

Einfluss eines hypoxischen  
Sauerstoffgehaltes auf  
entwicklungsbiologisch relevante Signalwege  
in humanen embryonalen Stammzellen und  
deren differenzierten Derivate

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Barbara Helen Rath geb. Ley

aus Bad Neuenahr-Ahrweiler

Bonn 2011

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Brüstle

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Hoch

Tag der Promotion: 18.06.2012

Erscheinungsjahr: 2012

*Andere haben die Macht, sich in mehrere Formen zu wandeln, ähnlich wie du, Einwohner des landumfassenden Meeres, Proteus: bald wie ein Leu, bald zeigtest du dich wie ein Jüngling; wütender Eber erschienest du jetzt, dann wieder ein Drache, den zu berühren man bangt, bald machten dich Hörner zum Stiere; oft auch konnte man dich als Stein, oft schauen als Baumstamm; auch bisweilen, den Schein durchsichtigen Wasser dir gebend, warst du ein Fluss, bisweilen der Flut feindseliges Feuer.*

*Ovid: Metamorphosen XIII, Proteus, 730-738*

*für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	8
<b>1. Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1 Stammzellen	13
1.1.1 Gewinnung, Kennzeichen und Selbsterneuerung pluripotenter Stammzellen	16
1.1.2 Neurale Stammzellen	23
1.2 Embryogenese und Signalwege in der Embryonalentwicklung	24
1.2.1 Der Zellzyklus	27
1.2.2 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg	30
1.2.3 Der TGF $\beta$ /BMP-Signalweg	32
1.2.4 Der Notch-Signalweg	36
1.3 Sauerstoff in der Entwicklungsbiologie und Zellkultur	38
1.3.1 Sauerstoff während der Embryonalentwicklung und im adulten Vertebraten	38
1.3.2 Sauerstoff in der Zellkulturtechnologie	39
1.3.3 Der Hif1-Signalweg	41
1.3.4 Interaktion des Hif1-Signalweg mit entwicklungsbiologisch relevanten Signalwegen	42
1.4 Ziele der Arbeit	44
1.4.1 Etablierung eines hypoxischen Kultivierungssystems für humane ES Zellkulturen	44
1.4.2 Kultivierung von hES Zellen und Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen	44
1.4.3 Kultivierung von neuronalen Vorläuferzellen	45
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>46</b>
2.1 Zelllinien	46
2.2 Besondere Systeme zur Zellkultivierung	46
2.2.1 Sauerstoffregulierbare Inkubatoren	46
2.3 Zellbiologische Methoden	47
2.3.1 Fibroblasten für die ES Zellkultur	47
2.3.2 Kultivierung humaner ES Zellen	50
2.3.3 Differenzierung humaner ES Zellen in neurale Vorläuferzellen	53
2.3.4 Kultivierung von aus humanen ES Zellen abgeleiteter neuronalen Vorläuferzellen	53
2.4 Analytische Methoden	54
2.4.1 Zellzahlbestimmung und Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate	54
2.4.2 Immunzytochemie	55
2.4.3 Durchflusszytometrie	57
2.4.4 Protein-Analyse	60

---

2.4.5	<i>RT-PCR-Analyse</i>	62
2.5	Statistische Analyse	64
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>66</b>
3.1	Implementierung eines kontrollierten Systems zur hypoxischen Kultivierung humaner ES Zellen	66
3.2	Kultivierung humaner ES Zellen unter hypoxischen Sauerstoffbedingungen	69
3.2.1	<i>Verlangsamung der Proliferation von hypoxisch kultivierten hES Zellen</i>	69
3.2.2	<i>Reduktion der Pluripotenz und erhöhte Spontandifferenzierung bei Kultivierung von humanen ES Zellen unter physiologischen Bedingungen</i>	73
3.2.3	<i>Einfluss von hypoxischen Bedingungen auf die Regulation Proliferations-assoziiierter Marker</i>	77
3.2.4	<i>Reduktion der <math>\beta</math>-Catenin-Signaltransduktion bei einer Kultivierung von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen</i>	80
3.2.5	<i>Induktion des BMP-Signalweges während der Kultivierung von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen</i>	82
3.2.6	<i>Kein Einfluss einer hypoxischen Kultivierung auf den Notch-Signalweg</i>	85
3.3	Direkte Konversion humaner ES Zellen in neurale Vorläuferzellen unter hypoxischen Bedingungen	87
3.3.1	<i>Stagnation der Proliferation von direkt konvertierten hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen</i>	88
3.3.2	<i>Differenzierungsverhalten und Multipotenz von direkt konvertierten hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen</i>	90
3.3.3	<i>Kein Einfluss einer hypoxischen Differenzierung auf die Proteinexpression Zellzyklus-assoziiierter Proteine</i>	95
3.3.4	<i>Eine direkte Konversion unter einem Sauerstoffgehalt von 4% hat eine erhöhte Expression von GSK3<math>\beta</math> zur Folge</i>	99
3.3.5	<i>Induktion der TGF<math>\beta</math>/BMP-assoziierten Proteine Smad1/5/8 und Smad2 während der direkten Konversion unter hypoxischen Bedingungen</i>	101
3.3.6	<i>Stabilisierung der gespaltenen Notch-intrazellulären Domäne während der direkten Konversion unter hypoxischen Bedingungen</i>	103
3.4	Kultivierung von hES Zell-abgeleiteten neuroepithelialen Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen	105

3.4.1	<i>Eine Kultivierung von neuroepithelialen Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen hat eine leichte Reduktion der Proliferation zur Folge</i>	106
3.4.2	<i>Die Multipotenz von neuroepithelialen Zellen wird unter hypoxischen Bedingungen nicht beeinflusst</i>	108
3.4.3	<i>Eine hypoxische Kultivierung von hESNS Zellen hat nur einen geringen Effekt auf den Zellzyklus</i>	112
3.4.4	<i>Die Kultivierung von hESNS Zellen unter einem Sauerstoffgehalt von 4% hat eine erhöhte GSK3<math>\beta</math>-Expression zur Folge</i>	115
3.4.5	<i>Erhöhung der Aktivität des Notch-Signalwegs bei Kultivierung von hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen</i>	116
3.4.6	<i>Reprimierung des Signaltransduktions-Proteins Smad1/5/8 bei Kultivierung von hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen</i>	119
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>123</b>
4.1	Regulation der Zellproliferation und Apoptose unter hypoxischen Bedingungen	123
4.1.1	<i>Die Verlangsamung der Proliferation unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt ist abhängig vom Differenzierungsstatus der hES Zellen</i>	123
4.1.2	<i>Eine erhöhte Apoptose kann nur in undifferenzierten und differenzierenden hES Zellen festgestellt werden</i>	128
4.1.3	<i>Die G1/S-Transition wird unter hypoxischen Bedingungen abhängig vom Differenzierungsstatus beeinflusst</i>	129
4.2	Pluripotenzerhaltung, Spontandifferenzierung und Multipotenzerhaltung	132
4.3	Regulation entwicklungsbiologisch relevanter Signalwege unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt	138
4.3.1	<i>Ein niedriger Sauerstoffgehalt reprimiert die Wnt-Signaltransduktion in allen drei hES Zellstadien</i>	138
4.3.2	<i>Ein niedriger Sauerstoffgehalt induziert abhängig vom hES Zellstadium die Notch-Signaltransduktion</i>	142
4.3.3	<i>Ein niedriger Sauerstoffgehalt induziert abhängig vom hES Zellstadium die BMP-Signaltransduktion</i>	145
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>150</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>152</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>164</b>
<b>8.</b>	<b>Erklärung</b>	<b>165</b>

---

<b>9. Anhang</b>	<b>166</b>
9.1 Verbrauchsmaterial	166
9.2 Geräte	166
9.3 Chemikalien	168
9.4 Primäre Antikörper	171
9.5 Sekundäre Antikörper	175
9.6 Kernmarker	176
9.7 Primer	177
9.8 Lösungen	181
9.8.1 <i>Lösungen für die Zellkultur</i>	181
9.8.2 <i>Lösungen für analytische Methoden</i>	183

**10. Lebenslauf**

Error! Bookmark not defined.

18s	18s Ribosomale RNA
AFP	$\alpha$ -Fetoprotein
APC	Anaphase-promoting complex
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	Adenosinetriphosphat
AVE	anteriores viszerales Entoderm
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bHLH	basic helix-loop-helix protein
BLBP	Brain Lipid Binding Protein
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BrdU	5'-Bromo-2'-Deoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin
CD133	Prominin-1
cdc25A	Cell division cycle 25 homolog A
CDK	Cyclin Dependent Kinase
cDNA	copy Deoxyribonucleic Acid
CM	Conditioned Medium
cMyc	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
CP	Crossing-Point
DAPI	4',6-Diaminidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DCX	Doublecortin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKK	Dickkopf
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxy-Nukleotidtriphosphate
dO <sub>2</sub>	dissolved Oxygen
DTT	Dithiothreitol
EB	Embryoid Body
EDTA	Ethylene-diamine-tetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EN1	Engrailed Homeobox 1
EPO	Erythropoetin
ES Zelle	Embryonale Stammzelle

---

FCS	Fetal Calf Serum
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
G0-Phase	Ruhe-Phase
G1-Phase	Gap-1-Phase
G2-Phase	Gap-2-Phase
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDF	Growth Differentiation Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescence Protein
GSK3 $\beta$	Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$
Fox	forkhead box (Fox) transcription factor
Hes	Hairy and Enhancer of Split
hES Zelle	humane Embryonale Stammzelle
hESNS Zellen	humane Embryonale Stammzelle Neurale Vorläuferzelle
Hey	Hairy/Enhancer-of-split related with YRPW motif
Hif1	Hypoxia Inducible Factor 1
HRE	Hypoxia Responsive Elements
HRP	Horseradish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
IVF	in vitro Fertilisation
Jak/Stat-3	Januskinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
kb	Kilo-Basen
kd	Kilodalton
Klf4	gut-enriched Krüppel-like factor
Knockout-DMEM	Knockout- Dulbecco's Modified Eagle Medium
L1	L1 cell adhesion molecule
Lef	Lymphoid Enhancer-binding Factor
Lefty	Left-right determination Factor
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
$\mu$	spezifische Wachstumsrate
Mash	Mammalian Achate Schute Homolog

MEF	Muriner Embryonaler Fibroblast
mES Zelle	murine Embryonale Stammzelle
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NICD	Notch Intracellular Domain
nMyc	v-mycmyelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)
Oct-4	Octamer-binding Transcription Factor 3/4
OD	Optische Dichte
Olig	Oligodendrocyte lineage transcription factor
Pax	Paired Box
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium Iodid
PO	Poly-L-Ornithin
PPS	Phosphatidylserin
PS	Primitivstreifen
PSA-NCAM	Poly-Sialated Neural Cell Adhesion Molecule
pO <sub>2</sub>	atmosphärischer Sauerstoffgehalt
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
pVHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor protein
RB	Retinoblastom Protein
Rex-1	Reduced expression 1 protein
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Smad	Sma- and Mad-related protein
Sox-2	Sex Determining Region Y-box 2
S-Phase	Synthesephase
SR	Serum Replacement
SSC	Sideward Scatter
SSEA-1	Stage-specific Embryonic Antigen 1
SSEA-4	Stage-specific Embryonic Antigen 4

---

TAZ	Tafazzin
TCF	transcription factor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor beta
Tra-1-60	Tumor-related Antigen 1-60
Tra-1-81	Tumor-related Antigen 1-81
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tuj1	$\beta$ -III Tubulin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	Wingless-type

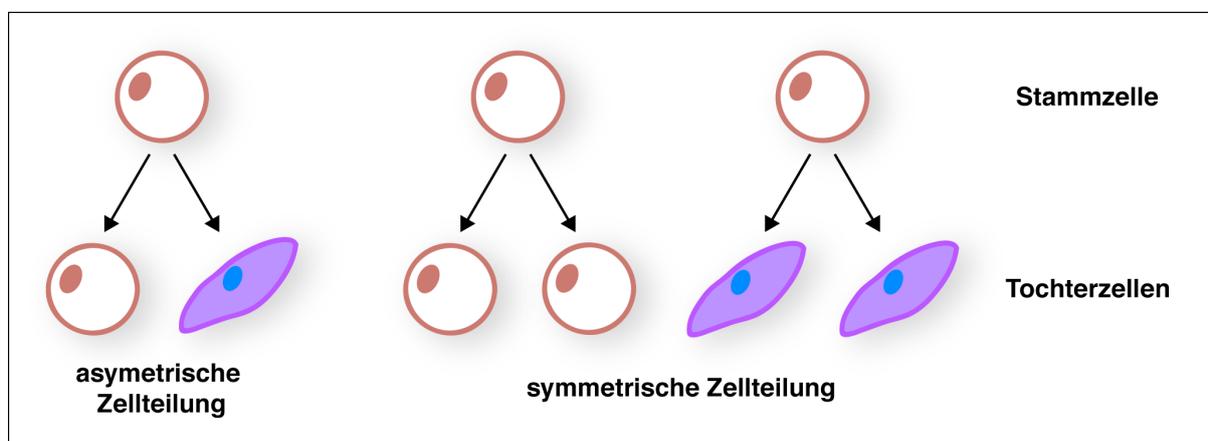
## 1. Einleitung

Mit der Stammzelltechnologie, welche die Differenzierung von Stammzellen in die verschiedensten somatischen Zell- und Gewebetypen des menschlichen Körpers ermöglicht (Reubinoff et al. 2000; Kehat et al. 2001; Zhang et al. 2001), wurden die Voraussetzungen geschaffen, die es erlauben, entwicklungsbiologisch relevante Fragestellungen nicht nur an den in der Entwicklungsbiologie klassisch vertretenen Modellorganismen wie zum Beispiel der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) zu studieren, sondern auch an den verschiedensten humanen Zell- und Gewebetypen (Martin 1981; Prell et al. 2002; Wobus and Boheler 2005).

Die Stammzelltechnologie bietet des Weiteren durch die Möglichkeit, *in vitro* alle somatische Zelltypen generieren zu können, vielfältige Perspektiven in der Regenerativen Medizin (Menendez et al. 2006) und Pharmazeutischen Industrie (Pouton and Haynes 2007). Die gezielte, gerichtete Differenzierung von Stammzellen (Schuldiner et al. 2000) in die verschiedensten somatischen Zelltypen des menschlichen Körpers verlangt aber nach einem stabilen, reproduzierbaren Kultivierungssystem, welches dem *in vivo* System (dem sich entwickelnden Embryo) am nächsten kommt. Vor diesem Hintergrund wird evident, dass für die Kultivierung und Differenzierung von Stammzellen nicht nur das Kultivierungsmedium, die Zytokine und die Regulation von entwicklungsbiologisch relevanten Signalwegen, sondern auch die Verfügbarkeit von Sauerstoff von großer Bedeutung ist.

## 1.1 Stammzellen

Stammzellen stellen die Basis aller Gewebe und Organe eines adulten Organismus dar und halten darüber hinaus die Regenerationsfähigkeit und die Funktion von adulten Organen und Gewebe über die gesamte Lebensspanne des Organismus aufrecht. Stammzellen heben sich von somatischen Zellen, die die Gewebe und Organe an sich bilden, von diesen durch zwei Eigenschaften ab. So besitzen Stammzellen zum einen die Variabilität zur symmetrischen oder asymmetrischen Zellteilung, welches eine entscheidende Grundlage bei der Aufrechterhaltung der somatischen Zellpopulation von Organen und Geweben im adulten Organismus spielt (Abb. 1.1.1). So kann bei der asymmetrischen Zellteilung aus der maternalen Zelle eine Tochterzelle mit differenzierenden Eigenschaften und eine Stammzelle entstehen (Molofsky et al. 2004).. Bei der symmetrischen Zellteilung generiert die maternale Zelle zwei Tochterzellen die ebenfalls Stammzeleigenschaften besitzen. Zusätzlich kann eine symmetrische Zellteilung einer Stammzelle auch zwei Tochterzellen hervorbringen, die keine Stammzeleigenschaften mehr besitzen und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren haben (Abb. 1.1.1).

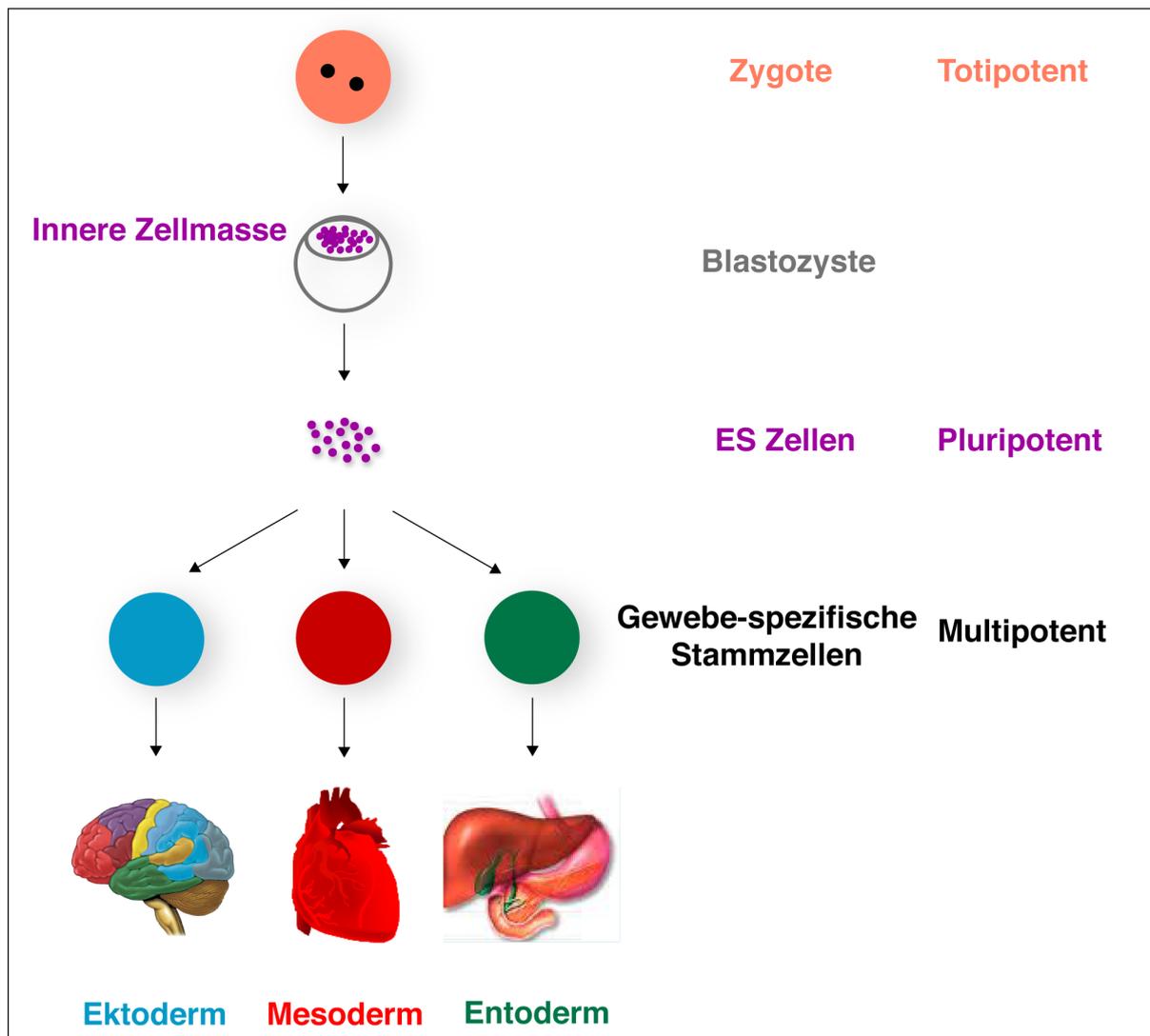


**Abb. 1.1.1 Selbsterneuerung von Stammzellen.** Die Basis der Selbsterneuerung von Stammzellen bildet die symmetrische und asymmetrische Zellteilung. Bei der symmetrischen Zellteilung generiert entweder eine Stammzelle wieder eine Stammzelle, oder zwei Tochterzellen, wenn bei der symmetrischen Teilung das Selbsterneuerungspotential verloren geht. Aus der asymmetrischen Zellteilung gehen eine Stammzelle und eine differenzierte Tochterzelle hervor.

Neben der asymmetrischen oder symmetrischen Zellteilung ist das entscheidende Merkmal einer Stammzelle die Fähigkeit zur Differenzierung. So wird das Differenzierungspotential mit fortschreitender Ausreifung der Stammzellen über asymmetrische oder symmetrische Zellteilung immer weiter limitiert und büßen so

Differenzierungspotential ein. Die so gesteuerte Regulation der Selbsterneuerung und Differenzierung bildet den „Bauplan“, die Basis eines jeden Organismus.

Per Definition unterscheidet man Stammzellen hierarchisch nach drei Ausreifungsstadien (Abb.1.1.2.). 1) Als totipotent wird eine Stammzelle bezeichnet, die in ihrem Selbsterneuerung und Differenzierungspotential nicht limitiert ist und die Fähigkeit hat einen vollständigen Organismus auszubilden. Zu den totipotenten Stammzellen zählt man die Zygote und die Blastozyste. Hierarchisch eine Stufe unter den totipotenten Stammzellen stehen die pluripotenten Stammzellen. 2) Pluripotenten Stammzellen sind, im Gegensatz zu totipotenten Stammzellen, ausschließlich in der Lage in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren (Mesoderm, Ektoderm und Entoderm), haben jedoch die Fähigkeit zur Ausbildung eines kompletten Organismus verloren. Zu den Pluripotenten Stammzellen zählen Zellen der Inneren Zellmasse. 3) Noch weiter in ihrem Differenzierungspotential limitiert sind multipotente, oder auch somatische, Gewebe-spezifische Stammzellen. So sind multipotente Stammzellen zwar in der Lage sich selbst zu erneuern, können jedoch aufgrund ihres eingeschränkten Differenzierungspotentials nur noch über symmetrische oder asymmetrische Zellteilung Zellen des Keimblattes, zu dem sie gehören ausbilden. Multipotente Stammzellen residieren in zahlreichen Organen und Geweben des adulten Organismus, die einen hohen Regenerationsbedarf haben, sind essentiell für diese und halten die Gewebefunktion über Zellteilung aufrecht. Zu solchen Geweben mit hohem Regenerationsbedarf zählen die Haut oder auch das Darmepithel um nur einige aufzuzählen (Walker et al. 2009).



**Abb. 1.1.2 Hierarchie von Stammzellen.** Abhängig vom Differenzierungspotential unterscheidet man verschiedene Stufen von Stammzellen. Totipotente Zellen sind in der Lage einen vollständigen Organismus auszubilden, wohingegen pluripotente Zellen nur noch das Potential haben in alle somatischen Zelltypen differenzieren zu können. Gewebespezifische, multipotente Zellen, sind am Ende der Stammzellhierarchie angeordnet und besitzen die Fähigkeit, sich in die verschiedenen Zelltypen ihres zugehörigen Keimblatts zu entwickeln.

Prominente Vertreter multipotenter Stammzellen eines hochregenerativen Gewebes sind darüber hinaus die Hämatopoietischen Stammzellen, die trotz ihres limitierten Selbsterneuerungspotentials in der Behandlung von Leukämien in der Onkologie seit Jahrzehnten erfolgreich eingesetzt werden (Warkentin et al. 1981). Darüber hinaus findet man multipotente Stammzellen aber auch in Organen, die eine nicht so hohe Regenerationsfähigkeit besitzen, wie zum Beispiel dem Gehirn (Gage et al. 1995). Obwohl adulten Stammzellen nur ein eingeschränktes Differenzierungspotential zugestanden wird, wurde Anfang des letzten Jahrzehntes wiederholt von

verschiedenen Arbeitsgruppen berichtet, dass multipotente Stammzellen die Keimblattgrenze überschreiten und in somatische Zellen einer anderen Keimbahn ausdifferenzieren können (Brazelton et al. 2000; Mezey et al. 2000). So konnte die Überschreitung der Keimblattgrenze und dortige Ausreifung, das so genannte Phänomen der Transdifferenzierung, vor allem nach Transplantation von Zellen eines Keimblattes in Geweben eines anderen Keimblattes beobachtet werden. Die These der Transdifferenzierung von multipotenten Zellen konnte jedoch meist auf eine Fusion mit Zellen des Zielgewebes zurückgeführt und so zum Teil widerlegt werden (Terada et al. 2002; Alvarez-Dolado et al. 2003; Rodic et al. 2004). Jedoch konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob somatische Stammzellen in der Lage sind, die Keimblattgrenze zu überschreiten oder ob das Phänomen der Transdifferenzierung doch nur auf Artefakten wie Zellfusion basiert.

### **1.1.1 Gewinnung, Kennzeichen und Selbsterneuerung pluripotenter Stammzellen**

Wie schon einführend erwähnt sind pluripotente Stammzellen in der Lage, in alle drei Keimblätter zu differenzieren, und so in der Lage an allen Geweben und Organen des adulten Organismus zu partizipieren (Bradley et al. 1984). Generell unterscheidet man drei Typen von pluripotenten Stammzellen, die verschiedene Donorgewebe haben. Bereits 1970 und 1972 wurden zwei Quellen an pluripotenten Stammzellen identifiziert, die embryonalen Karzinomzellen (EC cells – embryonic carcinoma cells; Rosenthal et al. 1970) und die embryonalen Keimzellen (EG cells – embryonic germ cells; Evans 1972). Prominentester Vertreter der pluripotenten Stammzellen sind jedoch die embryonalen Stammzellen (ES Zellen), die erstmals 1981 von Evans und Kaufmann et al. und Martin et al. aus murinen Blastozysten isoliert wurden. Zwischen 1981 und 1998 wurden eine Vielzahl von embryonalen pluripotenten Stammzellen verschiedenster Spezies generiert (Notarianni et al. 1991; Moreadith and Graves 1992; Iannaccone et al. 1994; Pain et al. 1996; Thomson et al. 1996), jedoch gelang ein weiterer Meilenstein in der Stammzellforschung erst siebzehn Jahre nach der Generierung von murinen ES Zellen (mES Zellen). So stellte die Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen im Jahr 1998 durch

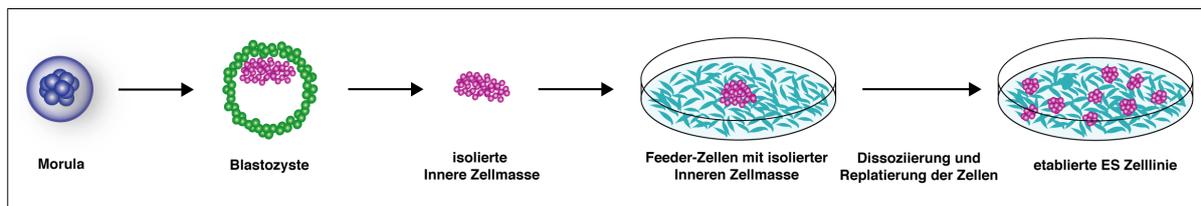
Thomson et al. einen wichtigen Schritt auf dem Weg zum Einsatz von hES Zellen und daraus differenzierten somatische Zellen in der entwicklungsbiologischen, der pharmakologischen Forschung und Entwicklung und in der regenerativen Medizin dar. Ein weiterer Meilenstein in der Stammzellforschung gelang Takahashi und Yamanaka 2006. Sie zeigten erstmals an murinen Fibroblasten, dass es möglich war, durch die Überexprimierung definierter, pluripotenz-assoziiierter Faktoren diese in ein pluripotentes Stadium konvertieren zu können (induzierte Pluripotenz, iPS Zellen; (Takahashi and Yamanaka 2006). So wiesen sie erstmals eine weitere Möglichkeit der Gewinnung von pluripotenten Stammzellen auf, ohne auf eine embryonale Quelle oder Keimzellen zurückgreifen zu müssen (Wakayama et al. 1998; Cowan et al. 2005).

### **1.1.1.1 Embryonale Stammzellen**

#### **1.1.1.1.1 Gewinnung embryonaler Stammzellen**

Die Gewinnung embryonaler Stammzellen erfolgt durch Isolierung der Inneren Zellmasse aus der präimplantierten Blastozyste. Humane Embryonen erreichen das Blastozysten Stadium an Tag vier bis sechs post Fertilisierung. Die proliferierenden embryonalen Zellen unterlaufen bei der Ausreifung zur Blastozyste ihre ersten Differenzierungsschritte und es können bereits zwei Zelltypen, die Innere Zellmasse und das Trophektoderm unterschieden werden. Insgesamt besteht die Blastozyste vor der Implantation in den Uterus aus etwa 50 bis 150 Zellen, von denen etwa 30 bis 34 Zellen die Innere Zellmasse bilden (NIH 2001). Die Zellen der Inneren Zellmasse, welche zu diesem Zeitpunkt pluripotent und vom Blastocoel umgeben sind, bilden durch symmetrische und asymmetrische Zellteilung den eigentlichen Embryo aus. Sie sind somit der Ursprung aller somatischer Zell- und Gewebetypen des adulten Organismus, während das Trophektoderm, welches die Innere Zellmasse umgibt, den Trophoblasten bildet und als embryonaler Teil in der Plazenta partizipiert (Gilbert 2006). Die Innere Zellmasse selber kann zwar ohne den Trophoblasten die über 200 Zelltypen des adulten Organismus ausbilden, hat aber nicht mehr das Potential zur Ausbildung eines kompletten, lebensfähigen Organismus. Die Gewinnung von pluripotenten embryonalen Stammzellen aus der

Inneren Zellmasse der präimplantierten Blastozyste erfolgt über das so genannte Immunosurgery („Immunchirurgie“). Bei der Immunosurgery wird zur Trennung von Innerer Zellmasse und Trophoblast, das Trophektoderm über Komplement-abhängige Antikörper-Zytotoxizität lysiert. Die so freigesetzte Innere Zellmasse wird auf einen Feederzellrasen oder eine extrazelluläre Matrix transferiert und über kontinuierliches Passagieren des Auswuchses eine ES Zelllinie gewonnen (Martin 1981; Thomson et al. 1998; Klimanskaya et al. 2005).



**Abb. 1.1.3 Gewinnung Embryonaler Stammzellen.** Die Gewinnung der Inneren Zellmasse erfolgt über das Immunosurgery. Anschließend wird die Innere Zellmasse in Ko-kultur mit mitotisch inaktivierten Feeder-Zellen kultiviert. Nach erfolgreichem replattieren der Inneren Zellmasse und passagieren, ist eine neue ES Zelllinie entstanden.

Adaptiert nach: Department of Health and Human Services, 2001.

Die Methode des Immunosurgery führt jedoch zur unweigerlichen Zerstörung des Embryos, so dass aus ethischen Gründen verschiedene Methoden entwickelt wurden, bei dem zur Gewinnung von pluripotenten Zellen aus der Inneren Zellmasse der Embryo nicht mehr zerstört werden muss. So konnten 2006 Chung et al., basierend auf der Technik der Präimplantationsdiagnostik zeigen, dass es möglich ist, einzelne Blastomeren aus dem Morula-Stadium der Maus zu entnehmen und in eine Stammzelllinie zu überführen. Kurze Zeit später konnte die gleiche Arbeitsgruppe diese Technik erfolgreich auf humane Embryonen übertragen (Klimanskaya et al. 2006). In Anbetracht der späteren klinischen Anwendung von somatischen Zellen muss ein Augenmerk auf die Kultivierung der humanen embryonalen Stammzellen (hES Zellen) gelegt werden. So kann bei der Gewinnung von hES Zellen durch das Immunosurgery, oder die Kultivierung von hES auf einem murinen Feeder-Zellrasen, murinen extrazellulären Matrix (Matrigel®), oder Verwendung von murinen Fibroblasten konditioniertem Medium nicht ausgeschlossen werden, dass die hES Zellen durch den Kontakt mit undefinierten tierischen Substanzen und Xenogenen, artfremden Viren kontaminiert werden. Der Kontakt und die mögliche Folge einer Kontamination kann jedoch ein

Ausschlusskriterium zur Zulassung von hES-Zellprodukten in der Klinik sein. Auf Grundlage diesen Problems wurden mittlerweile verschiedenste Kultivierungsmethoden entwickelt, die es möglich machen, hES Zellen in Abwesenheit von tierischen Zellen und Medienbestandteilen zu generieren und kultivieren (Kim et al. 2005; Klimanskaya et al. 2005; Klimanskaya et al. 2006; Ludwig et al. 2006; Klimanskaya et al. 2007).

