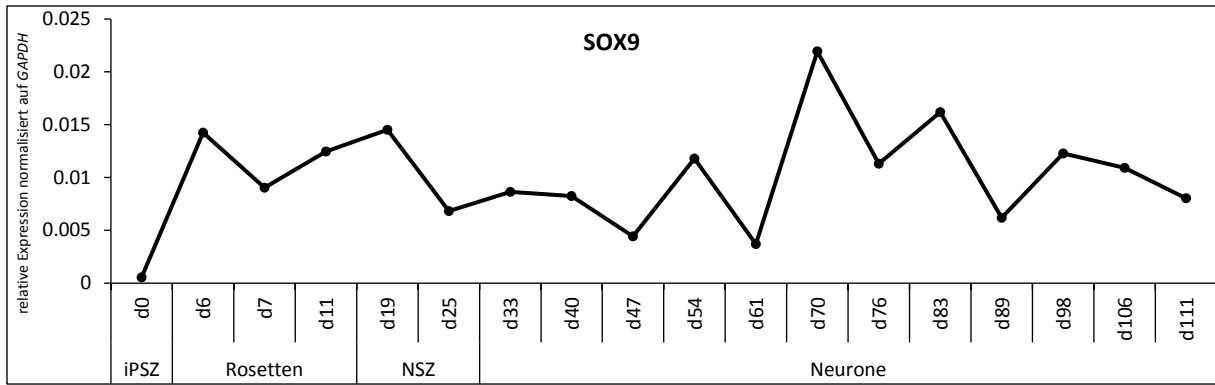












7.3. Verlaufsdiagramme von nicht untersuchten Genen der Genexpressionsanalyse

Die Grafiken zeigen die absolute Genexpression, intern verrechnet mit dem Referenzgen GAPDH.