#### **1.1.1.1.2 Kennzeichen und Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen**

Hauptmerkmal aller ES Zellen ist ihre Pluripotenz, die Fähigkeit in alle drei Keimblätter, Mesoderm, Ektoderm und Entoderm differenzieren zu können. Die Charakterisierung des pluripotenten Stadiums kann über den molekularbiologischen Nachweis von Pluripotenz-assoziierten Markern auf mRNA- und Protein-Ebene, aber auch durch funktionelle Analysen erfolgen (Boiani and Scholer 2005). Funktionelle Analysen zur Überprüfung der Pluripotenz von Stammzellen sind zum einen die Generierung von Embryoidkörperchen (embryoid bodies, EBs) und zum anderen die Bildung von Chimären. Der in vitro Nachweis der Pluripotenz von Stammzellen über die Bildung von EBs ist die einfachste Methode zur Überprüfung der Pluripotenz. Werden ES Zellen von einer adhärennten in eine Suspensionskultur mit Differenzierungsmedium überführt, so löst dies eine spontane Aggregatbildung der ES Zellen aus. Nach der Formierung des Embryoidkörperchens werden durch Zell-Zell-Wechselwirkung, symmetrische und asymmetrische Zellteilung Differenzierungsprozesse ausgelöst, die die topographische in vivo Entwicklung der präimplantierten Blastozyste rekapitulieren. So bildet sich in der Peripherie des EBs zuerst das primitive Entoderm aus, welches die Differenzierung des primitiven ektodermalen Epithels induziert. Als letztes Keimblatt wird abschließend das Mesoderm gebildet (Murray und Edgar 2004; Gilbert 2006). Die so während der Differenzierung generierten drei Keimblätter innerhalb eines EBs können dann durch immunzytochemische Verfahren nachgewiesen werden. Jedoch bildet der in vitro Nachweis der Pluripotenz über EBs nur einen ersten Hinweis auf die Pluripotenz der Zellen. Ein weiterer Beweis der Pluripotenz stellt der in vivo Nachweis von Tumoren, so genannten Teratomen, aus transplantierten ES Zellen dar. Werden ES Zellen in immunsupprimierte Mäuse transplantiert, so entstehen nach einigen Wochen

Teratome, in denen Zellen aller drei Keimblätter über Immunhistochemie nachgewiesen werden können. (Evans and Kaufman 1981; Thomson et al. 1998). Der ultimative Beweis für die Pluripotenz einer ES Zelle besteht jedoch in der Generierung einer Chimäre. Per Definition sind Chimären Organismen, die aus genetisch unterschiedlichen Zellen aufgebaut sind und dennoch ein einheitliches Individuum darstellen. Bradley und Kollegen zeigten bereits 1984, dass murine ES Zellen nach Injektion in eine murine Donorblastozyste an allen Geweben des sich entstehenden Embryos partizipieren und nachgewiesen werden können (Bradley et al. 1984). Die Bildung von Chimären aus einer murinen Blastozyste und hES Zellen als ultimativer Beweis der Pluripotenz von hES Zellen ist jedoch aus offensichtlichen ethischen Gründen nicht durchführbar. Als weiterer Nachweis der Pluripotenz von Stammzellen können neben den oben aufgeführten funktionellen Analysen auch molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung des pluripotenten Stadiums herangezogen werden. So kann der Nachweis der Expression Pluripotenz-assoziiierter Marker ein Indiz für die Fähigkeit sein, in alle Zelltypen eines somatischen Organismus ausreifen zu können. Prinzipiell kann man Pluripotenz-assoziierte Marker in zwei Gruppen unterteilen, Transkriptionsfaktoren und Oberflächenantigene. Zu den Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren zählen Oct-4 (Okamoto et al. 1990), Nanog (Chambers et al. 2003), Rex-1 (Rogers et al. 1991) und Sox-2 (Collignon et al. 1996), um nur einige aufzuzählen (Boiani and Scholer 2005). Zu den Oberflächen-Antigenen, die mit einem pluripotenten Stadium von hES Zellen assoziiert werden, zählen die Oberflächenantigene SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 und Tra-1-81 (Henderson et al. 2002). Ein weiteres Charakteristikum von ES Zellen ist eine hohe Telomerase-Aktivität, ein Enzym welches die ursprüngliche Telomerlänge in Zellen nach Zellteilung wieder herstellt (Greider and Blackburn 1985; Thomson et al. 1998). Neben der Charakterisierung des pluripotenten Stadiums über Transkriptionsfaktoren und Oberflächenantigenen können morphologische Kriterien erste Anhaltspunkte für die Pluripotenz von ES-Zellkultur geben. hES Zellen selber wachsen nicht als Einzelzellen, sondern bilden Kolonien aus, die sich in ihrem undifferenzierten Zustand als flache, kompakte Kolonien darstellen. So weisen undifferenzierte Kolonien meist eine deutliche Abgrenzung zu

ihrer Umgebung auf, der sich im Phasenkontrast als heller Rand darstellt (Boiani and Scholer 2005; siehe auch Abb. 3.3.1). Beginnen hES Zellen zu differenzieren, so sind erste Anzeichen der Reduktion des pluripotenten Stadiums, der Verlust der deutlichen Abgrenzung der Kolonie, sowie die Bildung von Lücken oder Neuralrohr-ähnlichen Strukturen im Inneren der Kolonie. Darüber hinaus kann man epithelial aussehenden Zellen beobachten, die undifferenzierte, pluripotente hES Zellkolonien umgeben. (Thomson et al. 1998; Amit et al. 2000; Boiani and Scholer 2005; Ley 2005; Terstegge 2006).

Die Selbsterneuerung von hES Zellen ist ein äußerst sensibles und regulatorisch komplexes System, in der eine Reihe von Signalwegen, wie der FGF-, TGF $\beta$ /BMP- und der Wnt-Signalweg involviert sind. Selber kann die Selbsterneuerung von hES Zellen zur Generierung pluripotenter Tochterzellen in zwei unterschiedliche Funktionen aufgeteilt werden. Zum einen muss die Proliferation gesichert und zum anderen der Erhalt des undifferenzierten, pluripotenten Stadiums einer Stammzelle garantiert werden (Molofsky et al. 2004). Wie schon vorab eingeführt zählt Oct-4 (POU Domänen Transkriptionsfaktor; Okamoto et al. 1990) und Nanog (Homöodomänen-Protein; Chambers et al. 2003; Mitsui et al. 2003) zu den Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren, die neben Rex-1 (Rogers et al. 1991) und Sox-2 (Collignon et al. 1996) eine entscheidende Rolle in der Selbsterneuerung von hES Zellen einnehmen (Loh et al. 2006). Ein weiterer wichtiger Faktor in der Aufrechterhaltung des pluripotenten Stadiums ist der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (Fibroblast Growth Factor-2, FGF-2; Xu et al. 2005, Levenstein et al. 2006). Darüber hinaus zählt neben dem Wnt-Signalweg, dem Sato et al. eine entscheidende Funktion in der Selbsterneuerung von hES Zellen zuordnete (Sato et al. 2004), der TGF $\beta$ /BMP-Signalweg, der eine wichtige Rolle in der Regulation der Pluripotenz und Differenzierung von hES Zellen einnimmt (James et al. 2005). Jedoch ist bis heute nicht abschließend geklärt, inwieweit die einzelnen Signalwege in den Mechanismus der Selbsterneuerung unter gegenseitiger Wechselwirkung eingreifen (siehe auch 1.2 und Unterkapitel).

### 1.1.1.1.3 In vitro Differenzierung von pluripotenten ES Zellen

hES Zellen stellen aufgrund ihrer Pluripotenz, der Möglichkeit der Differenzierung in alle drei Keimblätter und ihrer de Fakto fast unbegrenzten Proliferation in vitro eine attraktive Quelle für die Generierung von Donorzellen für die Regenerative Medizin dar. Die Gewinnung von Donorzellen (hES Zell-abgeleiteter Populationen) durch Differenzierung von hES Zellen kann über verschiedenste Methoden gewonnen werden. Zum einen bietet die Ko-kultivierung mit anderen Zelllinien eine Möglichkeit, hES Zellen in die gewünschte Zielpopulation zu differenzieren (Uzan et al. 1996; Barberi et al. 2003; Lee et al. 2007). Zum anderen bietet die klassische Methode der Generierung von EBs eine weitere Möglichkeit, die gewünschte Zellpopulation zu gewinnen (Keller 1995; Kehat et al. 2001). Des Weiteren bietet die adhärente, direkte Konversion von hES Zellen eine Alternative zur konventionellen Differenzierung über Embryoidkörperchen oder Ko-kultivierung. So werden bei der direkten Konversion adhärente hES Zellen über Blockierung oder Unterstützung der entsprechenden entwicklungsbiologisch relevanten Signalwege direkt, ohne zwischenzeitliche Suspensionskultivierung, in die gewünschte Vorläuferzellpopulation differenziert (Ying et al. 2003; Gerrard et al. 2005; Chambers et al. 2009). Multipotente Vorläuferzellen, die mit den vorab aufgeführten Verfahren hergestellt wurden, können anschließend, durch die gezielte, sequenzielle Gabe von Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktorenentzug gezielt in die entsprechenden somatischen Zelltypen differenziert werden (Brustle et al. 1999; Schuldiner et al. 2000; Zhang et al. 2001). So können über die oben angerissenen Methoden multipotente oder somatische Zellen aller Zellen des Organismus in variabler Reinheit aus pluripotenten ES Zellen gewonnen werden (Keller 2005). Bereits drei Jahre nach der ersten Gewinnung von hES Zellen durch Thomson et al. 1998 konnte Assady und Kollegen die erfolgreiche Differenzierung von Insulin-produzierenden Zellen aus hES Zellen zeigen (Assady et al. 2001). Im gleichen Jahr zeigten Kehat et al. die Generierung einer weiteren, klinisch relevanten wichtige Zellpopulation von aus hES Zellen differenzierten Kardiomyozyten und drei Jahre später deren funktionelle Integration im Großtiermodell (Kehat et al. 2001; Kehat et al. 2004). Neben den oben aufgeführten Zellpopulationen konnte 2001 auch die erfolgreiche

Gewinnung von Neuronen aus hES Zellen von Zhang und Kollegen publiziert werden (Zhang et al. 2001).

### **1.1.2 Neurale Stammzellen**

Neurale Stammzellen sind mitotisch aktive, multipotente Zellen, die die Fähigkeit haben, in alle somatischen Zelltypen des Nervensystems (Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten) zu differenzieren (Gilbert 2006). Neurale Stammzellen findet man nicht nur während der Embryonalentwicklung, sondern auch in geringer Anzahl in Stammzellnischen des adulten Gehirns. Zu den Stammzellnischen im adulten Gehirn zählen der Hippocampus sowie die Subventrikularzone und eingeschränkt auch der Spinalkanal (McKay 1997; Rao 1999; Gage 2000). Das Potential neuraler, adulter Stammzellen ist jedoch noch nicht genau geklärt (Temple 2001; Ma et al. 2009). Evident werden die limitierte Verfügbarkeit und die geringe Anzahl adulter neuraler Stammzellen im Hinblick auf neurodegenerative Krankheiten des Zentralen Nervensystems, wie Parkinson, Alzheimer oder Huntington (Gorman 2008). Diesen Krankheiten gemeinsam ist der zeitabhängige, progressive Verlust von neuronalen Subtypen. Zur Behandlung dieser Krankheiten existieren heutzutage nur ineffektive Therapien, die nur die Symptome unterdrücken, oder den Verlust der Nervenzellen nur hinauszögern (May et al. 2006). Der Ansatz, in vitro aus pluripotenten Zellen neurale Stammzellen zu generieren und diese in neuronale Subtypen und Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten) zu differenzieren, bietet in diesem Hinblick eine interessante Alternative zu konventionellen Therapien.

#### **1.1.2.1 Gewinnung und Charakteristika neuraler Vorläuferzellen aus hES Zellen**

Erstmals konnte 2001 die Gewinnung neuraler Stammzellen aus hES Zellen beschrieben werden (Zhang et al. 2001). Seitdem wurden verschiedenste Protokolle entwickelt und optimiert, so dass man heutzutage auf einen großen Pool an neuronalen Stammzellen mit hoher Reinheit zurückgreifen kann (Perrier et al. 2004; Li et al. 2005; Koch et al. 2009). Eine Methode zur Gewinnung neuraler Stammzellen ist die direkte Konversion. Bei der direkten Konversion von pluripotenten hES Zellen in neurale Stammzellen werden ES Zellen auf einer extrazellulären Matrix ausgesät

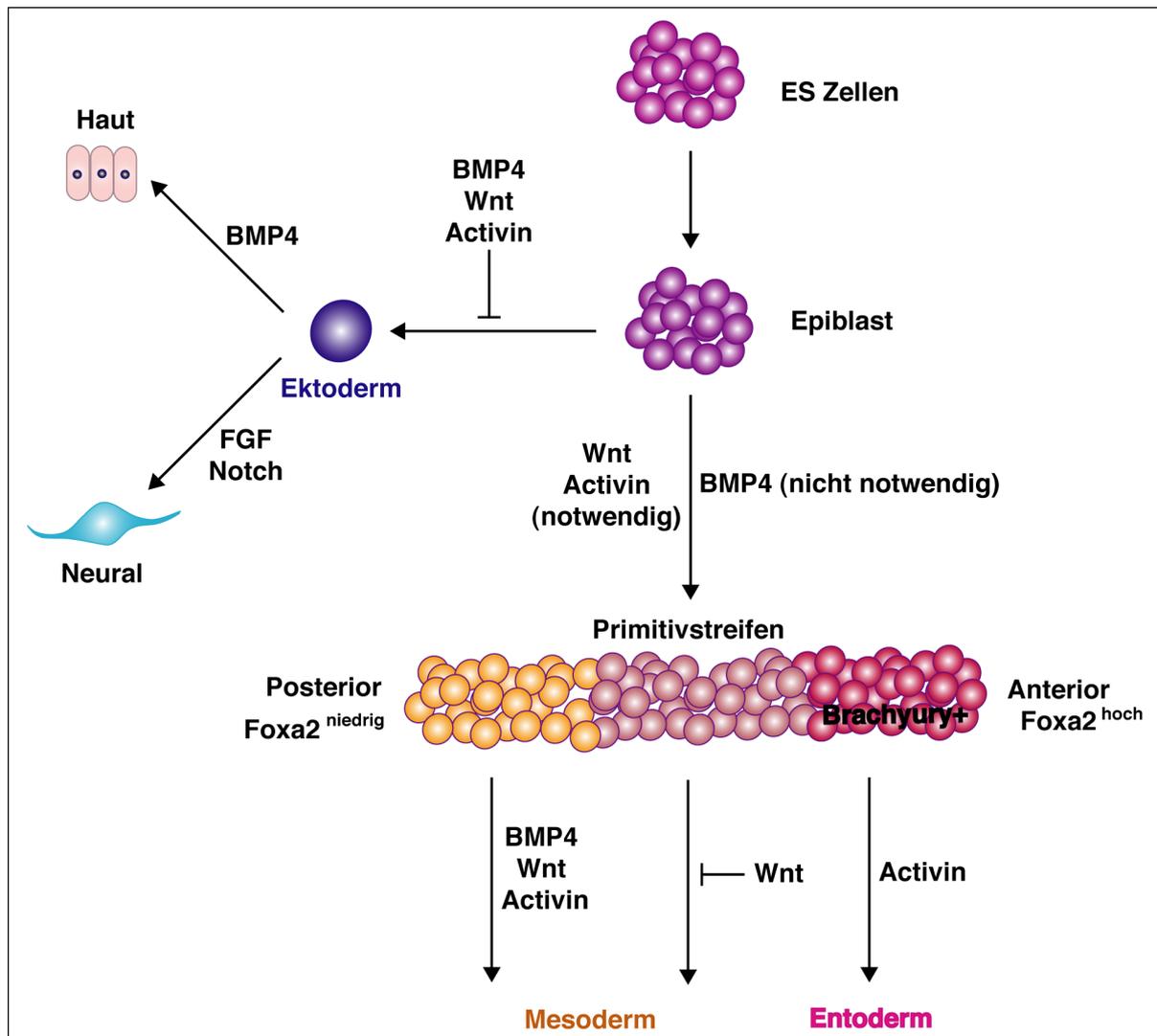
und eine Differenzierung in neuroektodermale Zellen durch Zugabe von BMP- und TGF $\beta$ -Antagonisten (z.B. Noggin, SB 431542) ausgelöst (Gerrard et al. 2005; Chambers et al. 2009). Die dabei entstandenen Zellen können nach Abschluss der initialen Differenzierung vereinzelt als neurale Stammzellen weiterkultiviert werden und besitzen das Potential, in Neurone und Gliazellen auszudifferenzieren. Eine weitere Methode, um aus ES Zellen neuroepitheliale Vorläuferzellen zu gewinnen, stellt die gerichtete Differenzierung dar (Zhang et al. 2001; Koch et al. 2009). Bei der gerichteten Differenzierung werden wie einleitend unter 1.1.1.1.3 beschrieben durch die gezielte Gabe der Wachstumsfaktoren Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF: Fibroblast Growth Factor) und Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF: Epidermal Growth Factor) und das gezielte Wechseln zwischen adhärenter und Suspensionskultivierung multipotente neuroepitheliale Stammzellen generiert (für detailliertes Protokoll siehe Koch et al. 2009). Die so generierten Zellen besitzen in vitro das Potential, sich über eine lange Zeit selbst zu erneuern, ohne dabei ihre Multipotenz zu verlieren. Die Charakterisierung von multipotenten, neuroepithelialen Zellen kann über die Präsenz von einer Reihe von Markern auf Protein- und RNA-Ebene, wie zum Beispiel die Expression der neuroepithelialen Marker Pax6, Sox-1, Sox-2, Sox-3, Nestin, um nur einige aufzuzählen und durch die Fähigkeit in alle somatischen Zelltypen des Zentralnervensystems (Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten) zu differenzieren erfolgen (Zhang et al. 2001; Barberi et al. 2003; Gerrard et al. 2005; Chambers et al. 2009; Koch et al. 2009).

## **1.2 Embryogenese und Signalwege in der Embryonalentwicklung**

Der menschliche Körper besteht aus mehr als 200 Zelltypen. Die Regulation der Differenzierung, um aus der befruchteten Oozyte einen kompletten Organismus zu formen, ist ein sehr komplexer Mechanismus und ist bis heute für das humane System noch nicht vollständig aufgeklärt (Pera and Trounson 2004; Gilbert 2006). Die Grundlage für die Regulation der Ontogenese bildet die Signaltransduktion, bei der über externe parakrine Signale oder den Zell-Zellkontakt Signale intrazellulär, oder über das Zytoskelett zwischen Zellen regulatorisch weitergeleitet werden können (Alberts 2002; Gilbert 2006; Abb. 1.2.1). Prinzipiell verläuft die

---

Signaltransduktion unabhängig von dem Signal auslösenden Prozess immer nach ähnlichen Schemata ab. In der Zellmembran sind Rezeptoren transmembran lokalisiert, die über Bindung an einen Liganden oder Bindung eines parakrinen, extrazellulären Signals eine Konformationsänderung eingehen. Die Konformationsänderung des Rezeptors katalysiert intrazelluläre Prozesse, die die Phosphorylierung und damit Aktivierung oder Inaktivierung eines Signal-empfangenden, zytoplasmatisch lokalisierten Proteins zur Folge haben. Eine Konformationsänderung eines Rezeptors kann auch die Abspaltung einer intrazellulären Domäne des Rezeptors zur Folge haben. Proteine die Signale weiterleiten (Signaltransduktionsproteine) können sowohl nach Translokation in den Nukleus als Transkriptionsfaktor fungieren, als auch an der Weitergabe des Signals über das Zytoskelett beteiligt sein (Alberts 2002; Gilbert 2006). Zu den entwicklungsbiologisch wichtigsten extrinsischen Faktoren und den dazu gehörigen Signalwegen zählen der Wnt-, TGF $\beta$ /BMP-, sowie FGF- und Notch- Signalweg (Molofsky et al. 2004; Boiani and Scholer 2005; Keller 2005; Yoon and Gaiano 2005; Gilbert 2006; Abb. 1.2.1). Der Beginn der Gastrulation ist durch die Bildung einer transienten Struktur am posterioren Ende des Embryos, dem so genannte Primitivstreifen (PS), gekennzeichnet (Tam and Behringer 1997). Während der Bildung des PS, welcher das embryonale Ektoderm und Mesoderm beinhaltet, queren nicht differenzierte Zellen den posterioren Teil des PS und bilden das extraembryonale Mesoderm aus (Kinder et al. 1999). Das definitive Entoderm entwickelt sich aus Epiblastzellen, die in die anteriore Region des PS gewandert sind. Das Ektoderm bildet sich hingegen aus Zellen aus, die in der anterioren Region des Epiblasten lokalisiert und nicht durch den PS migriert sind.



**Abb. 1.2.1 Wachstumsfaktoren-Regulation während der Differenzierung von Stammzellen.** Erster Entwicklungsschritt in der Differenzierung ist die Bildung des Epiblasten, aus dem abhängig von der Lage der Zellen ein Konzentrationsgradient an Wachstumsfaktoren entsteht. So wird an einem Ende des Epiblasten durch die Wachstumsfaktoren BMP (bone morphogenic protein), Wnt (Wingless protein), Activin, FGF (Fibroblasten Wachstumsfaktor) die Ausbildung des Primitivstreifens (PS) induziert, welcher das Mesoderm und Entoderm enthält. Parallel dazu differenziert durch Blockierung oder Aktivierung von Wachstumsfaktoren und deren zugehörigen Signalwegen eine zweite Population am anderen Ende des Epiblast zum Ektoderm aus. Adaptiert nach Murray und Edgar 2004.

Die posteriore Region des Epiblasten zeichnet sich durch die Präsenz von Nodal-, BMP-, Wnt- und FGF- Proteinen aus. Am anterioren Ende des Epiblasten (extraembryonales Ektoderm, Kopfreion des Embryos) wird die Nodal-, BMP-, und Wnt-Signaltransduktion unterdrückt. Es entsteht somit ein Konzentrationsgradient an parakrinen Signalen, der sich zwischen zwei regulatorischen Zentren, dem posterior im PS angeordneten Hensen's Knoten und in dem anterior angeordneten viszeralem Entoderm (AVE) des Epiblasten aufbaut. Zwischen diesen beiden Regionen wird durch die Induktion oder Inhibierung der Signaltransduktion die Ausbildung der

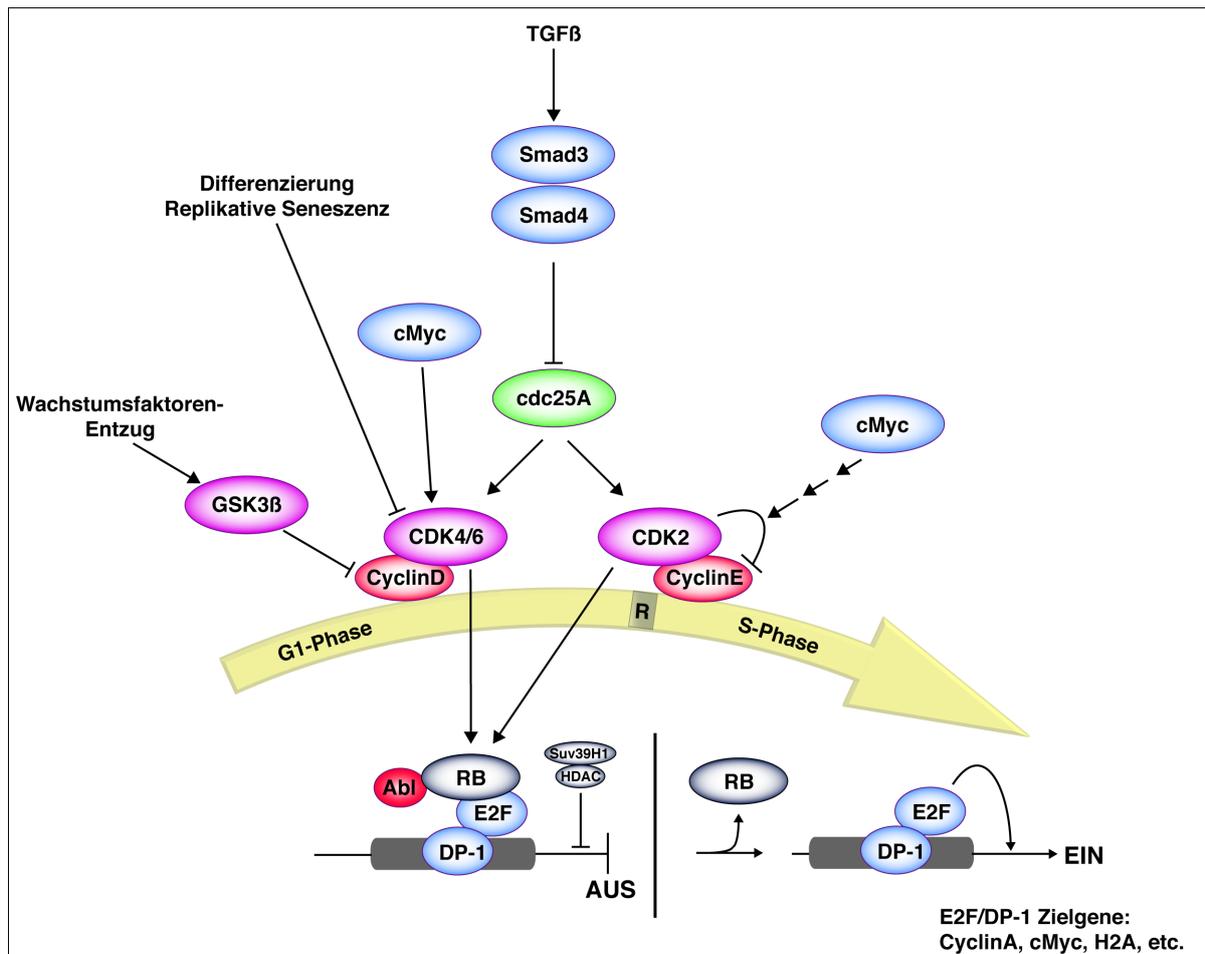
verschiedenen Gewebe reguliert. Die Spezifikation der Keimblätter und deren Derivate kann somit als ein dynamischer Prozess, der durch koordinierte und regionale Inhibierung oder Induktion des Wnt-, Nodal-, BMP-, Notch-, und FGF-Signalweges über parakrine Faktoren, den Zell-Zell-Kontakt und über die Gene *Brachyury*, *Foxa2* und *Goosecoid* gesteuert wird, angesehen werden (Murray and Edgar 2004; Gilbert 2006; Murry and Keller 2008; Watabe and Miyazono 2009).

### 1.2.1 Der Zellzyklus

Die Zygote (Abb. 1.1.1 und Abb. 1.1.2) entwickelt sich über symmetrische und asymmetrische Zellteilung zu einem komplexen, kompletten Organismus. Somit befinden sich in der frühen Embryonalentwicklung viele Zellen in einem Stadium der Zellteilung oder in der Vorbereitung zur Zellteilung. Diese Abfolge an molekularen Ereignissen nennt man Zellzyklus, der sich in zwei Phasen, die Interphase und Mitose aufteilt. Die Interphase selber unterteilt sich in drei Abschnitte, die sich von einer Ruhephase vor der DNA-Replikation (Gap1, G1), über die DNA-Synthese-Phase (S-Phase) hin zur prämitotischen Ruhephase (Gap2, G2) erstrecken. Abschließend erfolgt in der Mitose-Phase die Zellteilung. Anschließend geht die Zelle erneut zur Interphase über oder wechselt in die G0-Phase. Die G0-Phase ist der Ruhezustand einer Zelle, bei der keine DNA-Synthese stattfindet (Gap0). Proliferativ aktive Zellen, z.B. Stammzellen, durchlaufen fortwährend den Interphasen- und Mitose-Zyklus, wohingegen nicht aktive, wie z.B. differenzierende und somatische Zellen, sich in der G0-Phase befinden (Alberts 2002). Die DNA-Replikation selber ist ein höchst komplexer und äußerst sensibler Prozess, der durch viele Einflüsse, wie veränderte Umweltbedingungen oder fehlerhafte DNA-Synthese, gestört werden kann. Damit die Zelle gegebenenfalls auf veränderte Umweltbedingungen oder auch Fehler in der DNA-Replikation mit Zellarrest, DNA-Reparatur oder auch Apoptose reagieren kann, wird der Zellzyklus an drei verschiedenen Punkten kontrolliert, dem Übergang von der G1- zur S-Phase, dem Übergang von der G2- zur M-Phase und der M-Phase (Alberts 2002). Im Folgenden wird das Augenmerk vor allem auf den G1/S-Phasen-Kontrollpunkt gelegt (Abb. 1.2.2). Der G1/S-Phasen-Kontrollpunkt ist die Verbindung zwischen G1- im

---

Übergang zur S-Phase. Im Detail sind bei der Transition von Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus zwei Protein-Komplexe involviert, die Protein-Kinase-Komplexe CDK4/6-CyclinD und CDK2-CyclinE, die zusammen mit dem Retinoblastom Protein (RB) und E2F einen dynamischen Transkriptionskomplex bilden. In der G0-Phase nicht teilungsaktiver Zellen ist RB durch Hypophosphorylierung an den E2F-Transkriptionsfaktorkomplex gebunden und blockiert über diese Bindung die Transkription von Zellzyklus-assoziierten Signalwegszielgenen wie Cyclin E/A und cMyc. In teilungsaktiven Zellen hingegen wird aufgrund von extrazellulären physiologischen Signalen die Phosphorylierung von RB über CDK4/6-CyclinD und CDK2-CyclinE Komplexe aktiviert. Das phosphorylierte RB Protein bindet nicht mehr an die Transaktivierungsdomäne von E2F, der Transkriptionsfaktor wird freigesetzt und kann die Transkription von Genen aktivieren, die für die S-Phase benötigt werden (Alberts 2002). Externe Stimuli, wie TGF $\beta$ , GSK3 $\beta$  (Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ), DNA Schäden, Konfluenz der Zellen oder Wachstumsfaktorenentzug haben, wie schon kurz angerissen, einen Einfluss auf die G1/S-Transition. Zum Beispiel inhibiert das Protein TGF $\beta$  die cdc25A Transkription, eine Phosphatase die für die CDK-Aktivierung benötigt wird (Iavarone and Massague 1999). Darüber hinaus aktiviert ein Wachstumsfaktorenentzug GSK3 $\beta$ , welches die Phosphorylierung und proteosomale Degradation von CyclinD induzieren kann (Tetsu and McCormick 1999; Sato et al. 2004; Huang et al. 2007).



**Abb. 1.2.2 G1/S Zellzyklusphasen-Kontrollpunkt.** Im Übergang von der G1- zur Synthese-Phase im Zellzyklus greifen zwei verschiedene Proteinkinase-Komplexe regulatorisch in die Transition ein. Abhängig von Extrazellulären Signalen, wie Wachstumsfaktoren, Konfluenz regulieren der CDK4/6-CyclinD und CDK2-CyclinE Komplex die Bindung von Retinoblastom Protein (RB) an den E2F-DP-1 Transkriptionsfaktorkomplex und regulieren so die Expression von Genen die für die Synthese-Phase essentiell sind, Adaptiert von <http://www.cellsignal.com/reference/pathway>.

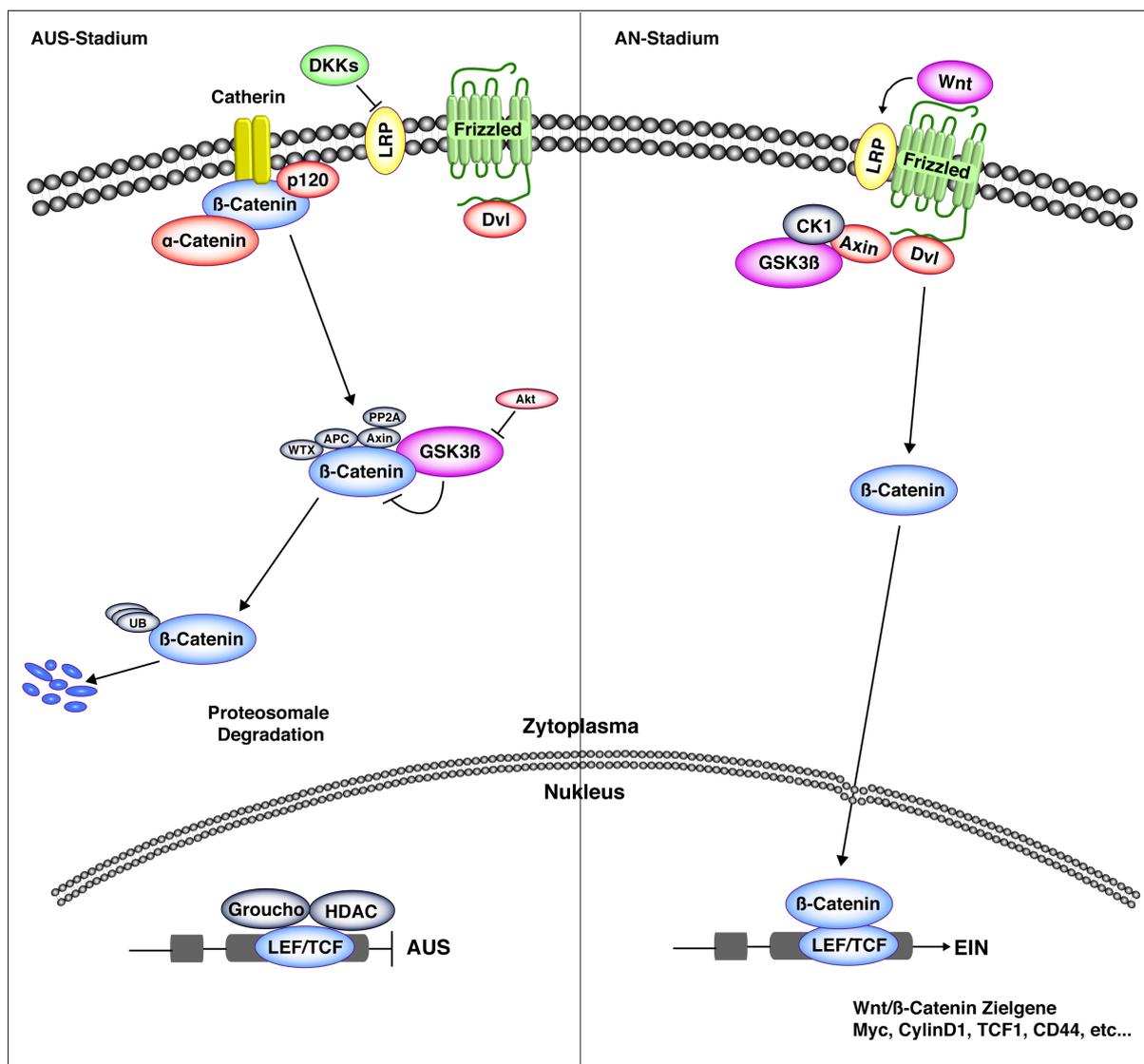
Die Regulation des Zellzyklus und Expression einiger Zellzyklus-Komponenten wie CyclinD1 und CDK2 konnte in humanen ES Zellen (hES Zellen) kürzlich von Neganova und Kollegen gezeigt werden (Neganova et al. 2009). Zusätzlich konnten sie demonstrieren, dass die Blockierung von CDK2 einen Arrest der hES Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus verursacht und eine Differenzierung in extraembryonale Zellen induziert (Neganova et al. 2009). Zhang und Kollegen konnten dem Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktor Nanog eine Rolle in der G1-S-Phasen Transition zuordnen (Zhang et al. 2009). So resultierte durch eine Heraufregulation von Nanog eine schnellere Progression von hES Zellen durch den Zellzyklus unter dem Erhalt des pluripotenten Stadiums. Eine Verbindung zwischen der Dauer des Zellzyklus und einem Differenzierungsprozess wurde anhand von

Tumorzelllinien, somatischen Zellen und adulten Stammzellen etabliert. So resultiert aus einer Inhibition Cyclin-abhängiger Kinasen in neuronalen Progenitorzellen eine Verlängerung des Zellzyklus und eine erhöhte Ausbildung von neuronalen Zellen (Calegari and Huttner 2003). Kürzlich konnte Lange et al. anhand muriner neuraler Vorläuferzellen demonstrieren, dass eine erhöhte Expression des CDK4/CyclinD1-Komplexes eine verkürzte G1-Phase und eine verspätete Neurogenese zur Folge hat (Lange et al. 2009).

### 1.2.2 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg

Die Wnt-Proteine sind extrinsische Faktoren der Wnt-Signaltransduktionskaskade und gehören zur Familie der sezernierten cysteinreichen Glykoproteine. Der Name Wnt ist eine Fusion aus dem Namen für das Segmentpolaritätsgen in *Drosophila wingless* (Wg; Cabrera et al. 1987) und seinem Ortholog aus der Maus *Integrated* (INT-1; Sharma and Chopra 1976). Der Wnt-Signalweg selber ist ein autokriner, parakriner Signaltransduktionsweg, der regulatorisch in eine Vielzahl von Prozessen während der Gastrulation und Ontogenese wie Achsen-Bildung, Mesenzephalon-Entwicklung und in der Tumorprogression involviert ist (McMahon and Bradley 1990; Logan and Nusse 2004). Die Signaltransduktion (Abb.1.2.3) erfolgt über die Bindung der parakrinen Wnt-Liganden (z.B. Wnt1, Wnt3a) an die Transmembranrezeptoren der Frizzled-Familie. In der Abwesenheit von Wnt-Liganden wird das zytoplasmatische Protein  $\beta$ -Catenin, ein transkriptioneller Co-Aktivator, durch einen Degradationskomplex (APC/GSK3 $\beta$ ) markiert. Die Markierung durch den APC/GSK3 $\beta$ -Komplex führt zu einer proteosomalen Degradation von  $\beta$ -Catenin, welches eine Inhibierung der Signaltransduktion zur Folge hat. Sind jedoch parakrine, extrazelluläre Wnt-Liganden vorhanden, so binden diese an die entsprechenden Rezeptoren der Frizzled-Familie und bewirken eine Konformationsänderung des Rezeptors. Die Konformationsänderung löst wiederum die Aktivierung des Proteins Dishevelled aus, welches seinerseits die Aktivität von GSK3 $\beta$  inhibiert, so dass keine APC/GSK3 $\beta$ -vermittelte  $\beta$ -Catenin-Degradation mehr erfolgen kann. Das so stabilisierte  $\beta$ -Catenin translokiert in den Nukleus, bildet mit einem Lef- oder einem TCF-DNA-Bindungsfaktor ein Heterodimer und induziert die

Transkription von Wnt-Signalwegzielgenen wie Myc, CyclinD1, CD44, BMP4, L1, Sox-2, Nanog, Oct-4, Rex-1 (<http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>; Cadigan and Nusse 1997; Logan and Nusse 2004; Sato et al. 2004; Nusse et al. 2008).



**Abb. 1.2.3 Der Wnt/β-Catenin-Signalweg.** Im inaktiven Zustand wird β-Catenin durch Ubiquitinierung über GSK3β abgebaut und so eine Translokation in den Nucleus unterbunden (AUS-Stadium). Sind extrazellulär jedoch Wnt-Proteine vorhanden, so inhibieren diese, über Bindung an die entsprechenden Rezeptoren, GSK3β und ermöglichen die Stabilisierung und Translokation von β-Catenin in den Nucleus. Im Nucleus fungiert β-Catenin als Ko-Transkriptionsfaktor und induziert durch Bindung und LEF/TCF die Transkription von Genen die verschiedensten Zellfunktionen, Signalwegen zugeordnet werden können (AN-Stadium).

Adaptiert von <http://www.cellsignal.com/reference/pathway>.

β-Catenin hat neben seiner Funktion als Ko-Transkriptionsfaktor im Wnt-Signalweg auch eine Funktion als integraler Bestandteil des Zell-Zelladhäsionskomplexes (der sog. Adherent junctions) inne (Nagafuchi and Takeichi 1989; Gumbiner 1993). Erste

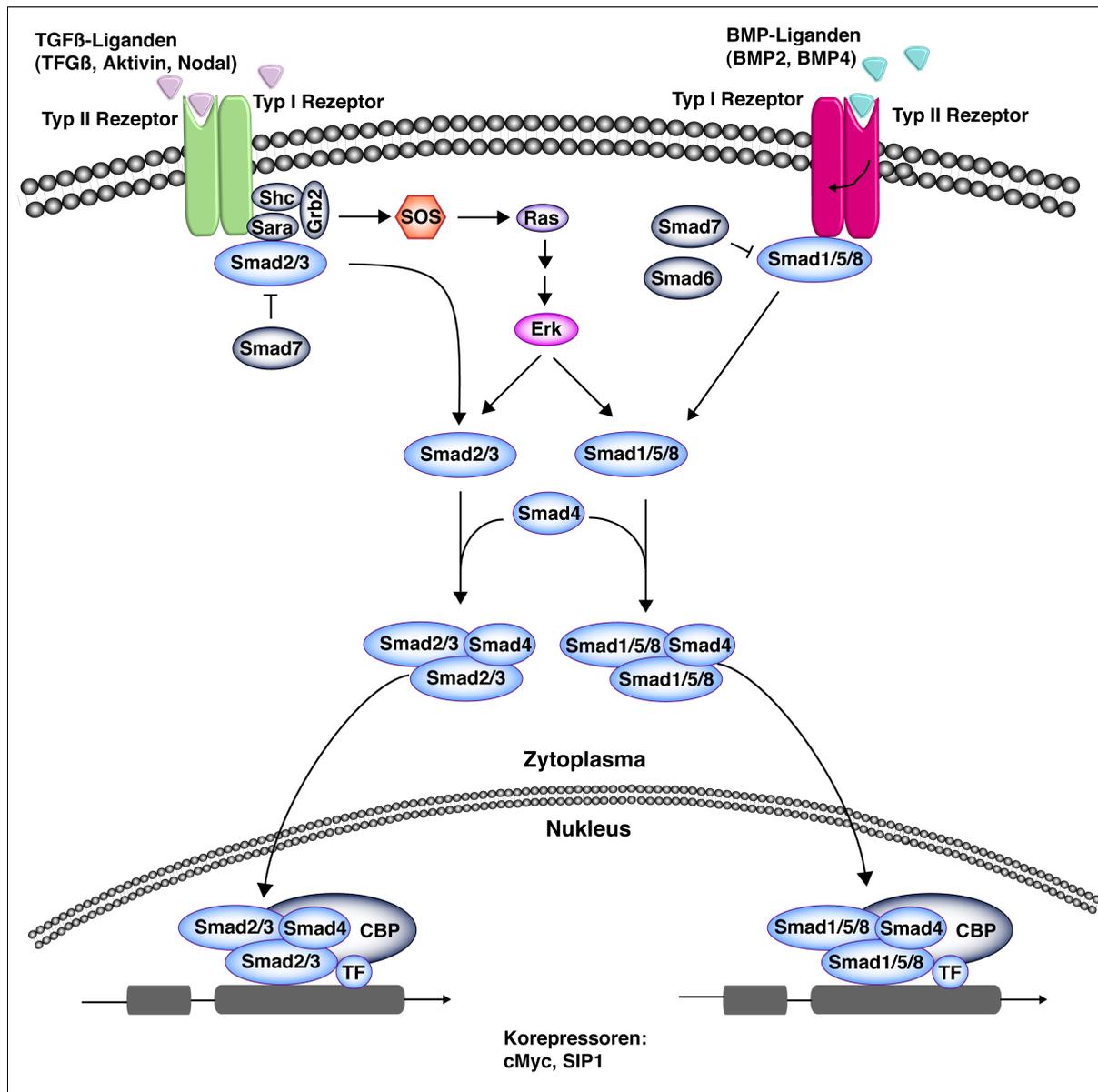
Ansätze in der Aufklärung und Einbindung des Wnt-Signalweges in der Regulation der Pluripotenzerhaltung von hES Zellen demonstrierte Sato 2004 (Sato et al. 2004). Sato und Kollegen zeigten, dass die Induktion des Wnt-Signalwegs die Expression von Oct-4 positiv regulieren kann und somit in der Aufrechterhaltung des pluripotenten Stadiums involviert ist. In neuralen Vorläuferzellen konnte bereits Ende der Neunziger von verschiedenen Arbeitsgruppen bewiesen werden, dass die Aktivierung des Wnt-Signalwegs und die Induktion der Expression direkter Signalwegzielgene wie CyclinD1, Myc und BMP eine neurale Differenzierung unterbindet (He et al. 1998; Shtutman et al. 1999). Ergänzend dazu zeigten Hägele et al., dass in ES Zellen eine Induktion des Wnt-Signalweges eine Inhibierung der neuralen Differenzierung zur Folge hat (Haegele et al. 2003). Interessanterweise ist der Wnt-Signalweg in der Neuralrückeninduktion und der Melanozytenformierung involviert (Ikeya et al. 1997; Dorsky et al. 2000; Garcia-Castro et al. 2002; Wu et al. 2003). Zechner et al. zeigte darüber hinaus, dass eine konstitutive Expressierung von  $\beta$ -Catenin in Neuralrückenstammzellen eine Expansion des Neuralrohres auslöste (Zechner et al. 2003). Die Funktion des Wnt-Signalweges während der Embryonalentwicklung und Ausbildung des Nervensystems hängt somit von dem Zeitraum und Lokalisation des Signals ab und kann darüber die Differenzierung oder Proliferation von Stammzellen induzieren (Toledo et al. 2008).

### 1.2.3 Der TGF $\beta$ /BMP-Signalweg

Strukturell können der TGF $\beta$ -Superfamilie (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) mehr als 30 Proteine zugeordnet werden, die wichtige Prozesse während der Embryonalentwicklung wie Proliferation, Differenzierung, Extrazellulär-Matrix Produktion und Zelltod regulieren (Alberts 2002). Zur TGF $\beta$ -Superfamilie an parakrinen Proteinen zählen neben den TGF $\beta$ -Proteinen die Aktivine, die BMP-Proteine (Bone Morphogenic Protein), das Nodal-Protein und darüber hinaus auch noch eine Reihe von Protein-Subgruppen (Alberts 2002; Gilbert 2006). Die Signalkaskade des TGF $\beta$ /BMP-Signalweges wird über die oben aufgeführten parakrinen Proteine der TGF $\beta$ -Superfamilie wie folgt ausgelöst (Abb. 1.2.4). Die TGF $\beta$ -Liganden binden an den entsprechenden TypII-Rezeptor, der an den direkt

---

daneben angeordneten Tgfr-Rezeptor assoziiert und dadurch die Phosphorylierung des Tgfr-Rezeptors induziert. Der so aktivierte Tgfr-Rezeptor leitet das extrazelluläre Signal durch die Phosphorylierung der zytoplasmatisch lokalisierten Signalwegstransduktionsproteine der Smad-Gruppe weiter. Die Phosphorylierung von Smad1, 5 und 8 wird von der BMP-Familie und deren Rezeptoren induziert, wohingegen die Phosphorylierung von Smad2 und 3 von der Bindung von Aktivinen oder Nodal an den entsprechenden Rezeptor abhängig ist. Die Aktivierung der Smads durch Phosphorylierung löst eine Interaktion und Komplexbildung mit dem Signaltransduktionsprotein Smad4 aus. Dieser Komplex, Smad2/3-Smad4 oder Smad1/5/8-Smad4 translokiert in den Nukleus und induziert oder reprimiert die Expression von Signalwegszielgenen wie Foxj1, Wnt3a, Dkk1, Goosecoid, Brachyury, cMyc (Chen and Panchision 2007; Guo and Wang 2009).



**Abb. 1.2.4 Der TGFβ/BMP-Signalweg.** Abhängig von Bindung der extrazellulären Faktoren wie TGFβ, BMP oder Aktivin an den Rezeptor, diffundiert Smad2/3 oder Smad1/5/8 in das Zytoplasma, bindet an Smad4 und bilden einen Proteinkomplex der in den Nucleus transloziert. Im Nucleus selber bindet diese Komplexe an CBP und induzieren oder inhibieren, abhängig von Extrazellulären Signal die Transkriptionen von Signalwegszielgenen wie cMyc oder Brachyury.

Adaptiert von <http://www.cellsignal.com/reference/pathway>.

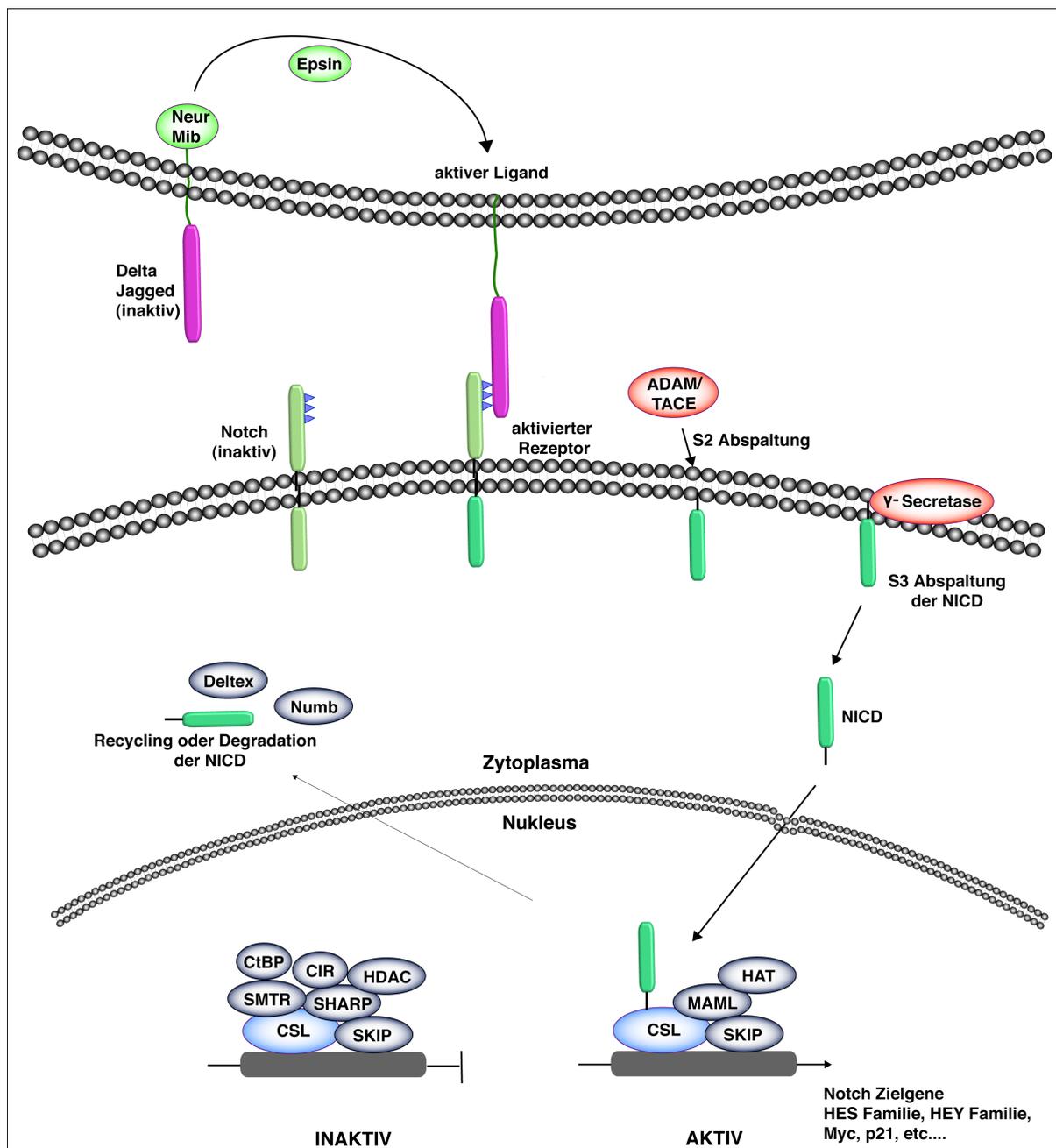
In hES Zellen nimmt der TGFβ/BMP-Signalweg neben dem Wnt-Signalweg eine entscheidende Rolle im Erhalt der Stammzellcharakteristika ein (Watabe and Miyazono 2009). So konnte dem Nodal-Protein bei dem Erhalt der Pluripotenz und der Selbsterneuerung eine wichtige Position zugeordnet werden (Besser 2004; Brandenberger et al. 2004). Im Einklang damit konnte James et al. in differenzierenden hES Zellen das Absinken der Smad2/3 Phosphorylierung und einen Anstieg der Smad1/5/8 Phosphorylierung beobachten (James et al. 2005). Die

Reduktion der Smad2- und Erhöhung der Smad1/5/8-Phosphorylierung und die damit verbundene Reduktion des pluripotenten Stadiums von hES Zellen konnten von Vallier et al. durch Inhibitor-experimente gestützt werden (Vallier et al. 2005). Darüber hinaus zeigte Vallier et al., dass durch eine Interaktion von Aktivinen und Nodal mit dem FGF-2-Signalweg das pluripotente Stadium von hES Zellen erhalten werden kann, ohne auf Feeder-Zellen, konditioniertes Medium oder Serum zurückgreifen zu müssen. Somit ist eine Smad2/3-Phosphorylierung mit dem pluripotenten und eine Smad1/5/8-Phosphorylierung mit dem differenzierenden Stadium von hES Zellen verknüpft. Ergänzend dazu konnte erstmals von Xu et al. und Kollegen gezeigt werden, dass Nanog ein direktes Signalwegszielgen der TGF $\beta$ /Aktivin-vermittelten Signaltransduktion ist (Xu et al. 2008). Welche Rolle die Phosphorylierung von Smad2/3 durch TGF $\beta$ s, Aktivine oder Nodal in der neuronalen Differenzierung einnimmt, ist bis heute noch nicht gänzlich geklärt. Kürzlich konnte Smith et al. zeigen, dass die Blockierung von Aktivin/Nodal und damit des TGF $\beta$ -Signalweges die Spezifikation von hES Zellen in Neuroektoderm unterstützt (Smith et al. 2008). Eine weitere regulatorische Gruppe von Proteinen der TGF $\beta$ -Superfamilie sind die BMP-Proteine. Ursprünglich wurde der BMP-Familie der Name Bone Morphogenetic Protein (BMP) gegeben, da sie erstmals im Zusammenhang mit der Fähigkeit die Knochenbildung zu induzieren, entdeckt wurden. Studien zeigten jedoch, dass sie multifunktional sind und an der Regulation von Zellteilung, Apoptose, Zellmigration und Differentiation beteiligt sind (Alberts 2002; Gilbert 2006). In murinen ES Zellen unterstützt der parakrine Faktor BMP4 zusammen mit LIF (Leukemia Inhibitory Factor) die Pluripotenzerhaltung (Niwa et al. 1998; Ying et al. 2003). In humanen ES Zellen, in denen der LIF/STAT3-Signalweg nicht aktiv ist (Daheron et al. 2004), unterstützt BMP4 die Pluripotenzerhaltung nicht, sondern induziert die Differenzierung in Trophoblasten (Xu et al. 2002). In der Embryonalentwicklung selbst kommt dem Protein BMP4 die Rolle eines Antineurogenese-Faktors zu. Zusätzlich steuern die BMP-Antagonisten Noggin und Chordin durch BMP-Signalwegsinhibierung die initiale Differenzierung von Epiblastzellen in Neuroektoderm (Gilbert 2006). Konträr dazu können BMPs jedoch die Bildung der Neuralleiste (neural crest) induzieren, darüber hinaus aber die

Differenzierung von Oligodendrozyten inhibieren (Nguyen et al. 2000; Colas and Schoenwolf 2001; Panchision et al. 2001; Chen and Panchision 2007). Ergänzend dazu konnte kürzlich von Chambers et al. gezeigt werden, dass eine Blockierung sowohl der TGF $\beta$ - als auch der BMP-vermittelten Signaltransduktion eine effiziente Generierung von neuronalen Zellen aus hES und iPS Zellen ermöglicht (Chambers et al. 2009). Somit kommt die in vitro-Regulation der Pluripotenzerhaltung und Differenzierung von ES Zellen in die einzelnen Keimblätter durch die TGF $\beta$ -Superfamilie und deren Signaltransduktionsmechanismen dem in vivo System sehr nahe (Watabe and Miyazono 2009).

#### 1.2.4 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist ein evolutionär hochkonservierter Mechanismus, der ein breites Spektrum an Zelldifferenzierungs- und entwicklungsbiologischen Prozessen von *Drosophila melanogaster* bis zum Menschen steuert (Alberts 2002; Gilbert 2006). Während der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und der TGF $\beta$ /BMP-Signalweg über die Interaktion mit sezernierten Proteinen aktiviert werden können, wird der Notch-Signalweg durch die Interaktion von transmembran gebundenen Proteinen induziert (Abb. 1.2.5). Zu den transmembran lokalisierten Proteinen zählen im Notch-Signalweg die Liganden Delta und Jagged und der Rezeptor Notch (Notch 1-4). Zellen mit Liganden können über die Bindung an den Notch-Rezeptor einer Nachbarzelle den Notch-Signalweg aktivieren. Interagiert ein Ligand wie Delta mit dem Notch-Rezeptor, so vollzieht dieser eine Konformationsänderung, die die proteolytische Abspaltung der intrazellulären Domäne (notch intracellular domain, NICD) durch  $\gamma$ -Sekretasen ermöglicht. Das abgespaltene NICD translokiert in den Nucleus und bindet dort an Transkriptionsfaktoren der CSL-Familie. Anschließend beginnt dieser Komplex, aktiviert durch die Bindung von NICD, die Transkription von Signalwegszielgenen wie den Hes und Hey Genen, aber auch Myc (Lecourtois and Schweisguth 1998; Struhl and Adachi 1998; Alberts 2002; Gilbert 2006). Man kann somit Notch, bzw. seine intrazelluläre Domäne als Membran-gebundenen Transkriptionsfaktor ansehen (Kopan 2002).



**Abb. 1.2.5 Der Notch-Signalweg.** Im inaktiven Zustand ist der Notch-Rezeptor Transmembran lokalisiert. Untergeht der Notch-Rezeptor eine Bindung mit einem Liganden (Delta, Jagged), so wird der Rezeptor aktiviert, die intrazellulär lokalisierte Domäne von Notch (NICD) über verschiedenen Abspaltungsstufen (ADAM/TAEC;  $\gamma$ -Sekretase) abgespalten und in den Nukleus translokiert. Hier fungiert die NICD als Ko-Transkriptionsfaktor, wo sie die Transkription von Signalwegszielgenen wie die Hey- und Hes-Gene induziert. Adaptiert von <http://www.cellsignal.com/reference/pathway>.

Regulatorisch haben die Notch-Liganden und Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems und in der adulten Neurogenese, sowohl in *Drosophila* als auch während der Ausbildung des Vertebraten-Nervensystems inne (Gilbert 2006). Die Rolle des Notch-Signalweges während der neuralen Differenzierung ist sehr gut charakterisiert (Artavanis-Tsakonas et al. 1999; Lai 2004;

Yoon and Gaiano 2005). So konnte gezeigt werden, dass Notch das Überleben von neuronalen Vorläuferzellen fördert und für die Multipotenzenerhaltung von neuronalen Vorläuferzellen essentiell ist (Androutsellis-Theotokis et al. 2006). In mES Zellen scheint der Notch-Signalweg aktiv zu sein. So konnte Lowell et al. zeigen, dass in mES Zellen nach dem Entzug der pluripotenzhaltenden Faktoren LIF und BMP4 der Notch Signalweg zusammen mit dem FGF Signalweg die Differenzierung in die neurale Richtung delegiert (Lowell et al. 2006). In hES Zellen konnten zwar Notch-Rezeptoren und -Liganden auf mRNA und Protein-Ebene detektiert werden, sind aber inaktiv (Walsh and Andrews 2003; Brandenberger et al. 2004; Noggle et al. 2006; Xiao et al. 2006). Yu et al. konnten erstmals die entwicklungsbiologische Bedeutung von Notch während der Differenzierung von hES Zellen aufdecken. Yu und Kollegen zeigten, dass in hES Zellen der Notch-Signalweg inaktiv ist und zum Erhalt des pluripotenten Stadiums nicht benötigt wird. Mit Induktion der Differenzierung wird jedoch der Notch-Signalweg aktiv und wird für die Differenzierung, nicht aber für die trophektodermale Differenzierung benötigt (Yu et al. 2008). Ergänzend dazu konnte bereits 2006 von Lowell und Kollegen nachgewiesen werden, dass die Notch-Signalübertragung die Differenzierung von hES Zellen in neurale Zellen unterstützt (Lowell et al. 2006).

### **1.3 Sauerstoff in der Entwicklungsbiologie und Zellkultur**

#### **1.3.1 Sauerstoff während der Embryonalentwicklung und im adulten Vertebraten**

Molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ), der mit 20,8% in der Atmosphäre vertreten ist, benötigen fast alle Organismen, wie Bakterien, Hefen, Invertebraten und Vertebraten zum Leben. Sauerstoff ist in vielen biochemischen Reaktionen der Zelle eingebunden und wird von Mitochondrien als Elektronenakzeptor in der Oxidativen Phosphorylierung, bei der Generierung von ATP (Adenosintriphosphat), verwendet. Im embryonalen und im adulten Gewebe liegt der Sauerstoffgehalt weit unter dem Luftsauerstoffgehalt, variiert abhängig vom Gewebe und liegt zwischen 2% und 14% (Simon and Keith 2008). Der sich entwickelnde Embryo findet während der ersten Phase der Entwicklung im Ovidukt eine Sauerstoffkonzentration von 5% bis 10%

(Rhesus-Affe, Kaninchen) und in utero eine Sauerstoffkonzentration von 1% bis 5% (Rhesus-Affe, Hamster) vor (Fischer and Bavister 1993; Lee et al. 2001; Okazaki 2006). Der Embryo wandert somit in den ersten Tagen der Entwicklung durch einen abnehmenden Konzentrationsgradienten an Sauerstoff und ist zusätzlich, bis zur Implantation und Ausbildung des Chorion, auf Sauerstoffdiffusion aus dem extrazellulären Milieu angewiesen. In anderen Regionen des adulten Vertebraten variiert der Sauerstoffgehalt sehr stark, wie zum Beispiel im Gehirn. Dort liegt der Sauerstoffgehalt zwischen 0,8% und 2,1% in der weißen Substanz, 1,4% und 2,1% im Hypothalamus, 2,6% und 3,9% im Hippocampus und bei 2,5% bis 5,3% in der Grauen Substanz (Whalen et al. 1970; Silver and Erecinska 1998). Die Aufrechterhaltung des Gewebesauerstoffgehaltes in einem Organismus kann durch verschiedenste Prozesse auf molekularer Ebene durch die hypoxia-inducible transcription factors (Hifs), mTOR (mammalian target of rapamycin) und die Endoplasmatische Retikulum Stressantwort reguliert werden (Semenza 1999; Liu and Simon 2004; Wouters et al. 2005). In vivo, sowohl in dem sich entwickelnden Embryo als auch im adulten Gewebe, liegt eine begrenzte hypoxische Umgebung (microenvironment) vor, die spezifische Nischen ausbildet, in denen Zellteilung und Differenzierung reguliert werden. Vorwiegend sind in solchen Nischen Stammzellen lokalisiert, die aus diesem Grund auch Stammzellnischen genannt werden (Maltepe and Simon 1998; Jones and Wagers 2008; Panchision 2009).

### **1.3.2 Sauerstoff in der Zellkulturtechnologie**

Eine erste Verbindung zwischen der Embryogenese und Sauerstoff konnte in den späten siebziger Jahren von Morriss und New gezeigt werden. Sie demonstrierten erfolgreich, dass die Entwicklung der Neuralfalte von ex utero Rattenembryonen abhängig von einem niedrigen Sauerstoffgehalt war (Morriss and New 1979). Dieser erste in vitro Versuch zeigte, wie evident ein niedriger Sauerstoffgehalt für die Embryonalentwicklung und darüber hinaus für die Ausbildung der Stammzellnischen ist. Konventionell werden Zellen in vitro bei atmosphärischem Sauerstoffgehalt von 20,8% kultiviert. In vivo liegt der Sauerstoffgehalt jedoch, wie schon oben aufgeführt, deutlich darunter. Eine Anwendung einer physiologischen, gewebespezifischen

---

Sauerstoffkonzentration während der *in vitro* Kultivierung von Zellen liegt somit auf der Hand, um ihnen Kultivierungsbedingungen zu bieten, die den *in vivo* Bedingungen so nahe wie möglich kommen. Die Kultivierung unter *in vivo* Bedingungen könnte somit zu einem besseren Verständnis der *in vivo* Entwicklung und Differenzierung des Embryos, der extra- und intrazelluläre Wechselwirkungen von Stammzellen, aber auch somatischen Zellen beitragen. Bereits 1987 wurde ein niedriger Sauerstoffgehalt während der *in vitro* Fertilisation (IVF) und Kultivierung präimplantierter humaner Embryonen angewandt (Bolton and Braude 1987). Es zeigte sich aber, dass gegenüber der Verwendung von einem atmosphärischen Sauerstoffgehalt eine Kultivierung unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt keine positiven oder negativen Auswirkungen sowohl bei dem Erfolg der IVF als auch bei der weiteren Entwicklung hatte (Dumoulin et al. 1995; Dumoulin et al. 1999). Neuere klinische Studien zeigen, dass bei einer Kultivierung von Embryonen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt, immer noch keine eindeutige Tendenz eines Förderlichen Effektes in der Implantation festzustellen ist (Kea et al. 2007), so dass es weiterer klinischen Studien bedarf. Die Rolle eines niedrigen Sauerstoffgehaltes während der Kultivierung von ES Zellen wird in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert. Für murine ES Zellen konnte Jeong und Kollegen nachweisen, dass eine Kultivierung von murinen ES Zellen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt eine Reprimierung des LIF/STAT3-Signalweges und damit eine *in vitro* Differenzierung und verlangsamte Proliferation der Zellen verursachte (Kurosawa et al. 2006; Jeong et al. 2007). Kontrovers zu den Daten zur hypoxischen Kultivierung von murinen ES Zellen wurden zum Teil Daten für hES Zellen erhoben. So zeigten einige Arbeitsgruppen, dass eine hypoxische Kultivierung die Spontandifferenzierung von hES Zellen reprimiert (Forristal et al.; Ezashi et al. 2005; Forsyth et al. 2006; Prasad et al. 2009). Konträr dazu zeigten Chen und Kollegen 2009, dass durch eine hypoxische Kultivierung die Proliferation von hES Zellen verlangsamt und Differenzierung induziert wird (Chen et al. 2009). Ergänzend dazu konnte Cameron et al. 2008 in hES Zellen und daraus hypoxisch differenzierenden EBs zeigen, dass unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt die Proliferation verlangsamt ist und die Expression Pluripotenz-assoziiierter Marker schneller absinkt. Darüber hinaus konnte

eine verbesserte Differenzierung der EBs beobachtet werden (Cameron et al. 2008). Zusätzlich konnte unter hypoxischen Bedingungen eine verbesserte Differenzierung in Mesoderm und Kardiomyozyten von aus humanen ES Zellen generierten EBs schon vielfach gezeigt werden (Ramirez-Bergeron and Simon 2001; Bauwens et al. 2005; Niebruegge et al. 2008). Kürzlich wurde ergänzend dazu von Prado-Lopez und Kollegen gezeigt, dass eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen eine verlangsamte Proliferation und initiale mesodermale Differenzierung zur Folge hat (Prado-Lopez et al. 2010).

Bereits in den frühen neunziger Jahren wurden niedrige Sauerstoffgehalte während der in vitro Kultivierung von Nervenzellen eingesetzt. So zeigte Masuda 1994, dass ein Sauerstoffgehalt von 1% bei der Kultivierung von Rattenastrozyten eine erhöhte Erythropoetin-Produktion zur Folge hatte (Masuda et al. 1994). 2000 zeigte Studer et al., dass eine hypoxische Kultivierung von Vorläuferzellen des Zentralnervensystems der Ratte die Proliferation und den Erhalt des multipotenten Stadiums und darüber hinaus eine dopaminerge Differenzierung positiv unterstützt (Studer et al. 2000). Im gleichen Jahr beschrieb Morrison den positiven Effekt eines niedrigen Sauerstoffgehaltes auf das Überleben, die Proliferation und eine neuronale Differenzierung von Neuralrückenstammzellen der Ratte (Morrison et al. 2000). 2005 zeigten Zhu und Kollegen, dass Hypoxie das Wachstum und Überleben von neuronalen Stammzellen der Ratte fördert und zusätzlich bei einer hypoxischen Differenzierung die Anzahl an dopaminergen Neuronen erhöht werden kann (Zhu et al. 2005). Shin et al. zeigte 2006, dass eine hypoxische Kultivierung von aus hES Zellen differenzierten neuroepithelialen Stammzellen einen positiven Effekt auf die Multipotenzenerhaltung hatte (Shin et al. 2006). Ergänzend dazu konnte Pistallo und Kollegen anhand von Studien demonstrieren, dass eine hypoxische Kultivierung von humanen postnatalen Vorläuferzellen des Nervengewebes die Expression von Multipotenzmarkern unterstützt (Pistollato et al. 2007).

### **1.3.3 Der Hif1-Signalweg**

Hif1 ist ein heterodimerer DNA-bindender Komplex, der aus zwei basic helix-loop-helix (bHLH) Proteinen der PAS Familie besteht, dem konstitutiv exprimierten Hif1 $\beta$

(ARNT, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) und einer vom Zelltyp abhängigen sauerstoffsensitiven Untereinheit, Hif1 $\alpha$ , Hif2 $\alpha$  oder Hif3 $\alpha$  (Semenza 1999; Park et al. 2003). Unter normoxischen Bedingungen wird Hif1 $\alpha$  durch Ubiquitinierung sehr schnell abgebaut. Aufgrund dessen synthetisieren und degradieren normoxisch propagierte Zellen permanent Hif1 $\alpha$  bzw. Hif2 $\alpha$ , um auf eine mögliche Änderung des Umgebungssauerstoffgehaltes schnell reagieren zu können. Selber wird die Degradation von Hif1 $\alpha$  durch Hydroxylierung und Interaktion mit dem von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (pVHL) vermittelt (Semenza 1999; Semenza 2001). Findet die Zelle einen niedrigen Sauerstoffgehalt in ihrem Umfeld vor, so wird die sauerstoffsensitive Untereinheit Hif1 $\alpha$  stabilisiert und bildet zusammen mit Hif1 $\beta$  ein Heterodimer. Dieses Heterodimer translokiert in den Nukleus und bindet an die Hypoxia Response Elements (HREs) in den regulatorischen Zentren der Zielgene und induziert oder reprimiert deren Transkription, wie VEGF (Vascular endothelial growth factor), EPO (Erythropoetin) aber auch Oct-4, Nanog und Rex-1 (Forristal et al.; Covelto et al. 2006; Rankin and Giaccia 2008; Forristal et al. 2009).

#### **1.3.4 Interaktion des Hif1-Signalweg mit entwicklungsbiologisch relevanten Signalwegen**

Über die Interaktion des Hif1-Signalwegs mit entwicklungsbiologisch relevanten Signalwegen wie Wnt, TGF $\beta$ /BMP, Notch oder auch dem Zellzyklus ist nur wenig bekannt. Die meisten Studien zur Interaktion wurden anhand von Krebszellen und anderen multipotenten Vorläuferzellen der unterschiedlichsten Gewebe beschrieben. So konnte Gustafsson et al. 2005 demonstrieren, dass unter hypoxischen Bedingungen für den Erhalt des multipotenten Stadiums von murinen myogenen Zellen, embryonalen Teratokarzinomzellen sowie multipotenten Stammzellen des Rattenkortex der Notch-Signalweg benötigt wird (Gustafsson et al. 2005). Zusätzlich zeigten Panchision und Kollegen, dass in neuralen Vorläuferzellen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt der Notch-Signalweg induziert wird und die Smad1/5/8-Signaltransduktion über Hif1 $\alpha$ -vermittelte Blockierung inhibiert wird (Panchision 2009). In kolorektalen Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass unter hypoxischen

---

Bedingungen die  $\beta$ -Catenin-TCF4-Bindung durch Hif1 $\alpha$  unterbunden und dadurch die cMyc-Expression reduziert wird. Die Reduktion von cMyc führte zu einer leichten Erhöhung der Apoptose und einem G1-Zellzyklusarrest, ohne jedoch die Expression von  $\beta$ -Catenin zu beeinflussen (Kaidi et al. 2007). Ergänzend dazu ist GSK3 $\beta$  an der Degradation von Hif1 $\alpha$  beteiligt (Flugel et al. 2007). Einzig Chen et al. deutete an, dass eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen die Wnt-Signaltransduktion reprimiert (Chen et al. 2009). Die Interaktion von Hif1 $\alpha$  und TGF $\beta$ - bzw. des BMP-Signalweges ist jedoch von dem jeweiligen Zelltyp abhängig. So konnte für Blutzellen eine erhöhte Smad2/3-Phosphorylierung unter hypoxischen Bedingungen beobachtet werden (Zhang et al. 2003). Wohingegen eine hypoxische Kultivierung eine Erhöhung der Expression von BMP2 in humanen Glioblastomzellen hervorruft und die Smad1/5/8-Signaltransduktion erhöht ist (Pistollato et al. 2009; Pistollato et al. 2009).

Inwieweit die einzelnen Signalwege in Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen regulatorisch in die Pluripotenzerhaltung und Differenzierung eingebunden sind, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nur wenig analysiert.

## **1.4 Ziele der Arbeit**

Im Rahmen dieser Dissertation sollten in einem in vivo nahen Kontext die Kultivierung und Differenzierung von humanen ES Zellen unter hypoxischen Bedingungen analysiert werden. Das Verständnis der in vivo Embryonalentwicklung und der Einfluss der einzelnen Signalwege ist essentiell, um Verfahren zu entwickeln, die in vitro eine stabile, reproduzierbare Produktion von sowohl pluripotenten, multipotenten als auch somatische Zellen für die regenerative Medizin ermöglichen. Eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen sollte somit eine Simulation der in vivo Bedingungen des sich entwickelnden Embryos bis zur Implantation und Vaskularisierung darstellen.

### **1.4.1 Etablierung eines hypoxischen Kultivierungssystems für humane ES Zellkulturen**

In einem ersten Teil der Arbeit sollte ein Kultivierungssystem für die hypoxische Kultivierung von embryonalen Stammzellen und deren differenzierten Derivate anhand von hES Zellen etabliert werden. Hierzu zählt die Analyse des Gelöstsauerstoffes und der Nachweis von sauerstoffsensitiven Proteinen.

### **1.4.2 Kultivierung von hES Zellen und Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen**

Auf Grundlage der im ersten Teil erbrachten Ergebnisse sollte in weiteren Experimenten detailliert die Kultivierung von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen analysiert werden. Darüber hinaus sollten zusätzlich im Vergleich zu konventionell, normoxisch kultivierten Zellen entwicklungsbiologisch relevante Signaltransduktionswege auf ihre Expression hin analysiert werden. Ergänzend dazu sollte der Einfluss einer hypoxischen Differenzierung von hES Zellen in neurale Vorläuferzellen und die Einbindung der einzelnen Signalwege untersucht werden.

### **1.4.3 Kultivierung von neuronalen Vorläuferzellen**

Aufbauend auf dem zweiten Teil der Arbeit sollte darüber hinaus die Kultivierung von neuronalen Vorläuferzellen unter hypoxischen Bedingungen eingehend analysiert werden. Neben der Auswirkung auf Proliferation und Multipotenzserhaltung sollten darüber hinaus auch die für die neuroektodermale Entwicklung relevanten Signalwege wie Notch, TGF $\beta$ /BMP und Wnt analysiert werden.

## **2. Material und Methoden**

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden im Einklang mit dem deutschen Stammzellgesetz und im Rahmen von durch das Robert-Koch-Institut genehmigten Projekten durchgeführt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien, Geräte und Lösungen wurden vor Verwendung entsprechend nach Bedarf sterilisiert (Autoklavieren, Steril filtrieren, Hitzesterilisation) oder steril von dem jeweiligen Hersteller bezogen.

Eine vollständige Auflistung aller verwendeten Geräte, Materialien, Chemikalien, Lösungen und Antikörper mit Herstellerangabe befindet sich im Anhang (9.0).

### **2.1 Zelllinien**

Für die Kultivierung von humanen ES Zellen wurden die Zelllinien H9.2, H9 und I3 eingesetzt. Zur direkten Konversion wurden die Zellen der Linie H9 und I3 eingesetzt. Die Kultivierung neuraler Vorläuferzellen wurde mit Zellen der Zelllinie H9.2 durchgeführt. Für die Gewinnung konditioniertem Mediums wurden  $\gamma$ -bestrahlte primäre embryonale Fibroblasten der Maus (murine embryonal fibroblasts, MEF) aus Embryonen des Mausstammes CD1 (Charles River, Sulzfeld) gewonnen. Die in dieser Arbeit verwendeten hES Zelllinien wurden von Joseph Itskovitz-Eldor, Haifa, Israel, bezogen.

### **2.2 Besondere Systeme zur Zellkultivierung**

#### **2.2.1 Sauerstoffregulierbare Inkubatoren**

Zur hypoxischen Kultivierung der oben genannten Zelllinien, wurden Sauerstoffregulierte Inkubatoren der Firma Thermo Fisher Scientific eingesetzt. Der Kohlenstoffdioxidgehalt blieb während der gesamten Kultivierungsdauer konstant bei 5%.

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Fibroblasten für die ES Zellkultur

#### 2.3.1.1 Präparation primärer muriner embryonaler Fibroblasten

*Zum Erhalt des pluripotenten Stadiums von hES Zellen ist die Ko-kultivierung mit mitotisch inaktivierten murinen Fibroblasten essentiell.*

Zur Gewinnung primärer muriner embryonaler Fibroblasten wurden Mäuse des Stammes CD1 an Tag 13,5 bis 14,5 der Embryonalentwicklung aus dem Uterus herauspräpariert und in PBS gewaschen. Der Kopf wurde entfernt, die inneren Organe entnommen und das verbleibende Bindegewebe mehrmals mit PBS gewaschen. Die Gewebestücke wurde mit einer Schere fein zerkleinert, in 50ml 1,5x Trypsin/EDTA resuspendiert und in einen Erlenmeyerkolben mit Glaskugeln ( $\varnothing$  4mm) überführt. Die Inkubation mit Trypsin/EDTA erfolgte für 30min unter Rühren (50rpm) bei 37°C und wurde durch Zugabe von 50ml FCS-haltigem MEF-Medium abgestoppt. Zur Trennung der Zellsuspension von Glaskugeln und verbleibende Gewebestücke wurde die Zellsuspension durch ein Sieb gegeben und für 5 Minuten bei 1200rpm abzentrifugiert. Nach Resuspendierung des Pellets wurden die Zellen in einer Dichte von  $3,7 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Qualitätskontrolle wurde nach drei bis vier Tagen das Medium auf Mycoplasmen hin untersucht. Bei negativem Mycoplasma-Testergebnis wurden die Zellen bei Erreichen der Konfluenz eingefroren. Zur Zellernte wurden die Schalen zweimal mit PBS gewaschen und für 5 Minuten bei 37°C mit 1x Trypsin/EDTA inkubiert. Das Trypsin/EDTA wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium MEF-Medium abgestoppt, die Zellen von der Schale gespült und die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1200rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1ml MEF-Medium pro 15cm-Zellkulturschale resuspendiert. Das DMSO-haltige MEF-Gefriermedium wurde im Verhältnis 1:1 zu der Zellsuspension zugegeben, abschließend wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt, wobei pro Kryoröhrchen 1ml Zellsuspension eingefroren wurde. Nach Aliquotieren der Zellsuspension wurden die Kryoröhrchen in Styroporboxen für 1 Stunde bei -20°C

und über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Abschließend erfolgte die Langzeitlagerung in der in der Gasphase von flüssigem Stickstoff.

### **2.3.1.2 Kultivierung primärer muriner embryonaler Fibroblasten**

Ein Röhrchen kryokonservierten murinen embryonalen Fibroblasten wurde bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut und in 10ml vorgelegtes MEF-Medium überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1200rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und das Pellet in MEF-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension auf drei 15cm-Zellkulturschalen pro Kryoröhrchen ausplattiert und bis zur Konfluenz bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.3.1.1 beschrieben trypsinisiert und im Verhältnis 1:3 replattiert.

### **2.3.1.3 Mitotische Inaktivierung muriner embryonaler Fibroblasten durch $\gamma$ -Bestrahlung**

*Um zu garantieren, das bei einer Ko-kultur die embryonalen Stammzellen nicht von Fibroblasten überwuchert werden, werden diese mitotisch inaktiviert.*

Zur  $\gamma$ -Bestrahlung wurden konfluente MEF 15cm-Zellkulturschalen verwendet. Zur Gewinnung der MEF wurden diese wie unter 2.3.1.1 mit Trypsin behandelt, pelletiert und Zellpellets von maximal Dreißig 15cm-Zellkulturschalen in einem Endvolumen von 35ml MEF-Medium resuspendiert. Die MEF-Zellsuspension wurde in eine T125-Zellkulturflasche überführt und bis zur Bestrahlung (max. 1h nach Aberntung der Schalen) auf Eis gelagert. Die  $\gamma$ -Bestrahlung fand in der Funktions- Einheit Strahlentherapie der Radiologischen Universitätsklinik Bonn (MEVATRON MD2, Siemens) oder am Institut für Experimentelle Therapie des Universitätsklinikum Bonn (RadSource 2000, Rad Source Technologies, Inc.) statt. Die Fibroblasten wurden in beiden Fällen mit 15Gy Einzeldosis bestrahlt. Direkt nach mitotischer Inaktivierung wurden die  $\gamma$ -bestrahlten Fibroblasten wie unter 2.3.1.1 in einer Dichte von  $2,4 \times 10^6$  Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren.

### **2.3.1.4 Auftauen mitotisch inaktivierter muriner embryonaler Fibroblasten**

*In dieser Arbeit wurde zur Kultivierung von humanen ES Zellen serumfreies Medium verwendet, welches nicht zur Kultivierung von Fibroblasten geeignet ist. Aufgrund des fehlenden Serums verändern Fibroblasten in Ko-kultur mit hES Zellen bereits nach 24h ihre Morphologie, werden spindelförmig und lösen sich je nach Qualität nach etwa einer Woche von der Zellkulturschale ab. Um zu Garantieren, das die mitotisch inaktivierten Fibroblasten eine gleichbleibende Qualität haben, werden diese einen Tag bevor die hES Zellen als Ko-kultur zugegeben werden, in MEF-Medium ausgesät.*

Zur Ko-kultivierung von hES Zellen wurden Sechs-Well-Zellkulturplatten für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1% Gelatine beschichtet. Röhrcchen mit kryokonservierten mitotisch inaktierten Fibroblasten wurden zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in 10ml vorgelegtes MEF-Medium überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1200rpm für 5 Minuten abzentrifugiert, das Pellet in MEF-Medium resuspendiert und auf zwei Gelatine-beschichtete Sechs-Well-Zellkulturplatten in einer Dichte von  $2,63 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausplattiert. Vor Inokulation der Schalen mit hES Zellen wurden diese über Nacht bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Plattierte mitotisch inaktivierte Fibroblasten wurden für höchstens drei Tage nach dem Ausplattieren für die humane ES Zellkultur verwendet.

### **2.3.1.5 Herstellung konditionierten Mediums von mitotisch inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten**

*Eine Alternative zur Ko-kultivierung von hES Zellen mit murinen Fibroblasten bietet die Kultivierung von hES Zellen auf einer extrazellulären Matrix (z.B. Matrigel®). Hierbei ist es jedoch essentiell, das als Kultivierungsmedium Fibroblasten-konditioniertem Medium (Conditioned Medium, CM-Medium) eingesetzt wird. Fibroblasten sezernieren in das CM-Medium Faktoren, die zum Erhalt des Pluripotenten Stadiums von hES Zellen essentiell sind.*

Zur Gewinnung von CM-Medium wurden Zellkulturschalen mit 0,1% Gelatine beschichtet. Je nach Menge des benötigten CM-Mediums wurden Röhrcchen mit kryokonservierten mitotisch inaktivierten Fibroblasten im Wasserbad (37°C)

aufgetaut, in 10ml vorgelegtes MEF-Medium transferiert und bei 1200rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in MEF-Medium resuspendiert, in einer Dichte von  $6,67 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inokulation wurde das MEF-Medium abgenommen und durch hES Zellmedium ohne FGF-2 ersetzt. Das konditionierte Medium (CM-Medium) wurde nach 24stündiger Inkubation geerntet, über eine 0,22µm-Filtereinheit steril filtriert und konnte bis zu vier Wochen bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurden dem CM-Medium noch 4ng/ml FGF-2 zugesetzt.

## **2.3.2 Kultivierung humaner ES Zellen**

### **2.3.2.1 Auftauen humaner ES Zellen**

*Im Gegensatz zu Fibroblasten ist die Überlebensrate von hES Zellen nach dem Einfrieren und Wiederauftauen nicht sehr hoch. Zusätzlich zur niedrigen Replattierungseffizienz neigen frisch aufgetaute hES Zellen in den ersten Passagen zu einer hohen Spontandifferenzierung und haben eine langsamere Proliferation als hES Zellen die schon länger in Kultur sind. Aufgrund der oben aufgeführten Probleme während und der ersten Passagen nach dem Auftauprozess werden hES Zellen möglichst in Dauerkultur gehalten und nur bei Bedarf (zu hohe Passagenzahl, chromosomale Veränderungen) aufgetaut.*

Vor dem Auftauen von hES Zellen wird das Medium von einem mit Fibroblasten beschichteten Well einer Sechswellplatte abgesaugt und durch 1ml hES Zellmedium ersetzt. Ein Kryoröhrchen mit hES Zellen wurde zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zügig in ein 15ml-Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend wurden vorsichtig, unter leichtem schütteln des Falcon-Röhrchens zur Verdünnung des sich im Gefriermedium befindlichen DMSO, tropfenweise 5ml hES Zellmedium zugegeben. Die Zellen wurden bei 800rpm für 3 Minuten abzentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 1ml hES Zellmedium resuspendiert. Abschließend wurde die Zellsuspension auf das mit hES Zellmedium vorbereitete Fibroblasten-beschichtete Well ausplattiert und bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.3.2.2 Kultivierung und Passagieren humaner ES Zellen

*Im Gegensatz zu den meisten Zelllinien werden hES Zellen in Aggregaten passagiert. Die Passagierung als kleine Zellverbände erhöhte die Plattierungseffizienz und Reduziert die Spontandifferenzierung und Karyotypveränderung in der Folgepassage. Darüber hinaus ist es notwendig zwischen den Passagen das Kulturmedium von hES Zellen täglich zu Wechseln, da Abbauprodukte im Medium Spontandifferenzierung und eine langsamere Proliferation der Zellen auslösen kann.*

Zum Mediumwechsel wurde täglich das überständige Medium von hES Zellkulturen abgenommen und durch frisches hES Zellmedium ersetzt. Alle drei bis sechs Tage, abhängig von der Koloniegröße und Konfluenz der hES Zellen wurde diese passagiert. Hierzu wurde der Zellüberstand abgenommen und die Zellen mit 1mg/ml Kollagenase IV (0,5ml/9,5cm<sup>2</sup>) für mindestens 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation wurden die Kollagenase IV mit 1ml hES Zellmedium verdünnt, die abschwimmenden Kolonien von der Zellkulturplatte ab gespült und die verbleibenden Kolonien vorsichtig mit der Spitze einer 5ml-Zellkulturpipette abgekratzt. Anschließend wurde die Zellsuspension wurde für 3 Minuten bei 800rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1ml hES Zellmedium aufgenommen. Zum Zerkleinern der hES Zellaggregate wurde, je nach Koloniegröße, mit einer 1000µl-Eppendorfpipette oder mit einer 5ml-Pipette resuspendiert, bis nur noch kleine Aggregate sichtbar waren. Die Zellen wurden dann im Verhältnis von 1:1 bis 1:6 in hES Zellmedium auf mit mitotisch inaktivierten Fibroblasten beschichtete Sechs-Well-Zellkulturplatten. Nach spätestens acht Tagen wurden die hES Zellen auf einen frischen Fibroblastenrasen umgesetzt.

### 2.3.2.3 Feeder-freie Kultivierung humaner ES Zellen

*Für die Feeder-freie Kultivierung wird eine extrazelluläre Matrix benötigt. Die in dieser Arbeit verwendete extrazelluläre Matrix (Matrigel®) ist ein Extrakt aus dem Maus-Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor (EHS) das neben den extrazellulären Glycoproteinen, wie Laminin und Kollagen IV auch Entaktin und Heparansulfat enthält.*

Matrigel® wurde über Nacht auf Eis bei 4°C aufgetaut und 1:30 in eiskaltem Knockout-DMEM verdünnt. Mit dieser Matrigel-Lösung wurden pro Milliliter 9,5cm<sup>2</sup> Zellkulturschalenoberfläche über Nacht bei 4°C oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur beschichtet. Die Platten konnten so vorbereitet bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert werden. Unmittelbar vor der Verwendung der Platten bei der Feeder-freien Kultivierung von hES Zellen wurde das Matrigel entfernt und durch Fibroblasten-konditioniertes Medium ersetzt. Anschließend konnten die humanen ES Zellen wie unter 2.3.2.2 beschrieben auf die so vorbereiteten beschichteten Schalen passagiert werden. Für den täglichen Mediumwechsel wurde CM-Medium verwendet. Der Passagerhythmus der Feeder-freien Kultivierung betrug etwa sechs bis zehn Tage, abhängig von der Konfluenz der Platten, mit einem maximalen Passagenverhältnis von 1:2. Für die Feeder-freie Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen wurden pro cm<sup>2</sup> 0,32\*10<sup>5</sup> hES Zellen ausgesät. Dies galt auch für die Kontroll-Bedingungen.

#### **2.3.2.4 Einfrieren humaner ES Zellen**

*Aufgrund der schlechten Auftau-effizienz werden hES Zellen als Aggregate eingefroren, welches die Replattierungsrate nach Wiederauftauen steigert.*

Humane ES Zellen wurden wie unter 2.3.2.2 beschreiben mit Kollagenase IV von den Zellkulturplatten abgelöst und abzentrifugiert. Abhängig von der Koloniedichte wurden 1 bis 3 Wells (9,5cm<sup>2</sup>/Well) pro Kryoröhrchen eingefroren. Hierzu wurde das Pellet vorsichtig, langsam resuspendiert, um die Zellaggregate möglichst nicht zu zerstören. Anschließend wurde Tropfenweise unter leichtem Schütteln 0,5ml hES-Gefriermedium pro Kryoröhrchen zugegeben und je 1ml Zellsuspension pro Kryoröhrchen aliquotiert. Das Einfrieren der Zellen erfolge in einem Einfrierbehälter bei -80°C, der kontrolliert um 1°C pro Minute herunterkühlt. Am Folgetag wurden die Zellen in die Gasphase flüssigen Stickstoffes überführt.

#### **2.3.2.5 Direkte Konversion humaner ES Zellen**

*Die direkte Konversion von humanen ES Zellen erfolgt unter Feeder-freien Bedingungen unter Verwendung von Direktem Konversion-Mediums unter Zugabe*

*des BMP-Antagonisten Noggin, auf einer extrazellulären Matrix (Matrigel<sup>®</sup>, Poly-Ornithin/Laminin).*

Für die direkte Konversion wurden Sechswell-Zellkulturplatten wie unter 2.3.2.4 und beschrieben mit Matrigel<sup>®</sup> beschichtet. Unmittelbar vor der Verwendung der Platten wurde der Überstand entfernt und durch 1ml Direkte Konversion-Medium (DK-Medium) ersetzt und die hES Zellen wie unter 2.3.2.2 beschrieben auf die so vorbereiteten Zellkulturplatten passagiert. Abschließend wurde das DK-Medium mit 0,2µg/ml Noggin supplementiert. Die Direkte Konversion der humanen ES Zellen zu neuronalen Vorläuferzellen erfolgte über einen Zeitraum von 2Wochen, wobei alle zwei Tage das DK-Medium mit 0.2µl/ml Noggin erneuert wurde. Für die direkte Konversion unter hypoxischen Bedingungen wurden pro cm<sup>2</sup> 2000 hES Zellen ausgesät. Dies galt auch für Kontroll-Bedingungen.

### **2.3.3 Differenzierung humaner ES Zellen in neurale Vorläuferzellen**

*Die Differenzierung von humanen ES Zellen in neurale Vorläuferzellen (hESNS Zellen) wurde nach den Protokollen von Zhang et al. und Koch et al. durchgeführt und können im Detail diesen Publikationen entnommen werden (Zhang et al. 2001; Koch et al. 2009).*

### **2.3.4 Kultivierung von aus humanen ES Zellen abgeleiteter neuronalen Vorläuferzellen**

#### **2.3.4.1 Beschichten von Zellkulturschalen**

*hESNS Zellen sind bei der adhärenzte Kultivierung auf die Extrazellulärmatrix-Bestandteile Poly-L-Ornithin (PO) und Laminin (Ln) angewiesen. Um die Adhäsion der hESNS Zellen zu gewährleisten, müssen Zellkulturschalen mit diesen Bestandteilen beschichtet werden.*

Zellkulturschalen wurden mit PO-Lösung für mindestens zwei Stunden bei 37°C inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen. Laminin wurde in eine Konzentration von 2µg/ml in PBS auf die mit PO beschichteten Schalen gegeben und für mindestens 2h

bei 37°C inkubiert. Die so behandelten Zellkulturschalen konnten bis zu sieben Tage bei 4°C gelagert und verwendet werden.

#### **2.3.4.2 Auftauen neuralen Vorläuferzellen**

Von einer mit PO/Ln-beschichteter Sechs-Well-Zellkulturplatte wurde der Überstand abgenommen und durch 1ml N<sub>2</sub>-Medium ersetzt. Ein Kryoröhrchen mit hESNS Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein mit 5ml vorgelegtem N<sub>2</sub>-Medium 15ml-Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1000rpm, 5 Minuten abzentrifugiert und das Pellet in 1ml N<sub>2</sub>-Medium resuspendiert und gleichmäßig auf das mit PO/Ln-beschichtete Well ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz der Zellkulturplatten.

#### **2.3.4.3 Passagieren von hESNS Zellen**

Das Kulturmedium der hESNS Zellen wurde alle zwei Tage erneuert und abhängig von der Konfluenz der Zellen wurden diese alle drei bis vier Tage passagiert. Hierzu wurden die hESNS Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 5 Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37°C behandelt. Das Trypsin wurde mit Trypsin-Inhibitor inaktiviert, die Zellen von der Zellkulturschale abgespült und in einem Falconröhrchen gesammelt. Nach Zentrifugation bei 1000rpm für 5 Minuten wurde das Pellet in N<sub>2</sub>-Medium resuspendiert und in einer Konzentration von  $4,2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Dies galt sowohl für die hypoxische Kultivierung als auch für die Kontrollbedingungen.

## **2.4 Analytische Methoden**

### **2.4.1 Zellzahlbestimmung und Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate**

#### **2.4.1.1 Bestimmung der Zellviabilität**

*Die Zellviabilität wurde mit Hilfe der Trypanblau-Färbung ermittelt. Trypanblau ist ein Azofarbstoff und kann die Membran toter Zellen permeieren, während lebende Zellen aufgrund ihrer Intakten Zellmembran ungefärbt bleiben. Der Anteil lebender Zellen in*

der Zellkultur ergibt sich aus dem Quotienten lebender (ungefärbter) Zellen zur Gesamtzellzahl (ungefärbte und gefärbte Zellen).

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde die durch Trypsin- oder Alfacym-Behandlung erzeugte Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau verdünnt und mittels eines Fuchs-Rosenthal Hämotozytometers ausgezählt.

#### 2.4.1.2 Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate $\mu$

Die Kultivierung bei allen in dieser Arbeit verwendeten Zellen war diskontinuierlich. Das Kulturmedium wurde sowohl bei den hES, direkt konvertierten als auch bei den hESNS Zellen mindestens alle zwei Tage erneuert. Dadurch konnte das Zellwachstum mathematisch wie folgt beschrieben werden (vgl. Terstegge et al):

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

Durch Integration und Bildung des Differenzquotienten ergibt sich:

$$\mu = \frac{x_1 - x_0}{t_1 - t_0} \cdot \frac{2}{x_1 + x_0}$$

Die Verdopplungszeit ergibt sich aus:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Wobei  $x$ : Zelldichte [Zellzahl/ml];  $t$ : Zeit;  $\mu$ : spezifische Wachstumsrate;  $t_d$ : Verdopplungszeit

### 2.4.2 Immunzytochemie

#### 2.4.2.1 Allgemeines

Primäre und sekundäre Antikörper, Hersteller, Verdünnung und Besonderheiten bei der Färbung sind im Anhang (9.0) aufgeführt. Die Mikroskopische Auswertung und Dokumentation erfolgten an einem Zeiss Axioskop 2 und Axiovert 135. Längenstandards sind in allen gezeigten Abbildungen angegeben.

#### **2.4.2.2 Nachweis von Oberflächenantigenen in Zellkulturen**

Zum Nachweis von Oberflächenantigenen (z.B. Tra-1-60, CD133) wurden adhärenente Zellkulturen für 30 Minuten bei 37°C mit dem entsprechenden primären Antikörper im entsprechenden Zellkultivierungsmedium inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Medium wurde das Antigen durch eine weitere 30-minütige Inkubation mit dem entsprechenden Alexa555<sup>®</sup>- oder Alexa488<sup>®</sup>-konjugierten sekundären Antikörper visualisiert. Die Kulturen wurden anschließend durch 10-minütige Inkubation mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert Und die DNA der Zellkerne mit DAPI (1:10.000 in NaHCO<sub>3</sub>) angefärbt. Die so präparierten Zellen wurden mit Mowiol eingedeckelt und konnte über mehrere Montage bei 4°C gelagert werden.

#### **2.4.2.3 Nachweis von Zytoplasmatischen Markern in ES Zellkulturen**

Zum Nachweis von Zytoplasmatisch lokalisierten Proteine, wie zum Beispiel Nestin wurden adhärenente ES Zellkulturen zweimal mit PBS gewaschen und durch 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 4% PFA fixiert. Anschließend wurden zum Vorbeugen von unspezifischen Oberflächenbindungen des primären Antikörpers die Zellen für eine Stunde mit Blockierungslösung 2 (BL2) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Zugabe des jeweiligen primären Antikörpers, der über Nacht in BL2 bei 4°C inkubiert wurde. Die Visualisierung des primären Antikörpers erfolgte durch 1-stündige Inkubation mit dem geeigneten Alexa555<sup>®</sup>- oder Alexa488<sup>®</sup> konjugierten sekundären Antikörper in BL2. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:10.000 in NaHCO<sub>3</sub>) gegengefärbt und die Präparate mit Mowiol eingedeckelt.

#### **2.4.2.4 Nachweis von Kernmarkern in ES Zellkulturen**

Zum Nachweis von kernlokalisierten Proteine (z.B. Oct-4, pSmad2/3) wurden adhärenente humane ES Zellkulturen zweimal mit PBS gewaschen und durch 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 4% PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit 0,5% Triton-X100 in PBS permeabilisiert. Zum Vorbeugen von unspezifischen Oberflächenbindungen des primären Antikörpers wurden die Zellen für eine Stunde mit BL2 bei Raumtemperatur

inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Zugabe des jeweiligen primären Antikörpers, der über Nacht in BL2 bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Darauf folgte ein Waschschrift, anschließend wurde das Antigen durch 1-stündige Inkubation mit dem geeigneten Alexa555<sup>®</sup>- oder Alexa488<sup>®</sup> konjugierten sekundären Antikörper in BL2 visualisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:10.000 in NaHCO<sub>3</sub>) gegengefärbt und die Präparate mit Mowiol eingedeckelt.

#### **2.4.2.5 Proliferationsanalyse von ES Zellkulturen**

Zur Quantifizierung der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus wurden die Kulturen je nach Proliferationskinetik in der exponentiellen Wachstumsphase mit dem Thymidin-Analogon 10 $\mu$ M 5'-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) markiert (6h hES Zellen, 3h direkt konvertierte hES Zellen, 3h hESNS Zellen). Die Kulturen wurden nach Pulsung für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4% PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5% Triton-X100 in PBS für 30 Minuten permeabilisiert und die DNA durch 10-minütige Inkubation mit 2N HCl denaturiert. Nach Neutralisation der 2N HCl mit 0,1M Boratpuffer (pH9,5) wurden die Kulturen für eine Stunde mit BL2 geblockt. Der Nachweis des in die DNA inkorporierten BrdU erfolgte durch Inkubation der Zellen mit einem primären gegen BrdU gerichteten Antikörper über Nacht bei 4°C. Die Visualisierung des primären Antikörpers erfolgte nach einem Waschschrift mit PBS durch 1-stündige Inkubation mit dem geeigneten Alexa555<sup>®</sup>- oder Alexa488<sup>®</sup> konjugierten sekundären Antikörper in BL2. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:10.000 in NaHCO<sub>3</sub>) gegengefärbt und die Präparate mit Mowiol eingedeckelt.

### **2.4.3 Durchflusszytometrie**

#### **2.4.3.1 Apoptose**

*Die Anteile an apoptotischen Zellen in der Kultur wurde durch Nachweis von extrazellulär präsentiertem Phosphatidylserin (PS) mit Hilfe des Phospholipids Annexin-V-FITC ermittelt, welches eine hohe Affinität zu PS hat.*

Der Zellüberstand von zu analysierenden Zellen wurde abgenommen, in ein Falconröhrchen überführt. Die Zellen wurden mit Trypsin vereinzelt und die Zellzahl auf 2x10<sup>6</sup> Zellen/ml in Annexin-V-Bindungspuffer eingestellt. Annexin-V-FITC wurde

in einer Verdünnung von 1:20 zu den zu analysierenden Proben gegeben. Als Kontrollen für unspezifische Antikörperbindung und Autofluoreszenz wurden Zellen mitgeführt, bei denen auf eine Inkubation mit Annexin-V-FITC verzichtet wurde. Die Inkubation erfolgte für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach erfolgter Inkubation wurden die zu analysierenden Proben mit Annexin-V-Bindungspuffer auf 500 $\mu$ l aufgefüllt und 5 Minuten vor der Analyse mit 1,2 $\mu$ g/ml Hoechst 33258 versetzt, um falsch positive und tote Zellen nachzuweisen. Das Fluorochrom FITC wurde auf einem mit drei Lasern ausgestatteten analytischen Durchflusszytometer (LSRII<sup>®</sup>) angeregt und ausgelesen. Die Daten wurden mit Hilfe der Flowjo<sup>®</sup> Analysesoftware analysiert und dargestellt. Bei der Auswertung wurden Zelldoubletten über Vorwärtsstreuung (Forward Scatter Width, FSC-W) und Seitwärtsstreuung (Sideward Scatter, SSC) und Zelldebris über Vorwärtsstreuung (Forward Scatter, FSC) und Seitwärtsstreuung Eigenschaften identifiziert und aus der zu analysierenden Zellpopulation eliminiert.

#### **2.4.3.2 Oberflächenantigene**

*Aufgrund der zum Teil sehr punktuellen Expression von Oberflächenantigenen (z.B. Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-1, CD133) und einer hohen Autofluoreszenz der Zellen, ist es an hES Zellkolonien, konfluenten direkt konvertierten und hESNS Zellen nur schwer möglich, eine visuelle Quantifizierung der für diese Antigene positiven Zellen durchzuführen. Aus diesem Grund wurden die prozentualen Anteile der Expression von Oberflächenantigenen durchflusszytometrisch bestimmt.*

Durch 5-minütige Trypsin-Behandlung wurden Einzelzellsuspensionen der zu untersuchenden Zellen hergestellt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. In einem Volumen von 100 $\mu$ l Blockierungslösung 1 (BL1) wurden  $0,2 \times 10^6$  Zellen für 30 Minuten mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert. Die Antigene wurden nach einem Waschschrift durch 30-minütige Inkubation mit einem geeigneten Alexa488<sup>®</sup>-, Alexa555<sup>®</sup>- oder Alexa647<sup>®</sup> konjugierten sekundären Antikörper in BL1 visualisiert. Bei Nachweis von Oberflächenantigenen über direkt konjugierte primäre Antikörper wurde diese in der entsprechenden Verdünnung (siehe Anhang 9.0) in BL1 für 60 Minuten auf Eis

inkubiert. Als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindung und Autofluoreszenz wurden Zellen mitgeführt bei denen auf eine Inkubation mit dem primären, dem sekundären oder beiden Antikörper verzichtet wurde. Nach einem Waschschrift wurden die Proben in 500  $\mu$ l BL1 mit 1,2  $\mu$ g/ml Hoechst 33258 versetzt um tote Zellen nachzuweisen. Die Fluorochrome wurden wie unter 2.4.3.1 beschrieben analysiert und ausgewertet. Tote Zellen wurden über Hoechst 33258-Fluoreszenz identifiziert und aus der Analysepopulation diskriminiert.

#### **2.4.3.3 Zellproliferation**

*Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus bietet die Analyse des Thymidin-Analogen 5'-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) mit Hilfe der Durchflusszytometrie.*

Wie unter 2.4.2.5 beschrieben wurden die Zellen mit BrdU gepulst und mit Hilfe von Trypsin eine Einzellzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden in eiskaltem PBS resuspendiert und anschließend mit bei -20°C gelagertem 100%iges Methanol unter leichtem schütteln fixiert (Endkonzentration Methanol 70%). Die so fixierten Zellen konnten bis zur Analyse bei -20°C gelagert werden. Das in die Zellen inkorporierte BrdU wurde mit Hilfe des BrdU-FITC-Kits (BD Bioscience) nach den Angaben des Herstellers nachgewiesen. Die Fluorochrome wurden wie unter 2.4.3.1 beschrieben analysiert und ausgewertet.

#### **2.4.3.4 Zellzyklusverteilung**

*Eine Möglichkeit zur Quantifizierung der Zellen in den einzelnen Phasen Zellzyklus mit Hilfe der Durchflusszytometrie, bietet die Analyse des DNA-Gehaltes von Zellen mit Hilfe des DNA-bindenden Fluorochroms Propidium Iodid (PI). Die Fluoreszenzintensität von DNA-gefärbten Zellen ist somit proportional zum absoluten DNA-Gehalt der Zellen.*

Zellen wurden mit Trypsin vereinzelt und das Pellet in eiskaltem PBS resuspendiert. Anschließend wurde zum Fixieren bei -20°C gelagertes 100%iges Methanol, unter leichtem schütteln, bis zu einer Konzentration von 70% Methanol zugegeben. Die so fixierten Zellen konnten bis zur Analyse bei 4°C oder -20°C gelagert werden. Zum

Nachweis des DNA-Gehaltes der einzelnen Zellkerne, wurde nach zwei Waschschritten mit PBS 10 $\mu$ g/ml PI und 10 $\mu$ g/ml RNase in PBS zu den Zellen gegeben und für 30 Minuten bei 37°C unter schütteln inkubiert. Nach einem Waschschriff wurden die Proben in 500 $\mu$ l PBS resuspendiert. Die Fluorochrome wurden wie unter 2.4.3.1 beschrieben analysiert und ausgewertet.

#### **2.4.4 Protein-Analyse**

Bei allen Arbeiten mit Proteinen wurden Proteinase-freie GefäÙe und Filterspitzen verwendet

##### **2.4.4.1 Isolierung von Gesamt-Protein**

Zur Isolierung von Gesamt-Protein wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen zügig mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS abgeschabt, abzentrifugiert und das Pellet in 50 $\mu$ l RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren (1:100) lysiert. Im Anschluss an eine 30-minütige Inkubation auf Eis bei 4°C wurde der Zelldebris durch Zentrifugation bei 10.000rpm für 15 Minuten bei 4°C von den Proteinen getrennt. Die flüssige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zur Analyse gelagert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch über Bradford-Proteinbestimmung gemessen.

##### **2.4.4.2 Isolierung von Kern- und Zytoplasma- Proteinen**

Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen zügig mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt, abzentrifugiert und das Pellet in 40 $\mu$ l CE-Puffer mit Protease-Inhibitoren (1:100) lysiert. Die Trennung von Zytoplasma-Proteinen und Kern-Proteinen erfolgte durch 5-minütige Zentrifugation bei 1500rpm und 4°C. Der Überstand, indem sich die Zytoplasma-Proteinen befinden, wurde bei -20°C bis zur Analyse gelagert. Das Pellet wurde vorsichtig in 100 $\mu$ l CE-Puffer gewaschen und bei 1500rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Zur Lyse des Zellkernes wurde das Pellet in 20 $\mu$ l NE-Puffer (Protease-Inhibitor, 1:100) resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Kernproteine vom Debris durch Zentrifugation bei 13.000rpm für 10 Minuten und 4°C

getrennt. Die Lagerung der Proteine erfolge bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Analyse. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch über Bradford-Proteinbestimmung gemessen.

#### **2.4.4.3 Western Blot**

*In einem Polyacrylamid-Gel werden mit Hilfe der Gel-Elektrophoresetechnik Proteine in der Trägermatrix entsprechend ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine vom Polyacrylamid-Gel durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran (Nitrozellulose) transferiert. Proteine können anschließend mit Hilfe von spezifischen Antikörpern auf der Nitrozellulose-Membran identifiziert werden.*

Für die Auftrennung der Proteine wurde ein Trenn- und anschließend Sammelgel, je nach Größe der zu analysierenden Proteine gegossen. Für die Auftrennung im elektrischen Feld wurden  $25\mu\text{g}$  bis  $50\mu\text{g}$  Protein mit SDS-Ladepuffer versetzt, für 3 Minuten aufgekocht, abzentrifugiert und auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolge in einem elektrischen Feld von 100-150V, 400mA für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur in SDS-Laufpuffer. Nach dem Auftrennen der Proteine wurde das SDS-Gel und eine Nitrozellulosemembran für 10 Minuten in 1x Western-Transfer-Puffer eingeweicht. Nach der Einweichzeit wurden die Proteine bei 100V, 400mA für eine Stunde, bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf die Nitrozellulosemembran geblottet. Anschließend wurde die Membran auf die Gelgröße zugeschnitten und dreimal für 5 Minuten in TBS-T-Puffer gewaschen. Nach einem 1-stündigen Blockierungsschritt mit 5% Milchpulver in TBS-T-Puffer wurde der Blot nochmals dreimal mit TBS-T-Puffer gewaschen. Der primäre Antikörper gegen das nachzuweisende Protein wurde in der entsprechenden Blockierungslösung zugegeben und über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Detektion des spezifisch gebundene primäre Antikörper erfolgte über Zugabe von HRP-konjugierten sekundären Antikörpern. Die Visualisierung erfolgte über eine Substratreaktion mit dem Pierce Femto<sup>®</sup> oder Pico<sup>®</sup> Kit und Auswertung über Chemilumineszenz. Zur Rekonstitution des Western Blots wurde Stripping-puffer nach Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend konnte der entsprechende Western Blot für einen weiteren Proteinnachweis verwendet werden.

Antikörperverdünnungen, Blockierungslösungen sind dem Anhang (9.4 und 9.5) zu entnehmen. Der Gesamtproteingehalt wurde mit Coomassie-Brilliant Blue bestimmt. Die Quantifizierung der Western Blots und SDS-Gele erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ®.

## 2.4.5 RT-PCR-Analyse

### 2.4.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA

*Bei allen Arbeiten mit RNA wurden RNase-freie Gefäße und Filterspitzen verwendet. Das eingesetzte Wasser wurde durch zweimaliges Autoklavieren und durch Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) von RNasen befreit.*

Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und die Zellen wurden in 80µl Trizol® pro cm<sup>2</sup> Kulturoberfläche lysiert. Das Lysat wurde entweder bis zur RNA-Isolierung bei -80°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet. Nach Lysierung der Zellen wurde nach 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur dem Lysat 200µl Chloroform pro ml Trizol® zugesetzt. Nach gründlicher Durchmischung erfolgte eine weitere 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 12000xg und 4°C wurde eine Phasentrennung vorgenommen. Die obere, wässrige Phase mit den Nukleinsäuren wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen 70% Ethanol versetzt. Die weitere Aufreinigung dieser Suspension erfolgte mit dem RNeasy-Kit® (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Kontaminierende DNA wurde durch Verwendung des RNase-free DNase Set® (Qiagen) eliminiert, das ebenfalls nach Anleitung des Herstellers eingesetzt wurde.

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Gesamt-RNA wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 260nm (OD<sub>260</sub>) bestimmt. 1 OD<sub>260</sub> Einheit entspricht dabei 40µg/ml RNA. Die RNA wurde bei -80°C gelagert oder sofort die Reverse Transkription eingesetzt.

### 2.4.5.2 Reverse Transkription

*Als Ausgangsmaterial für die Reverse Transkription diente Gesamt-RNA. Um bei der Reversen Transkription lediglich mRNA zu erfassen, wurden oligo(dT)<sub>15</sub>-Primer verwendet.*

Zur Reversen Transkription (RT) wurden 0,08-3,2µg Gesamt-RNA pro Reaktion eingesetzt. RNA und 160pmol oligo(dT)<sub>15</sub>-Primer wurden für 10 Minuten bei 65°C denaturiert. Anschließend erfolgte die eigentliche RT (1 Stunde, 37°C) in Gegenwart von 1x Expand Reverse Transcriptase Puffer, 10mM DTT, je 1mM dNTP, 20U RNase Inhibitor und 50U Expand Reverse Transcriptase (Roche). Durch darauf folgende Hitzebehandlung (5 Minuten bei 93°C) wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert. Die gebildete cDNA wurde entsprechend der eingesetzten RNA-Konzentration auf einen cDNA-Gehalt von 5-20ng/µl verdünnt und bei -20°C eingefroren oder sofort in der PCR eingesetzt.

### 2.4.5.3 Semi-quantitative PCR

*Zur semi-quantitative PCR wurde auf 20-40ng cDNA pro Ansatz verwendet, welche mit je 25pmol Primer, 200µM je dNTP und 2,5U Taq-Polymerase versetzt wurde. Die PCR-Produkte wurden auf 1%igen Agarosegelen analysiert und mit dem Geldokumentationssystem GelDoc2000 dokumentiert. Primer-Sequenzen, Annealing-Temperaturen, Anzahl der PCR-Zyklen, Größe des Produkts sind Anhang (5.6) zu entnehmen.*

### 2.4.5.4 Quantitative PCR

*Im Gegensatz zur Semi-quantitativen PCR (siehe 2.4.5.3), die nur eine Endpunktquantifizierung der generierten cDNA erlaubt, bietet die quantitative PCR die Möglichkeit die cDNA-Amplifikation in Echtzeit (real-time) aufzunehmen. Prinzipiell wird bei der quantitativen PCR dem Reaktionsgemisch zusätzlich noch ein Fluorochrom zugesetzt, welches frei in der Lösung (Sybr green) oder an Primer gebunden (Taqman) sein. Bei jedem Amplifikationszyklus wird entsprechend der gewählten Methode ein Fluoreszenzsignal erzeugt, welches in jedem Zyklus*

*detektiert werden kann. Diese Methode erlaubt es die Amplifikation der cDNA in Echtzeit aufzunehmen welches in einer exponentiellen Wachstumskurve resultiert.*

Die cDNA für die quantitative PCR wurde wie unter 2.4.5.1 und 2.4.5.2 beschrieben gewonnen. Die quantitative PCR wurde unter Verwendung der Sybr-Green-Methode an einem ICycler<sup>®</sup>- oder Mastercycler<sup>®</sup>-System durchgeführt. Hierfür wurden pro Reaktion 8-20ng cDNA, 31,25pmol Primer, 200 $\mu$ M je dNTP, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 3% DMSO, 1:2.000.000 Sybr Green I, 10 $\mu$ M Fluorescein und 0,25U Taq-Polymerase eingesetzt. Primer-Sequenzen, Annealing-Temperaturen, Anzahl der PCR-Zyklen, Größe des Produkts sind Anhang 5.6 zu entnehmen. Zusätzlich wurde die Spezifität der PCR-Produkte über Schmelzkurvenanalyse verifiziert.

## **2.5 Statistische Analyse**

Zellzahlen von Kulturen stellen Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen aus drei Parallelen Proben dar. Zur Berechnung von Wachstumsraten wurden mindestens 3 unabhängigen Experimenten herangezogen; die dargestellten Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $\pm$ STABW) oder Standardfehler ( $\pm$ STERR) angegeben. Zur statistischen Analyse der Experimente wurde der t-Test nach Student eingesetzt. Zuvor wurde ein F-Test auf Gleichheit der Varianzen durchgeführt. Zur immunozytochemischen Charakterisierung wurden mindestens 800 Zellen pro Färbung gezählt. Diese Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt und basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden mindestens 10000 Ereignisse aufgenommen. Die dargestellten durchflusszytometrischen Abbildungen sind jeweils einem einzelnen Versuch entnommen, der repräsentativ für mindestens drei unabhängige Analysen ist. Bei auf durchflusszytometrischen Daten basierenden Diagrammen wurden die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Versuchen mit dem entsprechenden STABW oder STERR dargestellt.

Die Berechnung der relativen Genexpression auf Grundlage der aus der quantitativen PCR gewonnenen Daten wurde die  $\Delta\Delta$ CP-Methode verwendet, wobei der CP (Crossing-Point)-Wert der Anzahl an PCR-Zyklen entspricht, die nötig ist, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen, welches über der

Basisfluoreszenz liegt. Am CP befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Die Expression der jeweiligen Zielgens wird auf die Expression eines homogen exprimierten Referenzgens bezogen (1). Nach dieser Normierung wird vom  $\Delta$ CP-Wert der Proben der  $\Delta$ CP-Wert der Kontrolle (in dieser Arbeit die bei 21% Sauerstoff kultivierten Zellen, 2) abgezogen. Liegt der sich ergebende relative Expressionunterschied (Ratio, 3) unter 1, so ist das analysierte Gen in der Probe im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert, liegt er über 1, so ist das Gen im Vergleich zur Kontrolle heraufreguliert. Als Referenzgen wurde 18s Ribosomale RNA gewählt. Diese Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung oder Standardfehler dargestellt und basierend auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

$$\Delta\text{CP} = \text{CP (Zielgen)} - \text{CP (Referenzgen)}$$

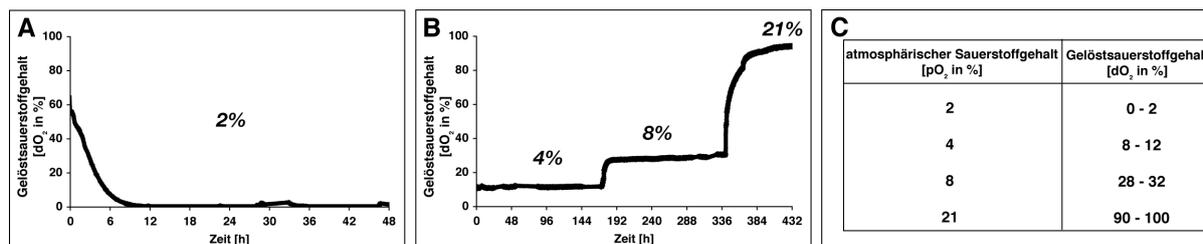
$$\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\text{CP (Probe)} - \Delta\text{CP (Kontrolle)}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$$

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Implementierung eines kontrollierten Systems zur hypoxischen Kultivierung humaner ES Zellen

Humane embryonale Stammzellen (hES Zellen) werden aus der Inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen. In vivo ist die präimplantierte Blastozyste Sauerstoffkonzentrationen von 5-10% im Ovidukt und 1-10% im Uterus (Fischer and Bavister 1993; Leese 1995) ausgesetzt. Die konventionelle Kultivierung von hES Zellen in vitro wird jedoch bei einem Luftsauerstoffgehalt von 21% vollzogen und entspricht somit nicht den physiologischen Bedingungen. Eine kontinuierliche Kultivierung von hES Zellen unter einem physiologischen, hypoxischen Sauerstoffgehalt setzt ein sauerstoffregulierbares, kontrolliertes System voraus, bei dem keine Gelöstsauerstoffschwankungen während der Kultivierung und des Mediumwechsels auftreten. Um zu erheben, welcher Gelöstsauerstoffgehalt im Medium aus der Begasung mit verschiedenen atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen ( $\text{atmO}_2$ ) resultiert, wurde der Anteil an gelöstem Sauerstoff im Medium mit Hilfe von Optroden gemessen und quantifiziert (Abb. 3.1.1). Hierzu wurde der Gelöstsauerstoffgehalt (dO, dissolved Oxygen), der aus einer permanenten Begasung von Medium mit einem atmosphärischen Sauerstoffgehalt von 21% resultiert, gleich 100% gesetzt. Bei der Messung des Sauerstoffgehaltes im Medium ergaben sich, abhängig vom gewählten Luftsauerstoffgehalt,  $\text{dO}_2$ -Gehalte von 0 bis 100% (Abb. 3.1.1). Im Vergleich zu einem Gelöstsauerstoffgehalt von 90 bis 100%, der sich bei atmosphärischem Sauerstoffgehalt von 21% im Medium einstellt (Abb. 3.1.1 B), lag der  $\text{dO}_2$ -Gehalt bei niedrigen Luftsauerstoffgehalten von 2 bis 8% um bis zu 90 Prozentpunkte darunter (Abb. 3.1.1 C).

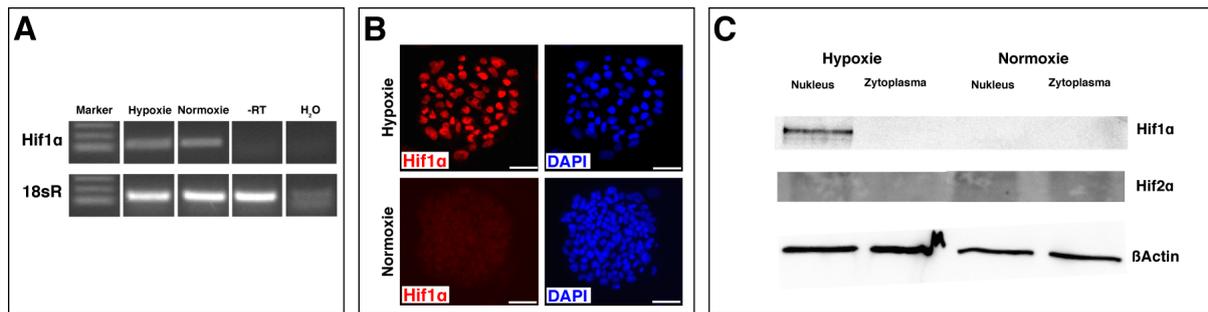


**Abb. 3.1.1 Die hypoxischen Bedingungen können durch Messung des Gelöstsauerstoffes quantifiziert werden.** Wird Medium mit einem atmosphärischen Sauerstoffgehalt von 2%, 4%, 8% (pO<sub>2</sub>, *Kursiv A, B*) begast, so kann eine Abnahme der Konzentration des Gelöstsauerstoffes [dO<sub>2</sub>] ermittelt werden (A, B, C).

hES Zellmedium wurde in mit Optroden beschichtete Platten gegeben und über einen Zeitraum von 432 Stunden mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen in einem sauerstoffregulierbaren Inkubator begast. Der Gelöstsauerstoffgehalt im Medium wurde mit Hilfe der Optroden über Fluoreszenzquenching im Abstand von jeweils 5 Minuten gemessen. Die Abbildungen stellen repräsentative Messergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Einzelexperimenten dar.

Auf Grundlage der oben aufgeführten Daten wurde ein atmosphärischer Sauerstoffkonzentration von 4% für die hypoxische Kultivierung von hES Zellen ausgewählt.

Ein entscheidendes Vorexperiment sollte darüber hinaus Aufschluss darüber geben, ob hES Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert werden, überhaupt auf einen niedrigen atmosphärischen O<sub>2</sub>-Gehalt reagieren. Um dies zu belegen, musste die Stabilisierung des sauerstoffsensitiven Transkriptionsfaktors Hif1 (Hypoxia-inducible factor 1) und dessen sauerstoffsensitiver Untereinheit Hif1 $\alpha$  Hypoxia-inducible factor 1 alpha in hES Zellen nachgewiesen werden. Bei Kultivierung von hES Zellen unter verschiedenen Sauerstoffgehalten konnte sowohl bei normoxisch als auch bei hypoxisch kultivierten Zellen die Expression von Hif1 $\alpha$  auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Abb. 3.1.2, A). Wurden hES Zellen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt kultiviert, konnte auf Proteinebene zudem die Stabilisierung und Translokation von Hif1 $\alpha$  vom Zytoplasma in den Nukleus gezeigt werden (Abb. 3.1.2 B, C). Im Gegensatz dazu konnte bei Kontrollzellen (21% O<sub>2</sub>) weder eine Stabilisierung von Hif1 $\alpha$  im Zytoplasma noch eine Translokation in den Nukleus nachgewiesen werden (Abb. 3.1.2 B). Eine Stabilisierung der sauerstoffsensitiven Untereinheit Hif2 $\alpha$  konnte jedoch unter hypoxischen Bedingungen nicht nachgewiesen werden.



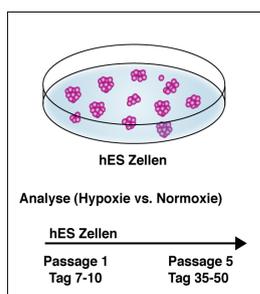
**Abb. 3.1.2 Die Stabilisierung und Translokation des sauerstoffsensitiven Transkriptionsfaktors Hif1 $\alpha$  kann bei hypoxisch kultivierten hES Zellen nachgewiesen werden.** Die Expression des sauerstoffsensitiven Transkriptionsfaktors Hif1 $\alpha$  in hES Zellen kann auf RNA-Ebene nachgewiesen werden (A). Darüber hinaus zeigen hES Zellen eine direkte Reaktion auf einen physiologischen Sauerstoffgehalt während der Kultivierung, die sich durch die Stabilisierung und die Translokation des sauerstoffsensitiven Transkriptionsfaktors Hif1 $\alpha$ , jedoch nicht von Hif2 $\alpha$  vom Zytoplasma in den Nukleus (B, C) äußert.

hES Zellen wurden über einen Zeitraum von 48h unter einem hypoxischen Sauerstoffgehalt kultiviert. Anschließend wurden für die RT-PCR Proben genommen. Um Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen, wurden bei der Reversen Transkription und der anschließenden PCR neben den eigentlichen Proben (+) Kontrollen ohne Reverse Transkriptase (-) mitgeführt (A). Als Längenstandard wurde der 1kb plus-Marker (Invitrogen) eingesetzt. Zum immunozytochemischen Nachweis von Hif1 $\alpha$  wurden Zellen nach 48h Kultivierungsdauer unter hypoxischen oder normoxischen Bedingungen fixiert und anschließend auf Hif1 $\alpha$  (B) gefärbt. Kerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Zum Nachweis von Hif1 $\alpha$  und Hif2 $\alpha$  auf Proteinebene wurde Protein aus dem Zytoplasma und dem Nukleus isoliert und mit Hilfe eines Western Blots (C) nachgewiesen. Dargestellt sind Daten aus repräsentativen Einzelexperimenten. Maßstab (B) = 50 $\mu$ m.

Die Ergebnisse zeigen, dass das gewählte System zur hypoxischen Kultivierung von hES Zellen geeignet ist. Es konnte gezeigt werden, dass mit dem vorliegenden System eine stabile Sauerstoffregulierung und ein konstanter Sauerstoffgehalt während der Kultivierung von hES Zellen aufrechterhalten werden kann. Darüber hinaus konnte eine Adaptation der hES Zellen an die hypoxischen Kultivierungsbedingungen durch die Expression und Stabilisierung von Hif1 $\alpha$ , jedoch nicht von Hif2 $\alpha$  gezeigt werden.

## 3.2 Kultivierung humaner ES Zellen unter hypoxischen Sauerstoffbedingungen

Bei der konventionellen Kultivierung von hES Zellen auf Feeder-Zellen kann bei einer hypoxischen Kultivierung nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Sekretion von Wachstumsfaktoren und der Zell-Zellkontakt, der das Überleben und die Proliferation von hES Zellen sicherstellt, beeinflusst werden (Ley 2005). Daneben kann ein Fibroblasten-Rasen in Abhängigkeit von seiner Dichte die Spontandifferenzierung und die Pluripotenzerhaltung von hES Zellen beeinflussen (Peerani et al. 2007). Um auszuschließen, dass Fibroblasten keinen Einfluss auf hypoxisch kultivierte hES Zellen haben wurden diese im Folgenden Feeder-frei sowohl unter hypoxischen als auch normoxischen Bedingungen kultiviert (Abb. 3.2).



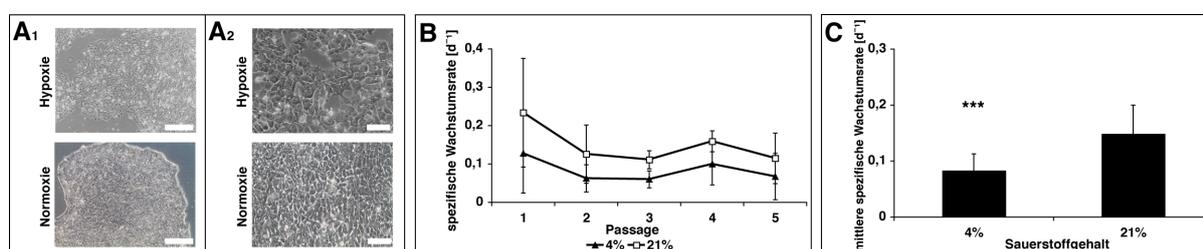
**Abb. 3.2 Zeitverlauf der normoxischen und hypoxischen Kultivierung von hES Zellen.**

Die Analyse der hES Zellen erfolgte nach einer und fünf Passage unter den jeweiligen Sauerstoffbedingungen, welches etwa Tag 7-10 (Passage 1) und Tag 35-50 (Passage 5) der Kultivierung entspricht.

### 3.2.1 Verlangsamung der Proliferation von hypoxisch kultivierten hES Zellen

Eine erste qualitative Beurteilung des Effektes einer Feeder-freien, hypoxischen Kultivierung von hES Zellen erfolgte über die Morphologie. Wurden hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so resultierten daraus größere hES Zellkolonien als in normoxisch kultivierten Kontrollkulturen (Abb. 3.2.1.1 A1). Die hypoxisch kultivierten hES Zellkolonien wiesen jedoch neben Löchern deutlich größere Einzelzellen im Zellverband auf (Abb. 3.2.1.1 A2). Kontrollzellen hingegen zeigten eine charakteristische Morphologie humaner ES Zellkolonien mit einem hellen Rand im Phasenkontrast und deutlich kleineren Zellen im Zellverband (Abb. 3.2.1.1 A1, A2; vgl. (Terstegge 2006). Über Quantifizierung der spezifischen Wachstumsrate hypoxisch kultivierter hES Zellen konnten bereits nach einer Passage (Tag 7-10) Unterschiede in der Proliferation im Vergleich zu normoxisch kultivierten Zellen

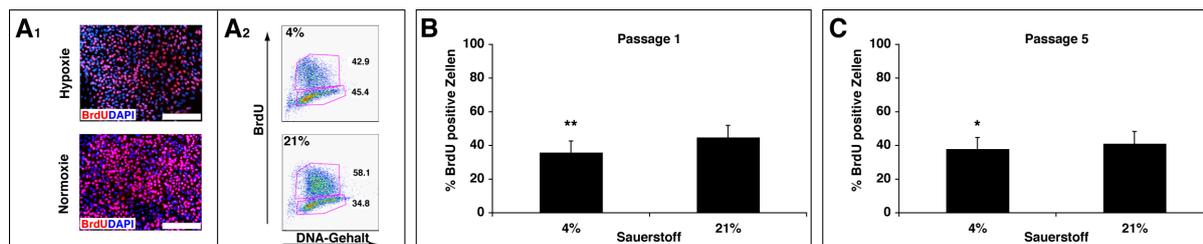
detektiert werden (Abb. 3.2.1.1). Zu Beginn der Kultivierung lag die Wachstumsrate bei einem Sauerstoffgehalt von 4% bei  $0,13 \pm 0,10 d^{-1}$  und war damit um  $0,10 d^{-1}$  langsamer als bei normoxisch kultivierten Kontrollzellen (Abb. 3.2.1.1 B). Nach weiteren vier Passagen (Tag 35-50) bei 4% lag die Proliferation der hES Zellen bei nur noch  $0,07 \pm 0,06 d^{-1}$  (Abb. 3.2.1.1 B). Durchschnittlich sank die Proliferation unter einem Sauerstoffgehalt von 4% statistisch signifikant auf die Hälfte der mittleren spezifischen Wachstumsrate der Kontrolle ab (Abb. 3.2.1.1 C; 4%:  $0,08 \pm 0,03 d^{-1}$ ; 21%:  $0,15 \pm 0,05 d^{-1}$ ;  $***P < 0,01$ )



**Abb. 3.2.1.1 Die Kultivierung von hES Zellen auf Fibroblasten führt zu einer Verringerung der hES Zellproliferation.** Werden hES Zellen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt kultiviert, so löst dies eine Veränderung in der Zellmorphologie, der Koloniegröße (A, 4%) und der hES Zellproliferation aus (B, C).

hES Zellen der Zelllinie H9.2 wurden auf Matrigel<sup>®</sup> in einer definierten Dichte von  $3,0 \times 10^4$  Zellen pro  $cm^2$  ausgesät. Die Zellzahl wurde anschließend vor jeder Passage, maximal aber über 5 Passagen mit Hilfe von Trypanblau-Färbung erhoben. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte an einem Phasenkontrastmikroskop. Bilder stellen repräsentative hES Zellkolonien für die hES Zelllinie H9.2 unter den jeweiligen Kultivierungsbedingungen dar. Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (Abb. B, C) aus mindestens sechs unabhängigen Experimenten dargestellt. T-Tests zeigten statistisch signifikante Unterschiede mit  $***P < 0,01$ . Maßstab (A1) =  $500 \mu m$ , (A2) =  $100 \mu m$ .

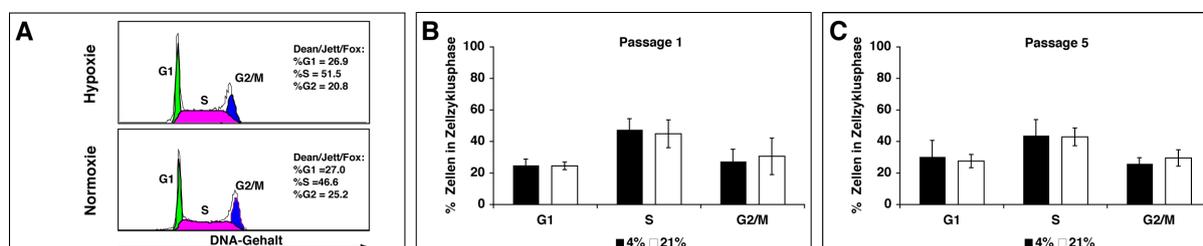
Des Weiteren wurde der Einfluss eines niedrigen Sauerstoffgehaltes auf die Proliferation über Nachweis von Zellen in der Synthesephase des Zellzyklus durch Zugabe des Thymidin-Analogons BrdU (5-Bromo-2-desoxyuridin), welches durchflusszytometrisch nachgewiesen wurde, verifiziert (Abb. 3.2.1.2 A1, A2). Wurden Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so konnte sowohl nach einer Passage als auch nach fünf Passagen ein statistisch signifikantes Absinken der Anzahl an BrdU-positiven hES Zellen im Vergleich zu normoxisch propagierten Kontrollzellen beobachtet werden (Abb. 3.2.1.2 B, C; Passage 1: 21%:  $44,9 \pm 4,8\%$ ; 4%:  $35,9 \pm 10,7\%$ ;  $**P < 0,025$ ; Passage 5: 21%:  $41,2 \pm 3,6$ ; 4%:  $37,9 \pm 4,0$ ;  $*P < 0,05$ ).



**Abb. 3.2.1.2 Eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen hat eine Verringerung des Anteils an Zellen in der Synthese-Phase des Zellzyklus zur Folge.** Werden hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, und der Anteil an Zellen in der Synthese-Phase mit dem Thymidin-Analogon BrdU quantifiziert, so zeigt sich, dass unter hypoxischen Bedingungen weniger Zellen BrdU inkorporieren als unter normoxischen Bedingungen (A). Sowohl nach einer Passage (B) als auch nach fünf Passagen (C) unterscheidet sich der Anteil an BrdU-positiven hES Zellen in hypoxischen Kulturen von dem in Kontrollkulturen.

hES Zellen wurden für die Dauer von 4 Stunden mit  $1\mu\text{M}$  BrdU markiert und anschließend fixiert. Der Nachweis von Zellen, die BrdU inkorporiert hatten, erfolgte über Immunocytochemie (A1) und Durchflusszytometrie (A2). Für die durchflusszytometrische Analyse wurden Zelldoubletten und Zelldebris über Gating nach Forward Scatter- und Sideward Scatter-Eigenschaften von der Analyse ausgeschlossen. Kerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt. Die quantitativen Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mindestens sechs unabhängigen Experimenten dargestellt. T-Tests zeigten statistisch signifikante Unterschiede mit  $**P < 0,025$  und  $*P < 0,05$ . Maßstab (A) =  $100\mu\text{m}$ .

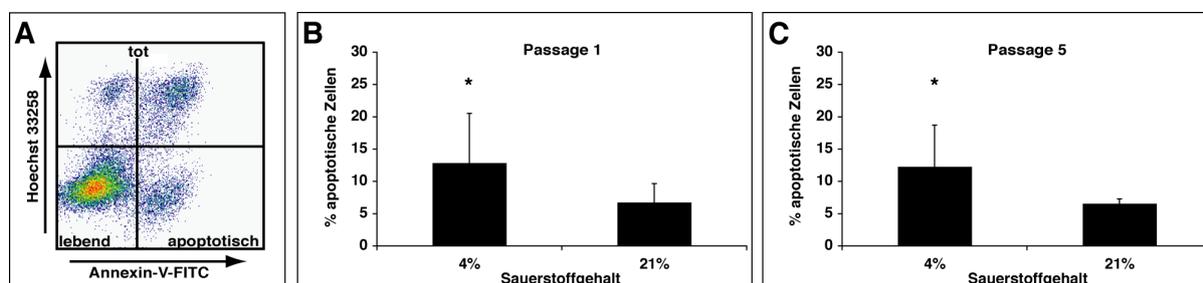
Um auszuschließen, dass die unter hypoxischen Bedingungen gesunkene Anzahl an Zellen in der S-Phase durch einen Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus verursacht wurde, wurden in einem weiteren Experiment die Anteile an Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus durch die Zugabe des DNA-Farbstoffes Propidiumiodid (PI) analysiert (Abb. 3.2.1.3 A). Es konnte gezeigt werden, dass eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen keinen Einfluss auf die Verteilung der hES Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus hat. Weder in der G1-, noch in der S- und G2/M-Phase konnten Unterschiede zwischen hypoxisch und normoxisch kultivierten Zellen auch nach Langzeitkultivierung festgestellt werden (Abb. 3.2.1.3 B, C).



**Abb. 3.2.1.3 Die Kultivierung von hES Zellen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt hat keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklus-Phasen.**

hES Zellen wurden mit Methanol fixiert und die DNA mit PI markiert. Die Messung der Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen erfolgte über Durchflusszytometrie (A). Für die durchflusszytometrische Analyse wurden Zelldoubletten und Zelldebris über Gating nach Forward Scatter- und Sideward Scatter-Eigenschaften von der Analyse ausgeschlossen. Zur Quantifizierung der Zellen in den einzelnen Zellzyklus-Phasen wurde die Dean/Jett/Fox-Methode verwendet (A). Die quantitativen Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mindestens acht unabhängigen Experimenten dargestellt.

Im Folgenden wurde die Anzahl an apoptotischen Zellen in den hypoxischen Kulturen über den durchflusszytometrischen Nachweis von Phosphatidylserin erhoben (Abb. 3.3.1.4 A). Durchflusszytometrisch konnte nach einer Passage hypoxischer Kultivierung von hES Zellen eine statistisch signifikante Erhöhung der Anzahl an apoptotischen Zellen im Vergleich zu konventionell kultivierten Zellen detektiert werden (Abb. 3.3.1.4 B; 4%  $12,9 \pm 7,6\%$ ; 21%  $6,8 \pm 2,9\%$ ;  $*P < 0,05$ ). Nach weiteren vier Passagen lag der Anteil an apoptotischen Zellen unter hypoxischen Bedingungen bei  $12,3\% \pm 4,8\%$  und war um das Doppelte im Vergleich zu normoxisch kultivierten Kontrollzellen erhöht (Abb. 3.3.1.4 C; 21%  $6,6 \pm 5,0\%$ ;  $*P < 0,05$ ).



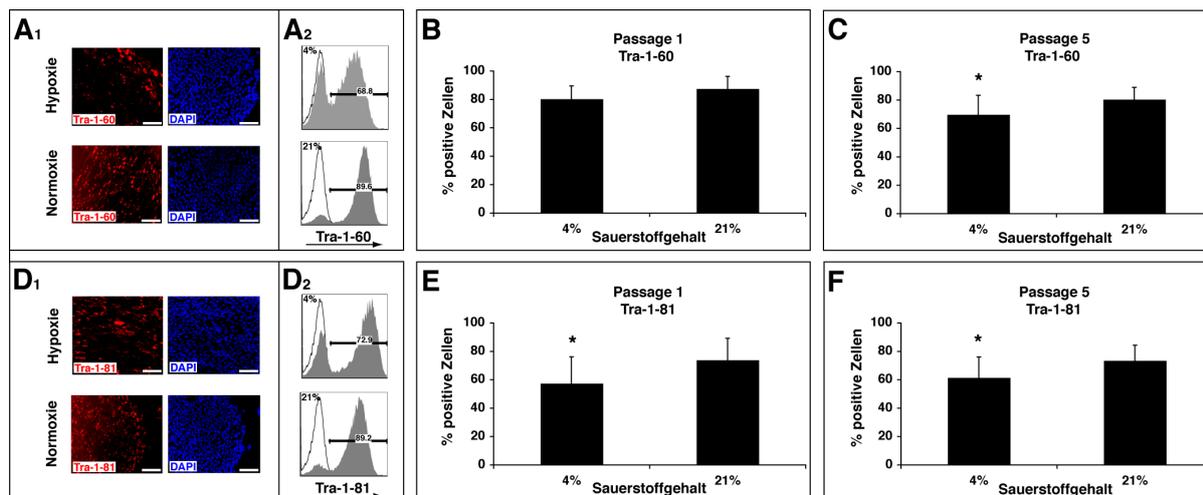
**Abb. 3.3.1.4 Die Apoptose von hES Zellen unter physiologischen Sauerstoffbedingungen ist erhöht.** hES Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert werden, zeigen bei einem Sauerstoffgehalt von 4% sowohl nach einer (B) als auch nach fünf Passagen (C) eine erhöhte Präsentation des Apoptose-Markers Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche.

hES Zellen wurden über fünf Passagen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Am Tag des Passagierens wurde die Anzahl an apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (A). Zelldoubletten und Zelldebris wurden über Gating nach Granularität und Größe von der Analyse ausgeschlossen. Die quantitativen Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens sechs unabhängigen Experimenten dargestellt. T-Tests zeigten statistisch signifikante Unterschiede mit  $*P < 0,05$ .

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass hES Zellen Feeder-frei unter hypoxischen Bedingungen kultiviert werden können. Die Feeder-freie Kultivierung von hES Zellen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt führt zu einer veränderten Morphologie und zu einer verlangsamten Proliferation. Zusätzlich wurde bei hypoxisch kultivierten hES Zellen ein erhöhter Anteil an apoptotischen Zellen im Vergleich zu normoxisch propagierten Kontrollzellen detektiert.

### **3.2.2 Reduktion der Pluripotenz und erhöhte Spontandifferenzierung bei Kultivierung von humanen ES Zellen unter physiologischen Bedingungen**

Um den Pluripotenz-Status von Feeder-freien, unter hypoxischen Bedingungen kultivierten hES Zellen evaluieren zu können, wurde über Durchflusszytometrie die Expression der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenantigene Tra-1-60 und Tra-1-81 quantitativ erfasst (Abb. 3.3.2.1 A, D). Bei einem physiologischen Sauerstoffgehalt von 4% während der Kultivierung konnte nach einer Passage keine statistisch signifikante Reduktion der Tra-1-60-Expression gegenüber der Kontrolle festgestellt werden (Abb. 3.3.2.1 B; 4%:  $80,3 \pm 9,2\%$ ; 21%:  $87,6 \pm 8,7\%$ ). Im Gegensatz dazu konnte bei hypoxisch kultivierten Zellen eine statistisch signifikante Reduktion der Expression des Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarkers Tra-1-81 gegenüber normoxisch kultivierten hES Zellen festgestellt werden (Abb. 3.3.2.1 E;  $*P < 0,05$ ). Lag die Expression von Tra-1-81 nach einer Passage bei einem Sauerstoffgehalt von 21% bei  $73,9 \pm 15,3\%$ , so sank die Expression bei einem Sauerstoffgehalt von 4% auf  $57,4 \pm 18,7\%$  ab. Nach weiteren vier Passagen hypoxischer Kultivierung sank sowohl der Anteil an Tra-1-60- als auch Tra-1-81-positiver Zellen im Vergleich zu normoxisch propagierten Zellen ab (Abb. 3.3.2.1 C, F). Betrug der Anteil an Tra-exprimierenden Zellen nach fünf Passagen normoxischer Kultivierung  $80,4 \pm 8,5\%$  für Tra-1-60 und  $73,4 \pm 10,8\%$  für Tra-1-81, so exprimierten bei einem Sauerstoffgehalt von 4% nur noch  $69,8 \pm 13,6\%$  der Zellen Tra-1-60 und  $61,5 \pm 14,6\%$  Tra-1-81. Die Herunterregulation der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker Tra-1-60 und Tra-1-81 nach fünf Passagen hypoxischer Kultivierung war mit einem  $*P < 0,05$  statistisch signifikant von der Kontrolle verschieden.

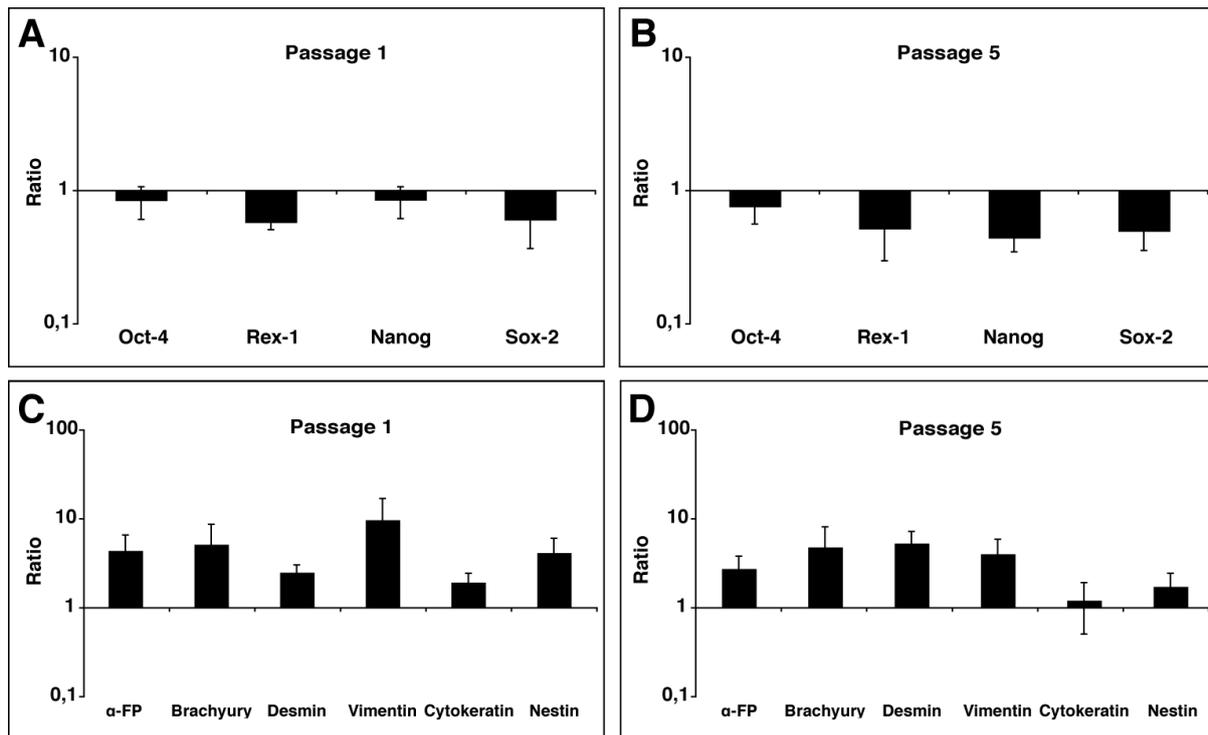


**Abb. 3.3.2.1 Die Langzeitkultivierung von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen hat eine Herunterregulation der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker Tra-1-60 und Tra-1-81 zur Folge.**

hES Zellen wurden über fünf Passagen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Am Tag des Passagierens wurde die Anzahl an Tra-1-60- bzw. Tra-1-81-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die gezeigten Fluoreszenzbilder (A1, D1) und durchflusszytometrischen Histogramme (A2, D2) sind repräsentativ für alle durchgeführten Versuche (n=7-8). Für die durchflusszytometrische Analyse wurden Zelldoubletten, Zelldebris und tote Zellen über Gating nach Forward Scatter- und Sideward Scatter-Eigenschaften sowie nach Hoechst 33258-Aufnahme von der Analyse ausgeschlossen. Offene Histogramme entsprechen Negativkontrollen, gefüllte Histogramme stellen Färbungen auf die angegebenen Pluripotenz-assoziierten Marker dar. Die Balken zeigen den Bereich der Fluoreszenzintensität an, der in die Berechnung des Anteils an für einen Pluripotenz-assoziierten Marker positiven Zellen einging (A2, D2). Als negativ für den jeweiligen Marker wurden die Zellen betrachtet, deren Fluoreszenzintensität im Bereich der Negativkontrolle lag. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens sieben unabhängigen Versuchen. T-Tests zeigten statistisch signifikante Unterschiede mit  $*P < 0,05$ . Maßstab (A1, D1) = 100  $\mu$ m.

Die Herunterregulation der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenantigene nach Langzeitkultivierung unter hypoxischen Bedingungen ist ein erstes Indiz für eine erhöhte Spontandifferenzierung von humanen ES Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Basierend auf den Ergebnissen zur Herunterregulation von Tra-1-60 und Tra-1-81 wurde im folgenden die Expression der Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Oct-4, Rex-1, Nanog und Sox-2 auf mRNA-Ebene über quantitative RT-PCR erhoben. hES Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert worden waren, zeigten nach einer Passage keine klare Tendenz in der Regulation der Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Oct-4 und Nanog (Abb. 3.3.2.2 A; Oct-4:  $0,84 \pm 0,23$ ; Nanog  $0,84 \pm 0,24$ ). Für die Pluripotenz-assoziierten Marker Sox-2 und Rex-1 konnte im Vergleich zu Kontrollen unter hypoxischen Bedingungen bereits nach einer Passage eine Reduktion der Expression auf mRNA-Ebene festgestellt werden (Abb. 3.3.2.2 A; Rex-1:  $0,57 \pm 0,07$ ; Sox-2:  $0,59 \pm 0,24$ ). Zum Ende der Kultivierung lag die

Expression des Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktor Oct-4 leicht unter dem Expressionsniveau normoxisch kultivierter Kontrollzellen (Abb. 3.3.2.2 B; Oct-4:  $0,75 \pm 0,19$ ). Für die Transkriptionsfaktoren Rex-1, Nanog, und Sox-2 konnte jedoch nach weiteren vier Passagen hypoxischer Kultivierung eine deutliche Herunterregulation auf die Hälfte des Expressionsniveaus von normoxisch propagierten hES Zellen festgestellt werden (Abb. 3.3.2.2 B; Rex-1:  $0,51 \pm 0,22$ ; Nanog:  $0,43 \pm 0,09$ ; Sox-2:  $0,49 \pm 0,14$ ). Die Analyse Differenzierungs-assoziiierter Marker für Entoderm ( $\alpha$ -Fetoprotein ( $\alpha$ -FP), Mesoderm (Brachyury, Desmin, Vimentin) und Ektoderm (Cytokeratin, Nestin) zeigte nach einer Passage hypoxischer Kultivierung eine Marker-abhängige Heraufregulation im Bezug auf normoxisch kultivierten Kontrollen (Abb. 3.3.2.2 C). Nach Langzeitkultivierung unter einem Sauerstoffgehalt von 4% konnte jedoch im Vergleich zu Zellen, die bei einem Sauerstoffgehalt von 21% kultiviert worden waren, eine Heraufregulation der endodermalen und mesodermalen Marker auf mRNA-Ebene detektiert werden. Die Expression der Marker  $\alpha$ -FP, Brachyury, Desmin und Vimentin war unter hypoxischen Bedingungen um das Drei- bis Fünffache im Bezug auf normoxische Kontrollzellen heraufreguliert (Abb. 3.3.2.2 D). Die Expression der ektodermalen Marker Cytokeratin und Nestin lag bei hypoxisch kultivierten hES Zellen nach fünf Passagen auf oder leicht über dem Expressionsniveau von normoxisch propagierten Kontrollzellen (Cytokeratin:  $1,22 \pm 0,71$ ; Nestin  $1,74 \pm 0,72$ ).



**Abb. 3.3.2.2 Die Expression Pluripotenz-assoziiertes und Differenzierungs-assoziiertes Gene wird durch eine hypoxische Kultivierung beeinflusst.** Werden hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so löst dies eine Herunterregulation der Expression der Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Rex-1, Nanog und Sox-2 aus (A, B). Die Expression der Differenzierungs-assoziierten Gene  $\alpha$ -Fetoprotein ( $\alpha$ -FP), Brachyury, Desmin, Vimentin, Cytokeratin und Nestin zeigen bei einer hypoxischen Kultivierung nach einer Passage eine Heraufregulation bezogen auf Kontrollzellenniveau. Nach weiteren vier Passagen unter hypoxischen Bedingungen steigt die mRNA-Expression entodermaler und mesodermaler Marker über das Niveau der Kontrolle (D).

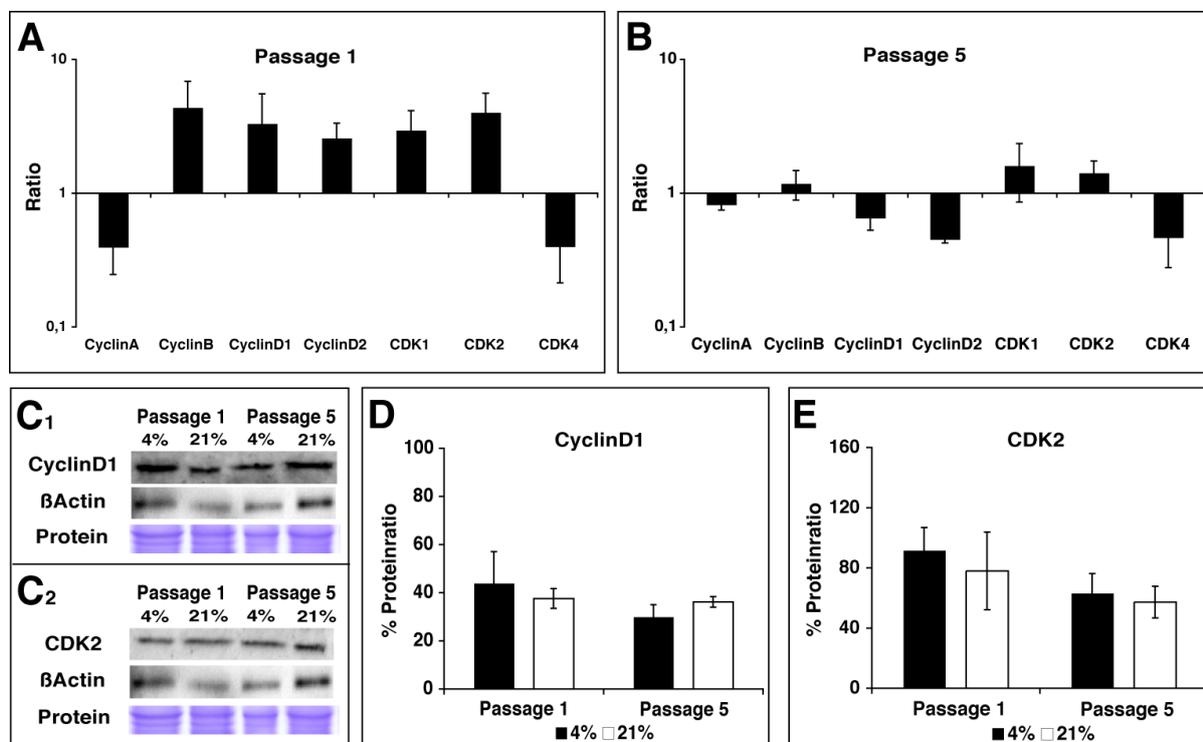
hES Zellen wurden über 5 Passagen hypoxisch kultiviert. Am Tag der Passage wurden für die quantitative RT-PCR Proben genommen. Die für die hypoxische Kultivierung erhobenen Daten wurden nach der  $\Delta\Delta$ CP-Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch kultivierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte aus sechs Experimenten  $\pm$  Standardfehler.

Die Daten zur Feeder-freien Kultivierung von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen zeigen, dass ein niedriger Sauerstoffgehalt während der Kultivierung keinen positiven Effekt auf hES Zellen hat. Weder die Proliferation noch die Pluripotenz-erhaltung von hES Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert worden waren, wurden positiv beeinflusst. Anscheinend wirkte sich ein niedriger Sauerstoffgehalt differenzierungs-induzierend aus.

### 3.2.3 Einfluss von hypoxischen Bedingungen auf die Regulation Proliferations-assoziiierter Marker

Die vorab präsentierten Daten zur Proliferation und Apoptose lassen die Vermutung zu, dass die Transition von Zellen im Zellzyklus durch die Kultivierung von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen beeinflusst werden. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde in einem ersten Schritt auf mRNA-Ebene mit Hilfe von quantitativer PCR die Expression Zellzyklus-assoziiierter Marker in hypoxisch kultivierten hES Zellen analysiert (Abb. 3.3.3.1 A, B). Im Vergleich zu normoxischen Zellen hatte eine Kultivierung von hES Zellen unter einem Sauerstoffgehalt von 4% nach einer Passage eine Heraufregulation der Zellzyklus-assoziierten Marker CyclinB, CyclinD1, CyclinD2, CDK1 und CDK2 in hES Zellen zur Folge (Abb. 3.3.3.1 A). Es konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass die Expression von CyclinA, einem direkten Zielgen der G1/S-Transition, bei einem Sauerstoffgehalt von 4% gegenüber Kontrollzellen deutlich herunterreguliert war (CyclinA:  $0,39 \pm 0,15$ ). Des Weiteren konnte eine Herunterregulation der Expression von CDK4 unter hypoxischen Bedingungen festgestellt werden (CDK4:  $0,4 \pm 0,19$ ). Zum Ende der hypoxischen Kultivierung lag die Expression von CyclinB; CDK1 und CDK2 auf oder leicht über dem Niveau normoxisch propagierter Kontrollzellen (Abb. 3.3.3.1 B). Die Marker CyclinA, CyclinD1, CyclinD2 und CDK4 wiesen hingegen in Bezug zu Kontrollzellen eine verringerte mRNA-Expression auf (Abb. 3.3.3.1 B; CyclinA:  $0,82 \pm 0,07$ ; CyclinD1:  $0,65 \pm 0,13$ ; CyclinD2:  $0,45 \pm 0,03$ ; CDK4:  $0,46 \pm 0,19$ ). Auf Proteinebene konnten die Daten zur mRNA-Untersuchung der Zellzyklus-assoziierten Marker bestätigt werden (Abb. 3.3.3.1 C, D, E). Es konnte gezeigt werden, dass eine Kultivierung von hES Zellen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt nach einer Passage eine Erhöhung der Expression des Proteins CyclinD1 zur Folge hatte (Abb. 3.3.3.1 C1, D: 4%:  $43,89 \pm 26,39$ ; 21%:  $37,58 \pm 4,03$ ). Die Präsenz des Proteins CyclinD1 in hypoxischen Zellen sank zum Ende der Kultivierung unter das Niveau normoxisch kultivierter Kontrollzellen ab (Abb. 3.3.3.1 D: 4%:  $29,90 \pm 10,32$ ; 21%  $36,18 \pm 4,32$ ). Die Analyse von CDK2 auf Protein-Ebene ließ erkennen, dass bei Zellen, die bei einem Sauerstoffgehalt von 4% kultiviert worden waren, im Vergleich zu einem Sauerstoffgehalt von 21%, CDK2 geringfügig

auch nach Langzeitkultivierung heraufreguliert war (Abb. 1.3.7 C2, E; Passage 1: 4%:  $91,54 \pm 15,20$ ; 21%:  $77,94 \pm 13,70$ ; Passage 5: 4%:  $63,09 \pm 15,81$ ; 21%:  $57,25 \pm 10,51$ ).

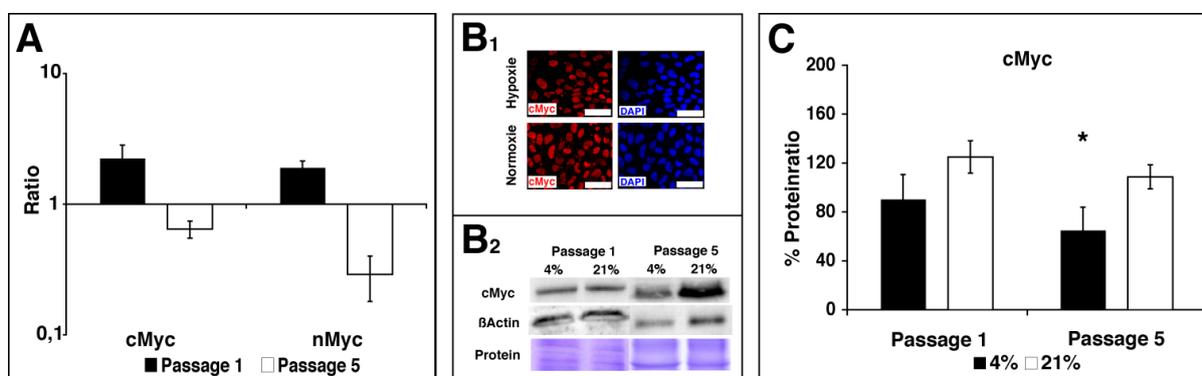


**Abb. 3.3.3.1 Die Expression Zellzyklus-assoziiierter Gene und Proteine wird durch eine hypoxische Kultivierung beeinflusst.** Werden hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so löst dies eine Marker-abhängige Herauf- oder Herunterregulation der Expression Zellzyklus-assoziiierter Marker auf mRNA-Ebene aus (A, B). Auf Protein-Ebene (C, D, E) löst eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen eine Herunterregulation des Zellzyklus-assoziierten Marker CyclinD1 (C1, D) und eine Heraufregulation des mit Apoptose assoziierten Zellzyklus-Markers CDK2 aus (C2, D).

hES Zellen wurden über 5 Passagen hypoxisch kultiviert. Am Tag der Passage wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Proben genommen. Die für die hypoxische Kultivierung erhobenen qPCR Daten wurden nach der  $\Delta\Delta$ CP-Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch kultivierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A, B). Die erhobenen quantitativen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ® über Normalisierung der Bandenstärke des entsprechenden Proteins auf den Gesamtproteingehalt bezogen (D, E). Die gezeigten Western Blots (C) sind repräsentativ für alle durchgeführten Versuche (n=6-8). Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, B, D, E) aus mindestens sechs unabhängigen Experimenten dargestellt.

Ergänzend zu den vorangegangenen Daten konnte die Herunterregulation der Expression von den G1/S-Transitions-assoziierten Zielgenen cMyc und nMyc auf mRNA- und Protein-Ebene detektiert werden (Abb. 3.3.3.2). Lag die Expression auf mRNA-Ebene unter hypoxischen Bedingungen nach einer Passage noch über dem Niveau von normoxisch propagierten Kontrollzellen, so konnte nach fünf Passagen eine Herunterregulation von cMyc und nMyc auf mRNA-Ebene detektiert werden (Abb. 3.3.3.2 A; Passage 5: cMyc:  $0,65 \pm 0,09$ ; nMyc  $0,29 \pm 0,11$ ). Die

Herunterregulation der mRNA-Expression von cMyc unter hypoxischen Bedingungen konnte auf Protein-Ebene bestätigt werden (Abb. 3.3.3.2 B, C). So zeigte sich bei einer hypoxischen Kultivierung von hES Zellen im Bezug auf normoxisch kultivierte Kontrollzellen nach einer Passage eine Reduktion des Onkogens cMyc auf Protein-Ebene (Abb. 3.3.3.2 B2; C; Passage 1: 4%:  $90,59 \pm 20,09$ ; 21%:  $125,09 \pm 34,37$ ). Eine Langzeitkultivierung von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen hatte im Vergleich zu normoxischen Bedingungen eine statistisch signifikante Herunterregulation der cMyc-Expression auf Protein-Ebene zur Folge (Abb. 3.3.3.2 C; 4%:  $65,26 \pm 18,74$ ; 21%:  $108,80 \pm 24,41$ ;  $P^* < 0,05$ ).



**Abb. 3.3.3.2 Die Expression der Zellzyklus-assoziierten Onkogene cMyc und nMyc wird durch eine hypoxische Kultivierung beeinflusst.** Werden hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so löst dies eine Herunterregulation der Expression der Zellzyklus-assoziierten Marker cMyc und nMyc auf mRNA-Ebene aus (A). Auf Proteinebene löst eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen eine verminderte Expression von cMyc aus (B, C).

hES Zellen wurden über 5 Passagen hypoxisch kultiviert. Am Tag der Passage wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Proben genommen. Die für die hypoxische Kultivierung erhobenen qPCR Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch kultivierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A). Die erhobenen quantitativen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ<sup>®</sup> über Normalisierung der Bandenstärke des entsprechenden Proteins auf den Gesamtproteingehalt bezogen (D, E). Die gezeigten Fluoreszenzbilder (B1) und Western Blots (B2) sind repräsentativ für alle durchgeführten Versuche (n=6-8). Es ist zu beachten das aufgrund der hohen Proteinkonzentration die Banden für  $\beta\text{Actin}$  ausgebrannt und somit heller in Bild B2 erscheinen. Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, B, D, E) aus mindestens sechs unabhängigen Experimenten dargestellt. T-Tests zeigen statistisch signifikante Unterschiede mit  $*P < 0,05$ . Maßstab (B1) =  $50\mu\text{m}$ .

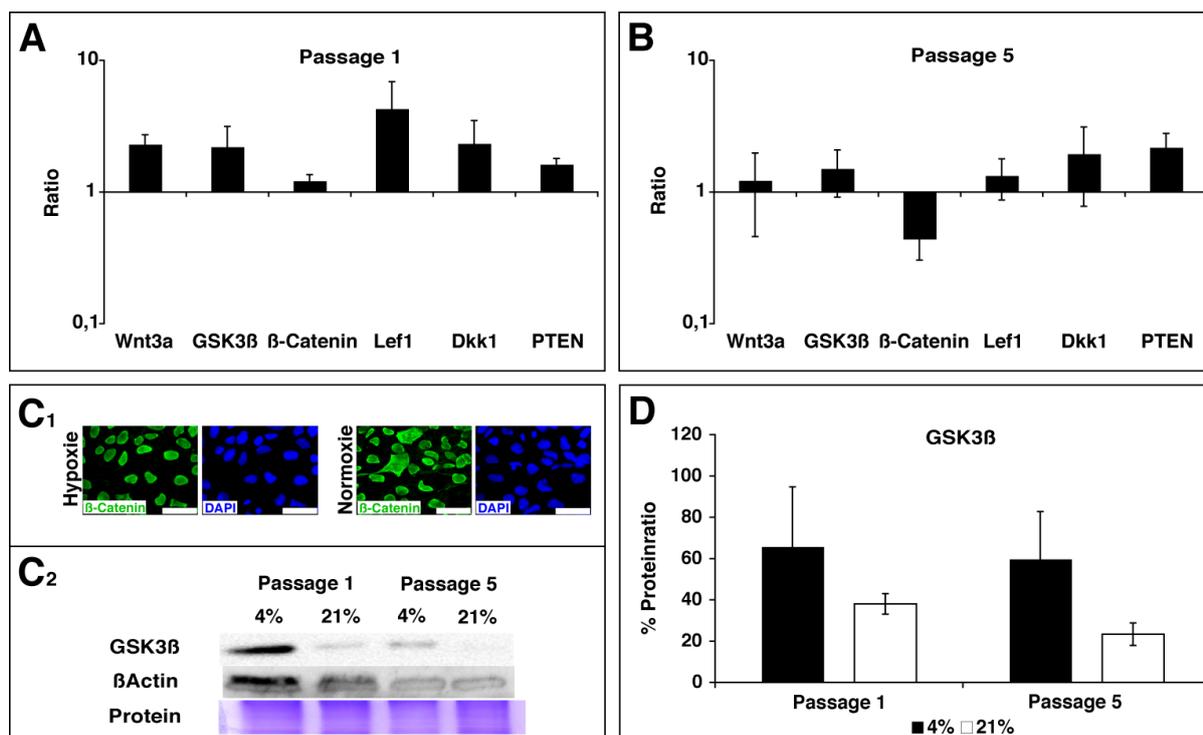
Durch die unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesene Herunterregulation der Zielgene der G1-S-Transition cMyc, nMyc und CyclinD1 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene konnten die gewonnenen Ergebnisse zur verlangsamten Proliferation von hES Zellen bei Kultivierung unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt bestätigt werden. Eine hypoxische Kultivierung hat vermutlich eine verlangsamte Transition der Zellen durch die einzelnen Zellzyklusphasen zur Folge. Die erhöhte Apoptose-rate unter hypoxischen Bedingungen konnte durch die

niedrigere Expression von G1/S-Transition-assoziierten Proteine auf molekularer Ebene bestätigt werden.

### **3.2.4 Reduktion der $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion bei einer Kultivierung von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen**

Die erhobenen Daten zur Proliferation und Pluripotenzerhaltung von hypoxisch kultivierten hES Zellen deuten darauf hin, dass durch eine Kultivierung von hES Zellen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt eine verlangsamte Proliferation und eine erhöhte Spontandifferenzierung verursacht werden. Inwieweit der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg unter hypoxischen Bedingungen in hES Zellen beeinflusst wird, wurde im Folgenden analysiert. Zunächst wurde die Expression von Markern, die in den WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg involviert sind, auf mRNA-Ebene untersucht. Die qPCR-Analyse zeigte, dass im Vergleich zu normoxischen Bedingungen nach einer Passage unter Hypoxie die Expression von Wnt3a (Ligand), GSK3 $\beta$  (Inhibitor), Lef1 (Transkriptionsfaktor) und Dkk1 (Inhibitor) erhöht war (Abb. 3.3.4.1 A; Wnt3a:  $2,31 \pm 0,41$ ; GSK3 $\beta$ :  $2,19 \pm 0,96$ ; Lef1:  $4,29 \pm 1,84$ ; Dkk1:  $2,33 \pm 1,26$ ). Auf mRNA-Ebene konnte darüber hinaus eine Erhöhung von PTEN detektiert werden. Die Expression von  $\beta$ -Catenin bewegte sich größenordnungsmäßig auf dem Niveau normoxisch kultivierter Kontrollzellen. Wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum ein Sauerstoffgehalt von 4% eingesetzt, so konnte zum Ende der Kultivierung kein Unterschied im Bezug auf Zellen, die bei einem Sauerstoffgehalt von 21% kultiviert worden waren, in der Expression von Wnt3a, GSK3 $\beta$ , Lef1 und Dkk1 festgestellt werden (Abb. 3.3.4.1 B). Im Gegensatz dazu konnte eine verminderte mRNA-Expression von  $\beta$ -Catenin unter hypoxischen Bedingungen detektiert werden und lag im Vergleich zu Kontrollen um die Hälfte reduziert vor ( $\beta$ -Catenin:  $0,44 \pm 0,13$ ). Darüber hinaus konnte auch nach fünf Passagen Hypoxie eine erhöhte PTEN-Expression gemessen werden. Immunzytochemisch konnte in hES Zellen unter einem Sauerstoffgehalt von 4% im Vergleich zu normoxisch kultivierten Kontrollzellen eine leichte Reduktion der Protein-Expression von  $\beta$ -Catenin nach fünf Passagen nachgewiesen werden (Abb. 3.3.4.1 C1). Eine hypoxische Kultivierung hatte des Weiteren sowohl nach einer als auch nach fünf Passagen eine Erhöhung

der Proteinkonzentration von GSK3 $\beta$  zur Folge (Abb. 3.3.4.1 C2, D; Passage 1: 4%:65,73 $\pm$ 28,96; 21%: 38,05 $\pm$ 5,04; Passage 5: 4%: 59,67 $\pm$ 23,10; 21%: 23,34 $\pm$ 5,53). Ergänzend dazu konnte darüber hinaus auch die Herunterregulation der direkten  $\beta$ -Catenin-Signalwegzielgene cMyc, nMyc und CyclinD1 auf mRNA- und Protein-Ebene detektiert werden (Abb. 3.3.3.2).



**Abb. 3.3.4.1** Der Wnt/ $\beta$ Catenin-Signalweg wird durch eine Kultivierung von hES Zellen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt reprimiert. Werden hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so löst dies eine Herunterregulation des Signaltransduktions-markers  $\beta$ -Catenin auf mRNA-Ebene aus (A). Auf Proteinebene (C, D) löst eine hypoxische Kultivierung eine erhöhte Expression von GSK3 $\beta$  aus, was eine Reduktion von  $\beta$ -Catenin im Nukleus zur Folge hat (C1, C2, D).

hES Zellen wurden über 5 Passagen hypoxisch kultiviert. Am Tag der Passage wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Proben genommen. Die für die hypoxische Kultivierung erhobenen qPCR Daten wurden nach der  $\Delta\Delta$ CP-Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch kultivierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A, B). Die erhobenen quantitativen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ® über Normalisierung der Bandenstärke des entsprechenden Proteins auf den Gesamtproteingehalt bezogen (D). Die gezeigten Fluoreszenzbilder (C1) und Western Blots (C2) sind repräsentativ für alle durchgeführten Versuche (n=6-8). Es ist zu beachten das aufgrund der hohen Proteinkonzentration die Banden für  $\beta$ Actin ausgebrannt sind und somit heller im Bild C2 erscheinen. Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, B, D) aus mindestens sechs unabhängigen Experimenten dargestellt. Maßstab (C1) = 50 $\mu$ m.

Die für den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg gewonnenen Daten zeigen, dass in hES Zellen, die unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt kultiviert werden, die Signaltransduktionskomponenten des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges vorhanden sind. Jedoch deuten die gewonnenen Daten, wie die Herunterregulation von  $\beta$ -Catenin, cMyc, nMyc und CyclinD1 auf mRNA-Ebene und die erhöhte GSK3 $\beta$ -Aktivität auf

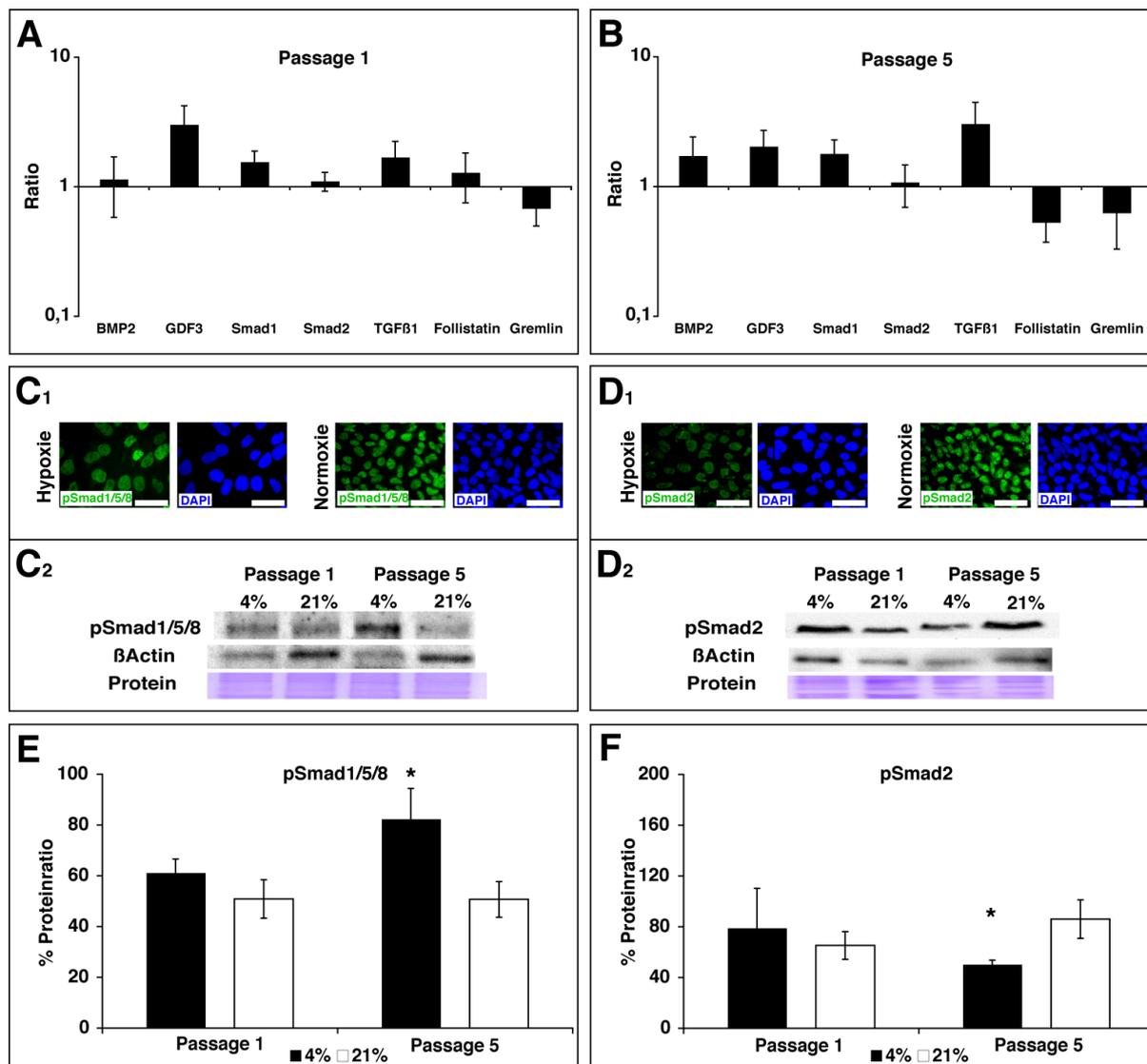
Protein-Ebene, auf eine Reduktion der  $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion unter hypoxischen Bedingungen hin.

### **3.2.5 Induktion des BMP-Signalweges während der Kultivierung von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen**

Der TGF $\beta$ /BMP Signalweg spielt in der Aufrechterhaltung der Proliferation und der Regulation/Balance von Pluripotenzerhaltung und Spontandifferenzierung in hES Zellen eine wichtige Rolle. Um den Einfluss hypoxischer Bedingungen auf den TGF $\beta$ /BMP-Signalweg zu evaluieren, wurde in einem ersten Schritt die Expression von Komponenten des TGF $\beta$ /BMP-Signalweges auf mRNA-Ebene analysiert (Abb. 3.3.5.1 A, B). qRT-PCR Studien zeigten, dass nach einer Passage unter dem Einfluss eines Sauerstoffgehaltes von 4% hES Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen keine Veränderung in der Expression von BMP2 (Rezeptor), Smad2 (Signaltransduktionsprotein) und Follistatin (BMP-Antagonist) aufwiesen (Abb. 3.3.5.1 A). Die Marker GDF3 (BMP-Inhibitor), Smad1 (Signaltransduktionsprotein) und TGF $\beta$ 1 (Rezeptor) hingegen wiesen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt auf mRNA-Ebene eine leicht erhöhte Expression über den gesamten Kultivierungszeitraum auf (Abb. 3.3.5.1 A, B; Passage 1: GDF3:  $3,02 \pm 1,19$ ; Smad1:  $1,56 \pm 0,33$ ; TGF $\beta$ 1:  $1,69 \pm 0,55$ ; Passage 5: GDF3:  $2,05 \pm 0,66$ ; Smad1:  $1,79 \pm 0,29$ ; TGF $\beta$ 1:  $3,06 \pm 1,40$ ). Gremlin zeigte auf mRNA-Ebene unter hypoxischen Bedingungen sowohl nach einer als auch nach fünf Passagen eine deutliche Herunterregulation im Vergleich zu normoxisch kultivierten hES Zellen (Abb. 3.3.5.1 A, B; Passage 1:  $0,68 \pm 0,18$ ; Passage 5:  $0,63 \pm 0,29$ ). Die proteinbiochemische Analyse der im TGF $\beta$ /BMP-Signalweg wichtigen Signaltransduktionsproteine Smad1 (pSmad1/5/8) und Smad2 (pSmad2) ergab folgendes (Abb. 3.3.5.1 C, D, E, F): Nach einer Passage Kultivierung unter einem Sauerstoffgehalt von 4% konnte im Vergleich zu normoxischen Kontrollzellen eine erhöhte Phosphorylierung von Smad1/5/8 detektiert werden (Abb. 3.3.5.1 C, E; Passage 1: 4%:  $61,27 \pm 5,34$ ; 21%:  $50,89 \pm 7,55$ ). Wurden hES Zellen weitere vier Passagen bei einem Sauerstoffgehalt von 4% propagiert, so konnte eine Erhöhung der pSmad1/5/8-Expression auf Protein-Ebene detektiert werden (Abb. 3.3.5.1 C, E;

---

Passage 5: 4%:82,42±11,98; 21%: 50,71±7,05). Die erhöhte Phosphorylierung von Smad1/5/8 nach fünf Passagen unter hypoxischen Bedingungen war mit einem \*P<0,05 statistisch signifikant von der Kontrolle verschieden. Die Analyse der aktiven Form von Smad2 (pSmad2) ergab, dass nach einer Passage eine leicht erhöhte Phosphorylierung in hypoxisch kultivierten hES Zellen im Bezug auf normoxische Kontrollen festgestellt werden konnte (Abb. 3.3.5.1 D, F; Passage 1: 4%: 79,08±31,15; 21% 65,25±10,94). Wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum ein Sauerstoffgehalt von 4% eingesetzt, so konnte zum Ende der Kultivierung ein Absinken der Expression von pSmad2 unter das Niveau normoxisch propagierter Kontrollzellen detektiert werden (Abb. 3.3.5.1 D, F; Passage 5: 4%: 50,38±3,27; 21%: 85,99,35±15,17). Die reduzierte Phosphorylierung von Smad2 war mit einem \*P<0,05 statistisch signifikant von der Kontrolle verschieden.



**Abb. 3.3.5.1 Der BMP-Signalweg wird durch eine Kultivierung von hES Zellen unter einem Sauerstoffgehalt von 4% induziert.** Werden hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so löst dies auf mRNA-Ebene eine Herauf- oder Herunterregulation Signalweg-assoziiierter Marker (A, B) und eine Herauf- oder Herunterregulation der Signaltransduktions-marker pSmad1/5/8 und pSmad2 auf Proteinebene aus (C2, D2, E, F).

hES Zellen wurden über 5 Passagen hypoxisch kultiviert. Am Tag der Passage wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Analyse Proben genommen. Die für die hypoxische Kultivierung erhobenen qPCR-Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch kultivierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A, B). Die erhobenen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ und über Normalisierung der Bandenstärke auf den Gesamtproteingehalt bezogen (C2, D2, E, F). Immunzytochemische Bilder und Western Blots (C, D) stellen repräsentative Bilder für die jeweiligen Kultivierungsbedingungen dar. Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, B, E, F) aus mindestens sechs unabhängigen Experimenten dargestellt. T-Tests zeigen statistisch signifikante Unterschiede mit  $*P < 0,05$ .

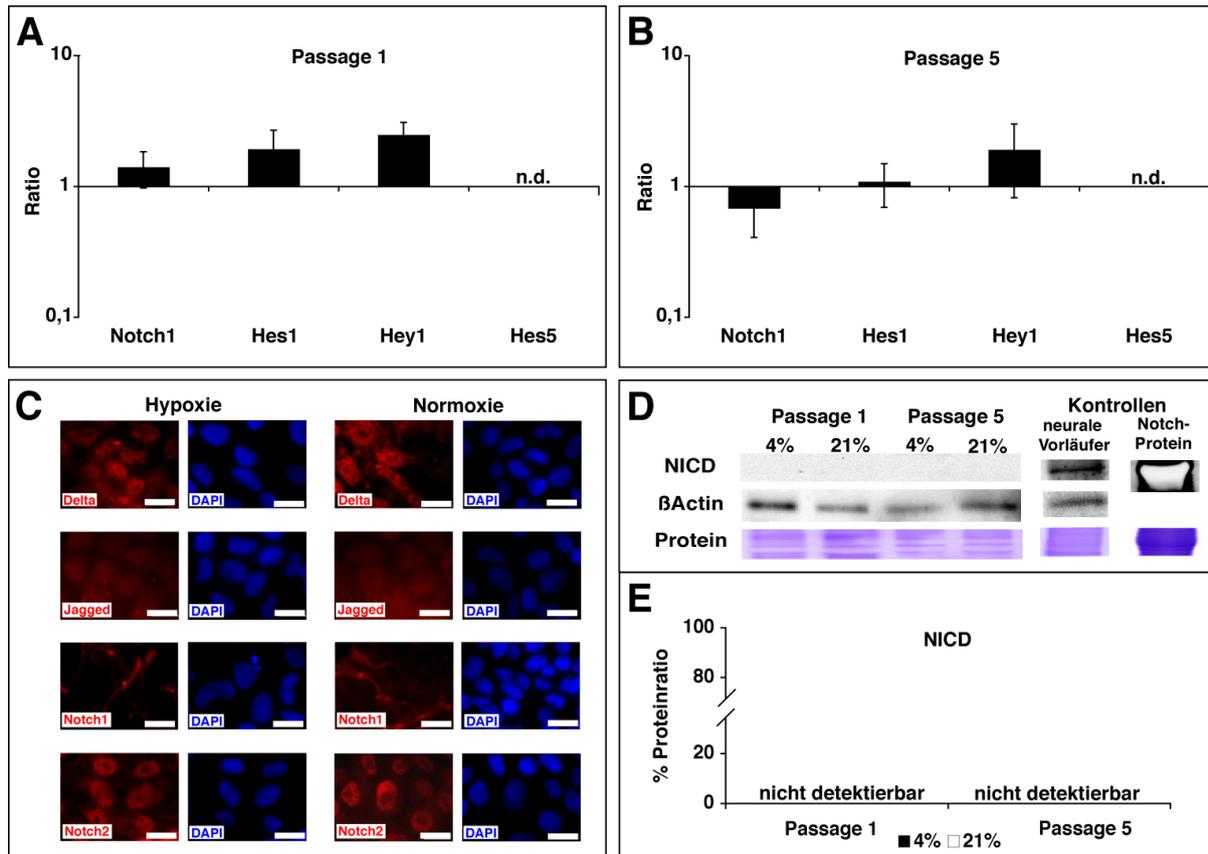
Die Daten zum TGFβ/BMP-Signalweg lassen vermuten, dass unter hypoxischen Bedingungen die Spontandifferenzierung durch erhöhte Aktivität von Smad1/5/8 auf Proteinebene begünstigt wird. Unterstützt wird die Hypothese durch den Nachweis

einer erhöhten Expression von mesodermalen und endodermalen Markern auf qPCR-Ebene.

### **3.2.6 Kein Einfluss einer hypoxischen Kultivierung auf den Notch-Signalweg**

Dem Notch-Signalweg wird eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung des multipotenten Stadiums von verschiedensten Vorläuferzellen zugeordnet. Darüber hinaus ist bekannt, dass der Notch-Signalweg mit Hif1 $\alpha$  interagiert (Gustafsson et al. 2005). Inwieweit der Notch-Signalweg in hES Zellen aktiv ist und ob dieser unter hypoxischen Bedingungen beeinflusst wird, wurde im Folgenden auf mRNA- und Protein-Ebene analysiert. Auf mRNA-Ebene konnte sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen die Expression des Notch1-Rezeptors und der direkten Signalwegszielgene Hes1 und Hey1, jedoch nicht von Hes5 nachgewiesen werden (Abb. 3.2. A, B). Nach einer Passage zeigte sich im Bezug auf Kontrollen unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte mRNA-Expression von Hes1 und Hey1 (Abb. 3.2.6.1 A; Hes1:  $1,93\pm 0,73$ ; Hey1:  $2,49\pm 0,60$ ). Die Expression von Notch1 lag auf dem Niveau normoxisch propagierter Kontrollzellen. Nach Langzeitkultivierung konnten, im Vergleich zu Zellen die bei einem Sauerstoffgehalt von 21% kultiviert worden waren, unter einem Sauerstoffgehalt von 4% keine Expressionsunterschiede der mRNA von Notch1, Hes1 und Hey1 festgestellt werden (Abb. 3.2.6.1 B; Notch1:  $0,68\pm 0,27$ ; Hes1:  $1,09\pm 0,40$ ; Hey1:  $1,91\pm 0,93$ ). Auf Protein-Ebene konnte immunozytochemisch die Expression der Notch-Rezeptoren Notch1, Notch2 und der Notch-Liganden Delta und Jagged sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden (Abb. 3.2.C) Es konnten jedoch keine Unterschiede im Bezug zu normoxisch kultivierten hES Zellen in der Rezeptor- und Ligandenexpression unter hypoxischen Bedingungen detektiert werden. Um zu evaluieren, ob eine hypoxische Kultivierung die Stabilisierung der Notch-Intrazellulären Domäne (NICD) in hES Zellen unterstützt, wurde darüber hinaus die Existenz und Stabilisierung von NICD auf Protein-Ebene analysiert (Abb. 3.2.D, E). Die proteinbiochemische Analyse ergab, dass sowohl bei einer Kultivierung von hES Zellen unter einem Sauerstoffgehalt von 4% als auch von 21%

kein NICD detektiert werden konnte. Die Existenz von NICD konnte auch nach einer Langzeitkultivierung unter hypoxischen Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Vermutlich ist die Abspaltung, Stabilisierung und Translokation von NICD in den Nukleus in hES Zellen auf basaler Ebene reguliert, welches eine Detektion mit den hier angewandten Methoden aufgrund der fehlenden Sensitivität nicht möglich macht.



**Abb. 3.2.6.1 Der Notch-Signalweg ist in hypoxisch kultivierten hES Zellen nicht aktiv.** Werden hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so kann sowohl auf qPCR- als auch auf Protein-Ebene keine erhöhte Aktivität des Notch-Signalweges nachgewiesen werden.

hES Zellen wurden über 5 Passagen hypoxisch kultiviert. Am Tag der Passage wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Analyse Proben genommen. Die für die hypoxische Kultivierung erhobenen qPCR Daten wurden nach der  $\Delta\Delta$ CP-Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch kultivierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A, B). Die erhobenen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ und über Normalisierung der Bandenstärke auf den Gesamtproteingehalt bezogen (D, E). Immunzytochemische Bilder und Western Blots (C, D) stellen repräsentative Bilder für die jeweiligen Kultivierungsbedingungen dar. Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, B, E) aus mindestens sechs unabhängigen Experimenten dargestellt. Maßstab=20 $\mu$ m. n.d.= nicht detektierbar.

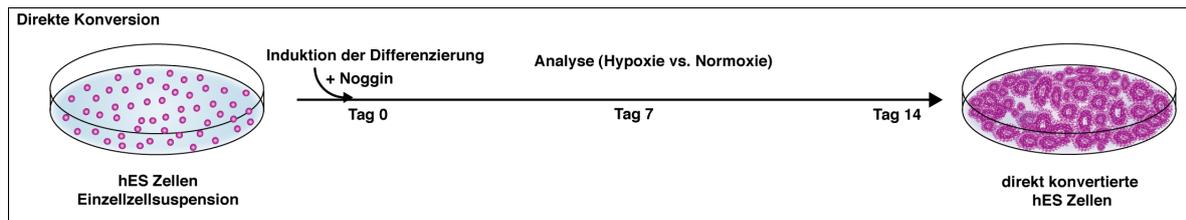
Die Daten zum Notch-Signalweg zeigen, dass hES Zellen Notch-Liganden und -Rezeptoren sowohl unter hypoxischen als auch normoxischen Bedingungen exprimieren. Es konnte kein Einfluss einer hypoxischen Kultivierung auf die Aktivität

des Notch-Signalweges festgestellt werden. Die Signaltransduktion des Notch-Signalweges, die Abspaltung von NICD, wird sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen auf basalem Niveau gehalten.

Zusammenfassend erwies sich eine hypoxische Kultivierung nicht förderlich auf die Proliferation von hES Zellen. Daneben wurden unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und der TGF $\beta$ /BMP-Signalweg negativ beeinflusst, welches die erhöhte Spontandifferenzierung von hES Zellen in der Hypoxie erklären könnte.

### **3.3 Direkte Konversion humaner ES Zellen in neurale Vorläuferzellen unter hypoxischen Bedingungen**

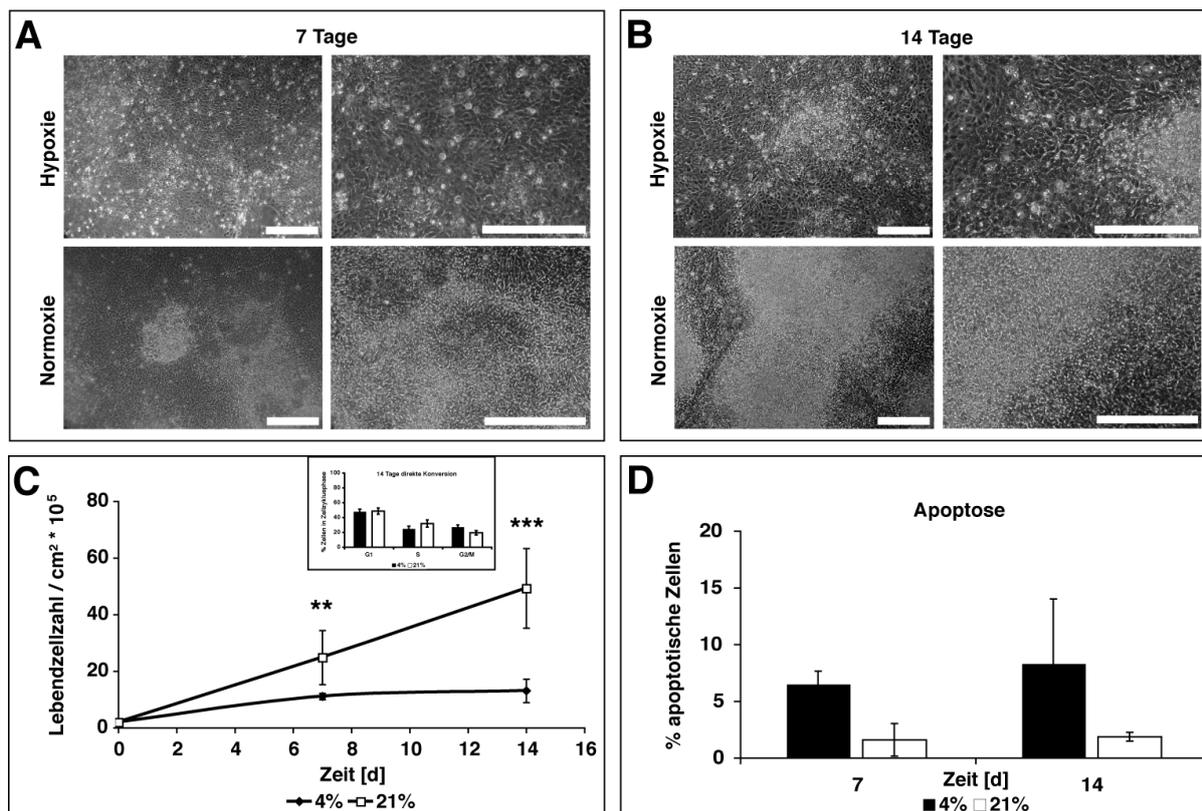
Die Differenzierung von hES Zellen in neuroepitheliale Stammzellen (hESNS Zellen) kann über verschiedenste Protokolle durchgeführt werden. Meistens beinhalten diese Protokolle mehrere Schritte, bei denen eine Suspensionskultivierung der Zellen als Embryoidkörperchen und Neurosphären notwendig ist (Zhang et al. 2001; Koch 2009). Daneben gibt es jedoch die Möglichkeit, humane ES Zellen ohne anfallende Suspensionsschritte adhärent in neurale Stammzellen zu konvertieren (Abb. 3.3 ; Gerrard et al. 2005; Chambers et al. 2009). Bei der direkten Konversion von hES Zellen in neurale Stammzellen werden diese als Einzelzellen auf eine extrazellulären Matrix (Matrigel<sup>®</sup>) ausgesät und eine gerichtete Differenzierung durch Zugabe von BMP-Antagonisten (z.B. Noggin) ausgelöst (Abb. 3.3). Die direkte Konversion hat gegenüber der Suspensionskultivierung, bei der durch die Sphärenkultivierung ein Nährstoffgradient auftreten kann, den Vorteil, dass die adhärent direkt konvertierten Zellen innerhalb der Kultur das gleiche Milieu vorfinden. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit ein subatmosphärischer Sauerstoffgehalt die direkte Differenzierung von hES Zellen in Stammzellen des Neuroepithels und die vorangegangenen beschriebenen Signalwege beeinflusst.



**Abbildung 3.3 Zeitverlauf der normoxischen und hypoxischen direkten Konversion von hES Zellen in neurale Vorläuferzellen.** Durch Supplementierung des Kultivierungsmedium mit dem BMP-Signalwegs-Antagonisten Noggin wurden hES Zellen über einen Zeitraum von zwei Wochen in neurale Vorläuferzellen direkt konvertiert. Die Analyse der hypoxisch oder normoxisch direkt konvertierten hES Zellen erfolgte sieben und vierzehn Tage nach Einleitung der Differenzierung.

### 3.3.1 Stagnation der Proliferation von direkt konvertierten hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen

Eine erste qualitative Evaluierung des Effektes des Verlaufes einer adhären, gerichteten Differenzierung von hES Zellen in neurale Vorläuferzellen unter einem physiologisch, niedrigen Sauerstoffgehalt erfolgte über die mikroskopische, morphologische Beurteilung. Wurden hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen differenziert, so resultierten daraus deutlich größere Zellen als unter normoxischen Bedingungen (Abb. 1.1.1 A, B). Darüber hinaus konnte, im Gegensatz zu normoxischen Bedingungen, unter einem Sauerstoffgehalt von 4% sowohl nach sieben, als auch nach vierzehn Tagen kein dreidimensionales Zellwachstum vermerkt werden (Abb. 1.1.1 A, B). Die Proliferation unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt verlief über den gesamten Kultivierungszeitraum sehr langsam und stagnierte zum Ende der hypoxischen Kultivierung (Abb. 1.1.1 C). Der Stillstand der Proliferation unter physiologischen Bedingungen war mit einem  $P^{**} < 0,025$  (sieben Tage) bzw.  $P^{***} < 0,01$  (vierzehn Tage) statistisch signifikant von der Kontrolle verschieden (Abb. 1.1.1 C). Die Reduktion der Proliferation konnte auch anhand von Zellzyklus-Analysen nachgewiesen werden. So wiesen nach 14 Tagen der hypoxischen Kultivierung direkt konvertierte hES Zellen weniger Zellen in der Synthese-Phase des Zellzyklus auf als Kontrollzellen (Abb. 1.1.1 C, Einschub). Des Weiteren konnte, im Vergleich zu differenzierenden Kontrollen, unter einem Sauerstoffgehalt von 4% ein leicht erhöhter Anteil an apoptotischen Zellen über den gesamten Differenzierungszeitraum detektiert werden (Abb. 1.1.1 D; 7 Tage: 4%:  $6,51 \pm 1,62$ ; 21%:  $1,62 \pm 1,44$ ; 14 Tage: 4%:  $8,33 \pm 5,71$ ; 21%:  $1,89 \pm 0,39$ ).



**Abb. 3.3.1.1 Die Differenzierung von hES Zellen unter einem Sauerstoffgehalt von 4% verursacht eine Stagnation der Proliferation.** Differenziert man hES Zellen unter physiologischen Bedingungen, so verlangsamt sich die Proliferation (A, B, C). Der Anteil an Zellen, die den Apoptose-Marker Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche präsentieren, ist unter hypoxischen Bedingungen leicht erhöht (D).

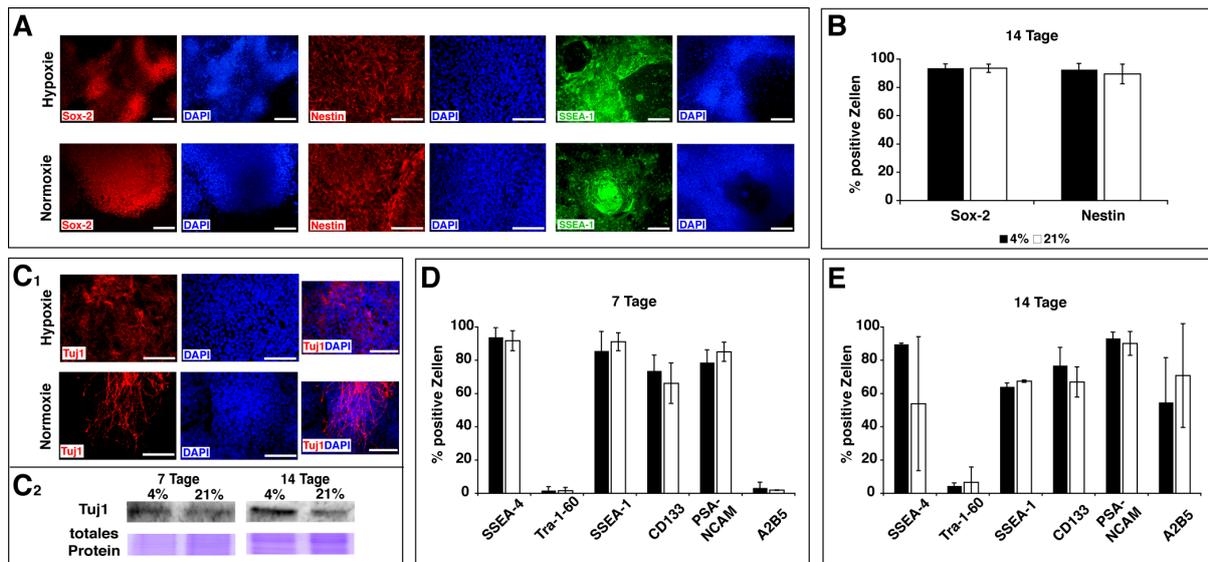
hES Zellen wurden auf Matrigel<sup>®</sup> in einer definierten Dichte von  $2,0 \times 10^4$  Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät und in Differenzierungsmedium unter Entzug des Wachstumsfaktors bFGF und Supplementierung des BMP-Antagonisten Noggin differenziert. Die Zellzahl wurde anschließend nach sieben und nach vierzehn Tagen Differenzierung mit Hilfe von Trypanblau-Färbung erhoben (C). Die Anzahl an apoptotischen Zellen wurde nach sieben und vierzehn Tagen durchflusszytometrisch bestimmt (D). Zelldubletten und Zelldebris wurden über Gating nach Granularität und Größe von der Analyse ausgeschlossen. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte an einem Phasenkontrastmikroskop. Bilder stellen repräsentative differenzierte hES Zellen für 4% und 21% Sauerstoff und die beschriebenen Differenzierungszeitpunkte dar (A, B). Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (C, D) aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. T-Tests zeigten statistisch signifikante Unterschiede mit  $**P < 0,025$  und  $***P < 0,01$ . Maßstab (A, B) =  $100 \mu\text{m}$ .

Fasst man die präsentierten Daten zusammen, so kann festgestellt werden, dass eine direkte Differenzierung von hES Zellen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt möglich ist. Die direkte Konversion unter hypoxischen Bedingungen führt jedoch zu einer veränderten Morphologie und zu einer Stagnation der Proliferation. Die Stagnation der Proliferation, bzw. die gesunkene Zellzahl kann jedoch nicht durch die erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen erklärt werden.

### 3.3.2 Differenzierungsverhalten und Multipotenz von direkt konvertierten hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen

Die vorab präsentierten Daten lassen vermuten, dass hypoxisch differenzierte Zellen im Gegensatz zu normoxisch konvertierten hES Zellen langsamer in eine andere Zellpopulationen ausreifen. Vor diesem Hintergrund wurden quantitativ die Differenzierung und die Differenzierungsrichtung der unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt direkt konvertierten hES Zellen erfasst. Im folgenden Experiment wurde immunzytochemisch die Expression der neuralen Stammzellmarker Nestin und Sox-2 und des Differenzierungsmarker Tuj1 (junge Neurone) analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass hypoxisch differenzierte hES Zellen sowohl nach einem Differenzierungszeitraum von einer als auch nach zwei Wochen die Marker Nestin und Sox-2 exprimierten (Abb. 3.4.2.1 A). Deutlich wurde jedoch, dass es im Vergleich zu Kontrollen unter hypoxischen Bedingungen keinen Unterschied in den Anteilen an Zellen, die Sox-2 oder Nestin exprimierten, gab (Abb. 3.4.2.1 B). Eine Quantifizierung der Expression von SSEA-1 konnte aufgrund der zum Teil diffusen und schwer abgrenzbaren Färbung mikroskopisch nicht durchgeführt werden (Abb. 3.4.2.1 A). Für den frühen neuronalen Marker Tuj1 konnte aufgrund des stark dreidimensionalen Wachstums normoxischer und einer hohen Hintergrundfärbung hypoxisch differenzierter hES Zellen nur schwer ein quantitatives Urteil über den Anteil an Zellen, die Tuj1 exprimierten, gebildet werden (Abb. 3.4.2.1 C1). Mit Hilfe von proteinbiochemischen Analysen konnte jedoch für Tuj1, im Vergleich zu normoxisch differenzierten Kontrollen bei einer hypoxischen Differenzierung ein erhöhter Tuj1-Proteinanteil festgestellt werden (Abb. 3.4.2.1 C1, C2; Proteinratio [%]: Tuj1: 7 Tage: 4%: 85,32±27,74%; 21%: 44,07±13,10%; 14 Tage: 4%: 86,43±25,93%; 21% 44,28±20,66% [n=3, STERR]; Diagramm nicht gezeigt). Ergänzend wurden durchflusszytometrische Analysen auf Pluripotenz- (SSEA-4, Tra-1-60), Multipotenz- (SSEA-1, CD133, PSA-NCAM) und Differenzierung-assoziierte (PSA-NCAM, A2B5) Oberflächenmarker durchgeführt (Abb. 3.4.2.1 D, E). Die durchflusszytometrische Analyse ließ erkennen, dass sowohl nach sieben als auch nach vierzehn Tagen das SSEA-4 unter hypoxischen und normoxischen Differenzierungsbedingungen exprimiert wurde. Nach vierzehn Tage hypoxischer

Differenzierung zeigten hES Zellen tendenziell eine höhere SSEA-4 Expression (4%:  $89,70 \pm 0,75\%$ ) als Kontrollen ( $53,09 \pm 40,31\%$ ). Das Oberflächenantigen Tra-1-60 konnte bei beiden Sauerstoffgehalten sowohl nach sieben als auch nach vierzehn Tagen nur noch bei wenigen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.4.2.1 D, E). Unter hypoxischen Bedingungen lag die Expression von SSEA-1 über den gesamten Differenzierungszeitraum auf dem Niveau von Kontrollzellen. Für CD133 konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu einer direkten Konversion unter einem Sauerstoffgehalt von 21% bei einem Sauerstoffgehalt von 4% die CD133-Expression über den gesamten Differenzierungszeitraum leicht erhöht war (Abb. 3.4.2.1 D, E; 7 Tage: 4%:  $73,77 \pm 9,35\%$ ; 21%:  $66,17 \pm 12,17\%$ ; 14 Tage: 4%:  $76,97 \pm 10,78\%$ ; 21%:  $66,92 \pm 9,08\%$ ). Darüber hinaus konnte für PSA-NCAM kein Unterschied in der Expression festgestellt werden. Das Oberflächenantigen A2B5 zeigte hingegen, im Vergleich zu Kontrollen, nach vierzehn Tagen Differenzierung unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt tendenziell eine geringere Expression (Abb. 3.4.2.1 E; 4%:  $54,76 \pm 26,79\%$ ; 21%:  $70,84 \pm 31,20\%$ ).



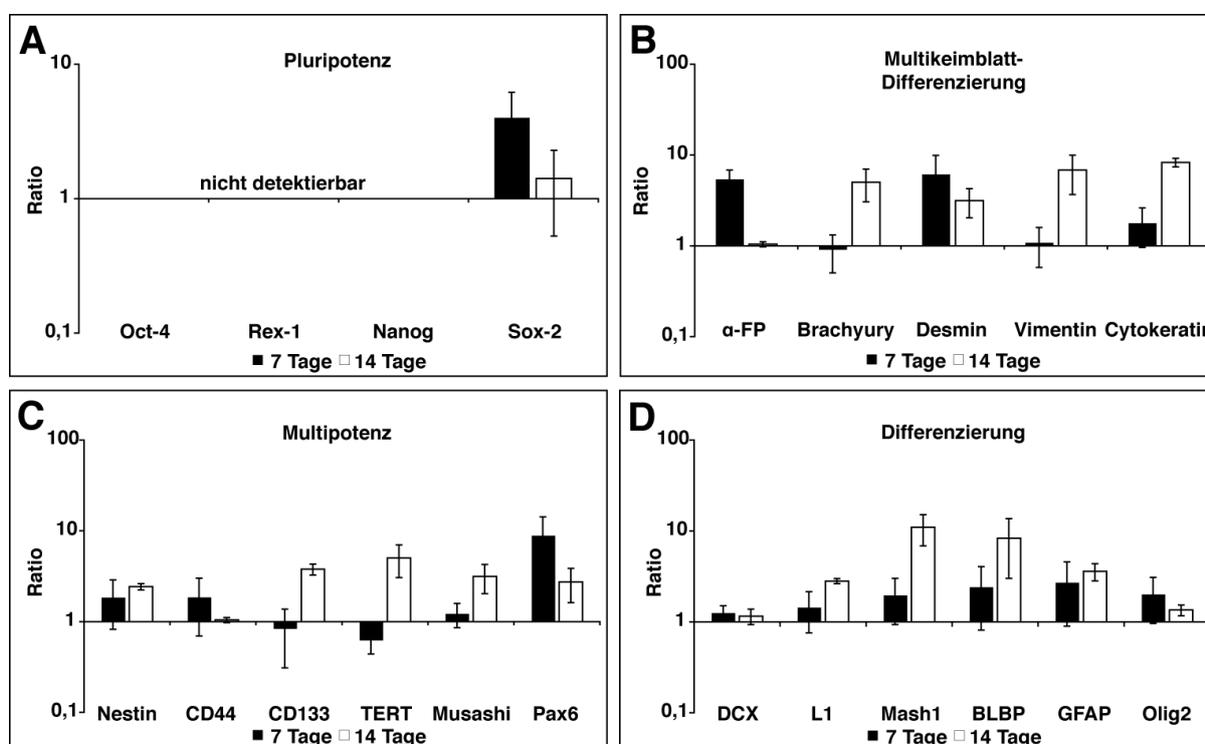
**Abb. 3.4.2.1 Eine direkte Konversion von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen hat nur einen geringen Einfluss auf den Phänotyp der Zellen.** Werden hES Zellen unter einem Sauerstoffgehalt von 4% direkt differenziert, so hat dies keinen Einfluss auf die Expression der Multipotenz-assoziierten Marker Sox-2 und Nestin (A, B). Es kann aber eine erhöhte Expression des Differenzierungs-assoziierten Markers TuJ1 gemessen werden (C). Die Expression von Pluripotenz-, Multipotenz- und Differenzierungs-assoziiierter Oberflächenantigene wird unter hypoxischen Bedingungen kaum beeinflusst (D, E).

hES Zellen wurden auf Matrigel<sup>®</sup> in einer definierten Dichte von  $2,0 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  und in Differenzierungsmedium unter Entzug des Wachstumsfaktors bFGF und Supplementierung des BMP-Antagonisten Noggin differenziert. Der Nachweis von Zellen, die Sox-2, Nestin, SSEA-1 und TuJ1 exprimierten, erfolgte über Immunocytochemie (A, B, C). Die mikroskopische Auswertung und Quantifizierung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop. An Tag sieben und vierzehn der Differenzierung wurden für Western Blot Analysen Proben genommen (C2). Die Anzahl an Zellen, die die Marker SSEA-4, Tra-1-60, SSEA-1, CD133, PSA-NCAM und A2B5 exprimierten wurde nach sieben und vierzehn Tagen durchflusszytometrisch bestimmt (D, E). Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden Zelldubletten, Zelldebris und tote Zellen über Gating nach Forward Scatter- und Sideward-Scatter sowie nach Hoechst 33258-Aufnahme von der Analyse ausgeschlossen. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop. Fluoreszenzbilder stellen repräsentative differenzierte hES Zellen für 4% und 21% Sauerstoff dar (A, C1). Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (B, D, E) aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Maßstab (A, C1) = 100  $\mu\text{m}$ .

Ergänzend zu den vorangegangenen Analysen wurde der Differenzierungsstatus von hypoxisch konvertierten hES Zellen über Erhebung der mRNA-Expression von Pluripotenz-, Multipotenz- und Differenzierungs-assoziierten Markern evaluiert (Abb. 3.4.2.2). Es konnte festgestellt werden, dass unter einem Sauerstoffgehalt von 4% nach sieben und nach vierzehn Tagen keine mRNA-Expression der Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Oct-4, Rex-1 und Nanog mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.4.2.2 A). Für den Transkriptionsfaktor Sox-2, der sowohl als Pluripotenz-, als auch neuroektodermaler Marker verwendet wird, konnte gezeigt werden, dass im Bezug auf normoxische Kontrollkulturen nach sieben Tagen der Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen eine um das Sechsfach erhöhte Expression vorlag (Abb. 3.4.2.2 A; 7 Tage:  $6,03 \pm 1,95$ ). Nach einer weiteren Woche

hypoxischer direkter Konversion lag die mRNA-Expression von Sox-2 auf dem Niveau von Kontrollzellen (14 Tage:  $1,43 \pm 1,57$ ). Die mRNA-Analyse von Mesodermal-, Ektodermal- und Entodermal-assoziierten Markern ließ erkennen, dass im Vergleich zu normoxisch differenzierten hES Zellen nach einer Woche der Differenzierung unter subatmosphärischen Bedingungen eine erhöhte Expression von  $\alpha$ -FP (Entoderm) und Desmin (Mesoderm) festgestellt werden konnte (Abb. 3.4.2.2 B; 7 Tage:  $\alpha$ -FP:  $8,04 \pm 2,74$ ; Desmin:  $6,15 \pm 0,41$ ). Dem gegenüber konnten keine mRNA-Expressionsunterschiede der mesodermalen und ektodermalen Marker Brachyury, Vimentin und Cytokeratin detektiert werden (Abb. 3.4.2.2 B). Nach vierzehn Tagen direkter Konversion unter physiologischen Bedingungen lag die Expression der Keimblattmarker Brachyury, Desmin, Vimentin und Cytokeratin deutlich über dem Niveau normoxisch differenzierter hES Zellen (Abb. 3.4.2.2 B; Brachyury:  $5,03 \pm 1,97$ ; Desmin:  $3,15 \pm 1,12$ ; Vimentin:  $6,82 \pm 3,14$ ; Cytokeratin:  $8,30 \pm 0,92$ ). Die mRNA-Expression von  $\alpha$ -FP wies hingegen keine Veränderung der Expression unter hypoxischen Bedingungen auf. Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit eine hypoxische Differenzierung von hES Zellen einen Einfluss auf die mRNA-Expression von mit neuronalen Stammzellen assoziierten Markern hat (Abb. 3.4.2.2 C). Die Analyse ergab, dass nach sieben Tagen einer hypoxischen Differenzierung kein Unterschied in der mRNA-Expression von Nestin, CD44, CD133, und Musashi detektiert werden konnte (Abb. 3.4.2.2 C). TERT (Telomerase) hingegen zeigte im Vergleich zu Kontrollen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt eine Herunterregulation ( $0,63 \pm 0,19$ ) und Pax-6 eine Heraufregulation der mRNA-Expression ( $8,90 \pm 5,38$ ). Vierzehn Tage direkte Konversion unter hypoxischen Bedingungen hatte eine Erhöhung der mRNA-Expression der Marker Nestin, CD133, TERT, Musashi und Pax6 über das Niveau von Kontrollzellen zur Folge (Abb. 3.4.2.2 C; 14 Tage: Nestin:  $2,42 \pm 0,19$ ; CD133:  $3,78 \pm 0,52$ ; TERT:  $5,03 \pm 1,97$ ; Musashi:  $3,15 \pm 1,12$ ; Pax6:  $2,74 \pm 1,12$ ). Darüber hinaus wurde evaluiert, inwieweit eine direkte Konversion unter hypoxischen Bedingungen einen Einfluss auf die Expression neuraler Differenzierungs-assoziiierter Marker hat. Es wurden folgende Marker analysiert (Abb. 3.4.2.2 D): Für die frühen neuronalen Marker DCX, L1, Mash1 und BLBP konnte im Vergleich zu Kontrollen nach einer siebentägigen

hypoxischen Differenzierung keine Änderung in der Expression festgestellt werden. Nach einer weiteren Woche der direkten Konversion unter physiologischen Bedingungen konnte eine Heraufregulation von L1 ( $2,81 \pm 0,18$ ), Mash1 ( $10,97 \pm 4,11$ ) und BLBP ( $8,34 \pm 5,34$ ) detektiert werden. Im Bezug zu Kontrollen wies der Astrozyten-assoziierte Marker GFAP nach vierzehn Tagen subatmosphärischer Differenzierung eine um das Dreifache erhöhte mRNA-Expression auf ( $3,59 \pm 0,77$ ). Im Gegensatz dazu zeigte der Oligodendrozyten-assoziierte Marker Olig2 über den gesamten hypoxischen Kultivierungszeitraum keine Änderung der Expression (Abb. 3.4.2.2 D; 7 Tage:  $2,02 \pm 1,06$ ; 14 Tage:  $1,35 \pm 0,18$ ).



**Abb. 3.4.2.2 Die Expression Multipotenz- und Differenzierungs-assoziiierter Gene wird durch eine hypoxische Differenzierung beeinflusst.** Werden hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen differenziert, so löst dies eine Marker-abhängige Heraufregulation der Expression der Multipotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Sox-2, CD44, Musashi und Nestin aus (A, C). Die Expression der Keimblatt-assoziierten Gene Brachyury, Desmin, Vimentin und Cytokeratin zeigt bei einer hypoxischen Differenzierung eine Heraufregulation (B). Eine hypoxische Differenzierung von hES Zellen löst eine verstärkte Expression neuronaler und Astrozyten-assoziiierter Marker aus (D)

hES Zellen wurden auf Matrigel<sup>®</sup> in einer definierten Dichte von  $2,0 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  und in Differenzierungsmedium unter Entzug des Wachstumsfaktors bFGF und Supplementierung des BMP-Antagonisten Noggin differenziert. An Tag 7 und 14 der Differenzierung wurden für die quantitative RT-PCR Proben genommen. Die für die hypoxische Differenzierung erhobenen Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch differenzierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten  $\pm$  Standardfehler.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass bei hypoxisch direkt konvertierten hES Zellen im Vergleich zu Kontrollen auf Basis der immunzytochemischen Daten keine eindeutige Veränderung des Phänotyps festgestellt werden konnte. Im Bezug auf normoxische Kontrollkulturen, zeigten hypoxisch konvertierte hES Zellen jedoch eine verstärkte neuronale Differenzierung, welches sich durch die erhöhte Expression von Tuj1 auf Protein-Ebene zeigte, sowie die erhöhte Expression von L1, Mash1 und BLBP auf mRNA-Ebene. Im Kontrast dazu steht die erhöhte Expression der mit dem neuralen Vorläuferzellstadium verbundenen Marker wie Nestin, CD133, Musashi und Pax6. Darüber hinaus auch die erhöhte Expression Keimblatt-assoziiierter Marker wie Brachyury, Desmin, Vimentin oder auch Cytokeratin.

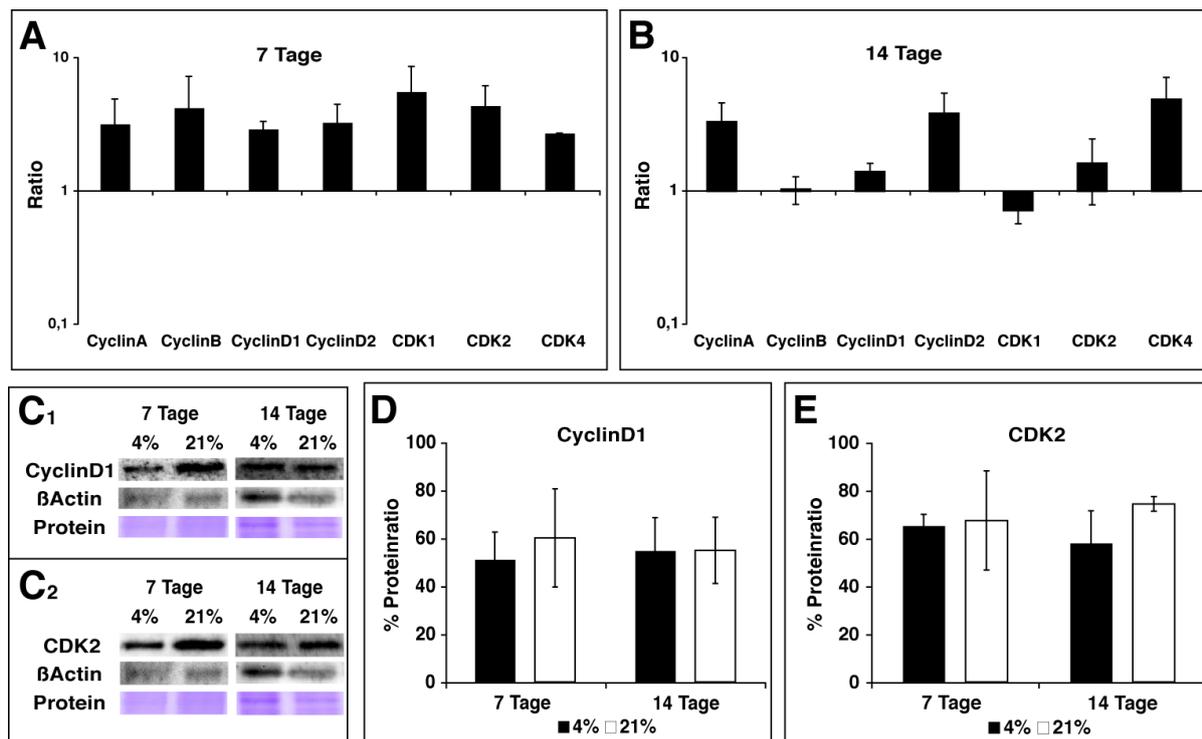
Tendenziell zeigten hypoxisch differenzierte hES Zellen jedoch eine erhöhte neuronale Identität, die durch die erhöhte Expression von Tuj1 auf Protein-Ebene und die erhöhte Expression von L1, Mash1 und BLBP auf mRNA-Ebene unterstützt wird. Im Kontrast dazu steht die erhöhte Expression der Multipotenz-assoziierten Marker Nestin, CD133, TERT, Musashi und Pax6 und die erhöhte Expression der Keimblatt-assoziierten Marker.

### **3.3.3 Kein Einfluss einer hypoxischen Differenzierung auf die Proteinexpression Zellzyklus-assoziiierter Proteine**

Die vorab generierten Daten zur Proliferation direkt konvertierter hES Zellen lassen vermuten, dass die Transition von Zellen durch die einzelnen Phasen des Zellzyklus bei der Differenzierung von hES Zellen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt beeinflusst wird. Zur Bestätigung der Hypothese wurde in ersten Analysen auf mRNA-Ebene über quantitative RT-PCR die Expression Zellzyklus-assoziiierter Marker in hypoxisch differenzierten hES Zellen analysiert. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu normoxisch differenzierten Kontrollen nach sieben Tagen Differenzierung unter physiologischen Sauerstoffbedingungen alle Zellzyklus-assoziierten Marker heraufreguliert waren (Abb. 3.3.3.1 A). Nach weiteren sieben Tagen der hypoxischen Differenzierung wiesen nur noch die Marker CyclinA ( $3,37 \pm 1,31$ ), CyclinD1 ( $1,41 \pm 0,22$ ), CyclinD2 ( $3,90 \pm 1,64$ ) und CDK4 ( $5,00 \pm 2,31$ ) eine

---

konstante Heraufregulation auf. Die Marker CyclinB und CDK2 zeigten keine Veränderung in der mRNA-Expression im Bezug auf Kontrollen (Abb. 3.3.3.1 B). Die Expression von CDK1 lag im Gegensatz dazu unter dem Niveau normoxisch differenzierter hES Zellen (Abb. 3.3.3.1 B; CDK1:  $0,71 \pm 0,15$ ). Auf Protein-Ebene konnte im Vergleich zu Kontrollen für CyclinD1 nach sieben Tagen unter 4% Sauerstoff eine leichte Herunterregulation der Protein-Expression beobachtet werden. Wurden hES Zellen über einen Zeitraum von zwei Wochen unter einem hypoxischen Sauerstoffgehalt differenziert, so konnte kein Unterschied in der Protein-Expression mehr festgestellt werden (Abb. 3.3.3.1 C1, D). Der Zellzyklusmarker CDK2 zeigte im Vergleich zu normoxisch konvertierten hES Zellen nur zum Ende des hypoxischen Konvertierungszeitraums eine leichte Reduktion in der Protein-Expression (Abb. 3.3.3.1 C2, E; 4%:  $58,05 \pm 13,40$ ; 21%:  $74,29 \pm 3,05$ ).

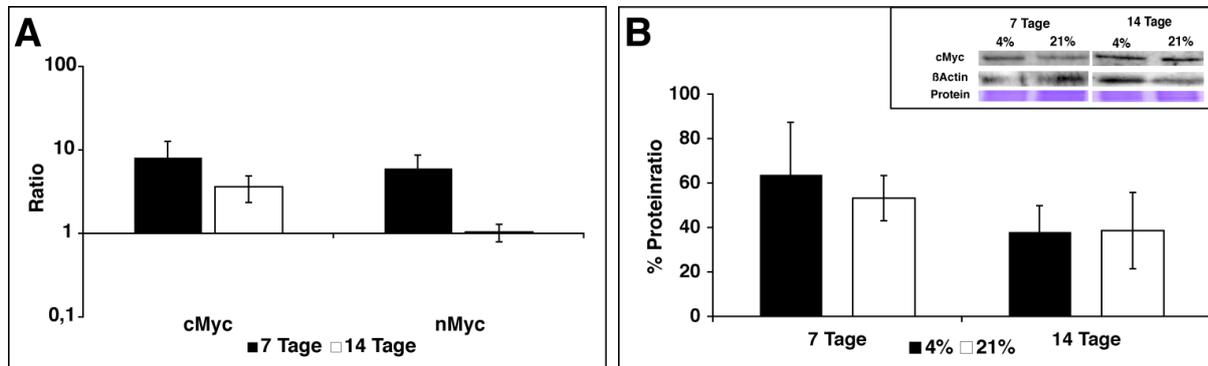


**Abb. 3.4.3.1 Die Expression Zellzyklus-assoziiierter Gene und Proteine wird durch eine hypoxische Differenzierung nur auf mRNA-Ebene beeinflusst.** Werden hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen differenziert, so löst dies eine Marker-abhängige Herauf- oder Herunterregulation der Expression Zellzyklus-assoziiierter Marker auf mRNA-Ebene aus (A, B). Auf Protein-Ebene (C, D, E) hat eine Differenzierung unter physiologischen Bedingungen keinen Effekt auf die Expression des Zellzyklus-assoziierten Marker CyclinD1 (C1, D) und nur eine leichte Reduktion der Proteinexpression von CDK2 (C2, D).

hES Zellen wurden auf Matrigel<sup>®</sup> in einer definierten Dichte von  $2,0 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  und in Differenzierungsmedium unter Entzug des Wachstumsfaktors bFGF und Supplementierung des BMP-Antagonisten Noggin differenziert. An Tag 7 und 14 der Differenzierung wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Proben genommen. Die für die hypoxische Differenzierung erhobenen qPCR Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch differenzierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A, B). Die erhobenen quantitativen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ<sup>®</sup> über Normalisierung der Bandenstärke des entsprechenden Proteins auf den Gesamtproteingehalt bezogen (D, E). Die gezeigten Western Blots (C) sind repräsentativ für alle durchgeführten Versuche ( $n=3$ ). Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, B, D, E) aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Zusätzlich wurden die direkt mit der G1/S-Transition assoziierten Signalwegs-Zielgene cMyc und nMyc sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene analysiert. Es zeigte sich, dass die mRNA-Expression von cMyc im Vergleich zu Kontrollen unter hypoxischen Bedingungen sowohl nach sieben als auch nach vierzehn Tagen erhöht war (Abb. 3.3.3.2 A; cMyc: 7 Tage:  $8,14 \pm 4,56$ ; 14 Tage:  $3,61 \pm 1,27$ ). Für nMyc konnte eine erhöhte mRNA-Expression nur nach sieben Tagen festgestellt werden ( $6,05 \pm 2,62$ ). Auf Protein-Ebene konnte nach einer Woche der direkten Konversion von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Expression von cMyc detektiert werden (Abb. 3.3.3.2 B; 7 Tage: 4%:  $63,82 \pm 23,55\%$ ; 21%:  $53,16 \pm 10,16\%$ ).

Die erhöhte Expression von cMyc sank nach zwei Wochen unter 4% Sauerstoff auf das Niveau von Kontrollzellen ab.



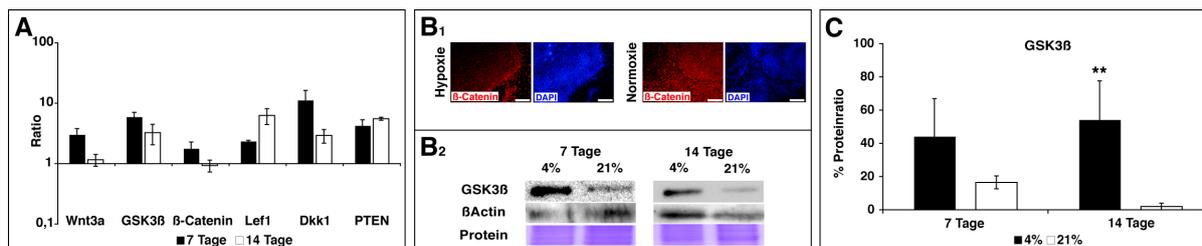
**Abb. 3.4.3.2 Die Expression der Zellzyklus-assoziierten Onkogene cMyc und nMyc wird durch eine hypoxische Differenzierung nur auf mRNA-Ebene beeinflusst.** Werden hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so löst dies eine Heraufregulation der Expression der Zellzyklus-assoziierten Marker cMyc und nMyc auf mRNA-Ebene aus (A). Auf Protein-Ebene löst eine hypoxische Differenzierung von hES Zellen nur nach sieben Tagen eine erhöhte Expression von cMyc aus (B).

hES Zellen wurden auf Matrigel® in einer definierten Dichte von  $2,0 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  und in Differenzierungsmedium unter Entzug des Wachstumsfaktors bFGF und Supplementierung des BMP-Antagonisten Noggin differenziert. An Tag 7 und 14 der Differenzierung wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Proben genommen. Die für die hypoxische Differenzierung erhobenen qPCR Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch differenzierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A, B). Die erhobenen quantitativen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ® über Normalisierung der Bandenstärke des entsprechenden Proteins auf den Gesamtproteingehalt bezogen (D, E). Der gezeigte Western Blot (B) ist repräsentativ für alle durchgeführten Versuche ( $n=3$ ). Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, B) aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine hypoxische Differenzierung eine Heraufregulation Zellzyklus-assoziiierter mRNA verursacht. Darüber hinaus konnte unter hypoxischen Bedingungen keine Änderung der Expression des mit der G1/S-Transition-assoziierten Proteins CyclinD1 detektiert werden. Die direkten Zellzyklus-Signalwegszielgene cMyc und CyclinD1 wiesen unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Expression auf, welche kontrovers zu den Daten aus der Wachstumsanalyse steht. Die vorangegangenen Daten können nicht die verlangsamte Proliferation von unter physiologischen Bedingungen differenzierten hES Zellen erklären. Vermutlich wird unter hypoxischen Bedingungen die Proliferation über andere Zellzyklus-assoziierte Signalwege reprimiert.

### **3.3.4 Eine direkte Konversion unter einem Sauerstoffgehalt von 4% hat eine erhöhte Expression von GSK3 $\beta$ zur Folge**

Der Wnt-Signalweg ist ein wichtiger Signalweg, der regulatorisch in die Entwicklung der Neuralleiste eingebunden ist (Dorsky et al. 2000; Abu-Khalil et al. 2004). Inwieweit der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in hypoxisch direkt konvertierten hES Zellen reguliert ist, wurde im Folgenden evaluiert (Abb. 3.3.4.1). Ein erster Hinweis auf eine erhöhte GSK3 $\beta$ -Aktivität unter hypoxischen Bedingungen konnte auf mRNA-Ebene festgestellt werden (Abb. 3.3.4.1 A). Wurden hES Zellen über einen Zeitraum von sieben Tagen unter physiologischen Bedingungen differenziert, so wiesen alle Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs-assoziierten Marker eine erhöhte mRNA-Expression auf (Abb. 3.3.4.1 A). Nach weiteren sieben Tagen konnte unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt nur noch eine verstärkte Expression von GSK3 $\beta$ , Lef1, Dkk und PTEN detektiert werden (Abb. 3.3.4.1 A; 14 Tage: GSK3 $\beta$ :  $3,26 \pm 1,21$ ; Lef1:  $6,27 \pm 1,84$ ; Dkk1:  $2,93 \pm 0,74$ ; PTEN:  $5,55 \pm 0,32$ ). Die Expression von Wnt3a und  $\beta$ -Catenin bewegte sich größenordnungsmäßig auf dem Niveau von Kontrollen. Immunzytochemisch konnte optisch im Vergleich zu normoxischen Kontrollen unter hypoxischen Bedingungen kein Unterschied in der  $\beta$ -Catenin Expression detektiert werden (Abb. 3.3.4.1 B1). Die proteinbiochemische Analyse von GSK3 $\beta$  ließ erkennen, dass im Vergleich zu normoxisch differenzierten Kontrolle für hypoxisch konvertierte hES Zellen eine erhöhte Expression von GSK3 $\beta$  sowohl nach einer als auch nach zwei Wochen festgestellt werden konnte (Abb. 3.3.4.1 B2, C; 7 Tage: 4%:  $44,10 \pm 22,84\%$ ; 21%:  $16,51 \pm 3,88\%$ ; 14 Tage: 4%:  $54,09 \pm 23,46\%$ ; 21%:  $1,99 \pm 1,98\%$ ). Die erhöhte Proteinexpression von GSK3 $\beta$  nach zwei Wochen hypoxischer Differenzierung war mit einem  $P^{**} < 0,025$  statistisch signifikant von der Kontrolle verschieden (Abb. 3.3.4.1 C).



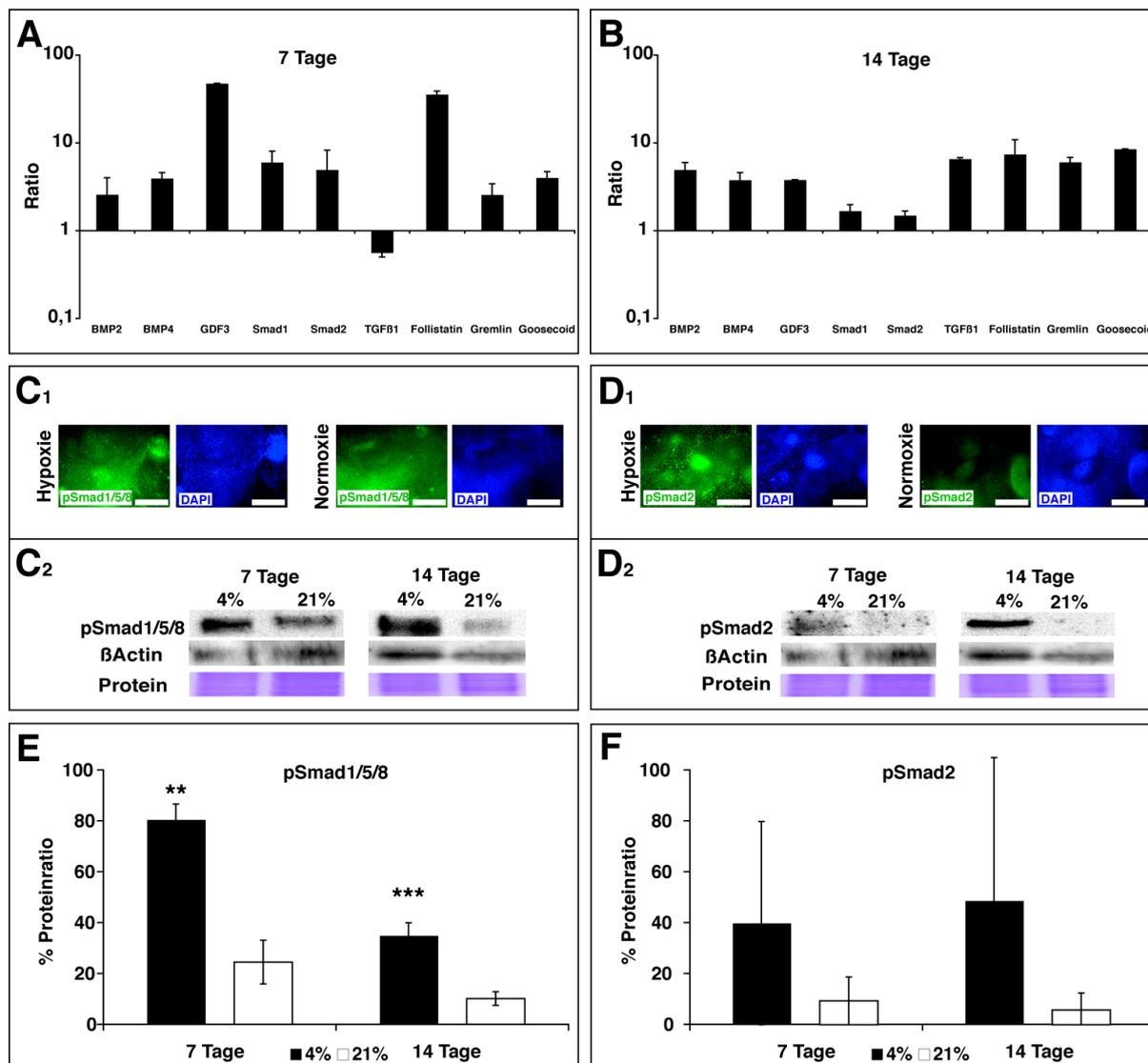
**Abb. 3.4.4.1 Eine hypoxische direkte Konversion löst eine erhöhte Expression des  $\beta$ -Catenin-Signaltransduktions-Repressors GSK3 $\beta$  aus.** Werden hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen differenziert, so löst dies eine Heraufregulation von Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-assoziierten Markern auf mRNA-Ebene aus (A). Auf Proteinebene (B, C) löst eine hypoxische Kultivierung eine erhöhte Expression von GSK3 $\beta$  aus (B2, C)

hES Zellen wurden auf Matrigel® in einer definierten Dichte von  $2,0 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  und in Differenzierungsmedium unter Entzug des Wachstumsfaktors bFGF und Supplementierung des BMP-Antagonisten Noggin differenziert. An Tag 7 und 14 der Differenzierung wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Proben genommen. Die für die hypoxische Differenzierung erhobenen qPCR Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch differenzierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A). Die erhobenen quantitativen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ® über Normalisierung der Bandenstärke des entsprechenden Proteins auf den Gesamtproteingehalt bezogen (C). Fluoreszenzbilder (B1) stellen repräsentative differenzierte hES Zellen für 4% und 21% Sauerstoff dar. Der gezeigte Western Blot (B2) ist repräsentativ für alle durchgeführten Versuche ( $n=3$ ). Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, C) aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. T-Tests zeigen statistisch signifikante Unterschiede mit  $**P < 0,025$ . Maßstab (B1) =  $100 \mu\text{m}$ .

Abschließend lässt sich sagen, dass die erhöhte GSK3 $\beta$  Expression während der hypoxischen Differenzierung durch die erhöhte mRNA-Expression der Signalweg-assoziierten Marker GSK3 $\beta$ , Dkk1 und PTEN bestätigt werden konnte. Im Gegensatz dazu steht aber die erhöhte Expression von Lef1 und der direkten  $\beta$ -Catenin-Signalwegzielgene cMyc und CyclinD1. Dem gegenüber unterstützt die auf Proteinebene gemessene erhöhte GSK3 $\beta$ -Expression die Hypothese, dass eine hypoxische direkte Konversion die  $\beta$ -Catenin-Signalwegstransduktion und dadurch auch vermutlich die Proliferation der differenzierenden hES Zellen reprimiert. Darüber hinaus spricht auch die erhöhte Expression der Keimblatt-assoziierten Marker für eine Unterdrückung der  $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion. Zusätzlich kann die erhöhte Apoptose über eine erhöhte Präsenz von GSK3 $\beta$  erklären.

### **3.3.5 Induktion der TGF $\beta$ /BMP-assoziierten Proteine Smad1/5/8 und Smad2 während der direkten Konversion unter hypoxischen Bedingungen**

Die Aktivierung des BMP-Signalweges nimmt eine wichtige Rolle in der Differenzierung der Neuralleiste während der Embryonalentwicklung ein (Dorsky et al. 2000). Vor diesem Hintergrund wurde im Folgenden der TGF $\beta$ /BMP-Signalweg während der direkten Konversion von hES Zellen unter Supplementierung des BMP-Inhibitors Noggin unter hypoxischen Bedingungen analysiert. Im Vergleich zu Kontrollen wiesen hES Zellen, die unter einem Sauerstoffgehalt von 4% differenziert worden waren, nach sieben Tagen eine erhöhte Expression TGF $\beta$ /BMP-Signalweg-assoziiierter Marker, mit Ausnahme von TGF $\beta$ 1 auf (Abb. 3.3.5.1 A). Nach einer weiteren Woche einer hypoxischen Differenzierung zeigten alle Marker eine erhöhte mRNA-Expression (Abb. 3.3.5.1 B). Es war jedoch auffällig, dass immunzytochemisch sowohl unter Hypoxie als auch Normoxie, trotz Zugabe des BMP-Inhibitors Noggin, die Signaltransduktionsproteine Smad1/5/8 und Smad2 in ihrer aktiven Form (pSmad1/5/8; pSmad2) nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.3.5.1 C1, D1). Dabei konnte optisch der Eindruck gewonnen werden, dass unter hypoxischen Bedingungen die Expression von pSmad1/5/8 und pSmad2 stärker war als unter normoxischen Bedingungen. Proteinbiochemische Analysen konnten diese Beobachtung bestätigen. Eine direkte Konversion unter einem Sauerstoffgehalt von 4% führte zu einer erhöhten Phosphorylierung von Smad1/5/8, sowohl nach sieben, als auch nach vierzehn Tagen der Differenzierung (Abb. 3.3.5.1 C2, E; 7 Tage: 4%:  $80,52 \pm 6,09\%$ ; 21%:  $24,49 \pm 8,58\%$ ; 14 Tage: 4%  $34,95 \pm 5,00\%$ ; 21%:  $10,13 \pm 2,67\%$ ). Die während der hypoxischen Differenzierung erhöhte pSmad1/5/8-Aktivität war mit einem  $P^{**} < 0,025$  (sieben Tage) und  $P^{***} < 0,001$  (vierzehn Tage) statistisch signifikant von der Kontrolle verschieden (Abb. 3.3.5.1 E). Für Smad2 konnte tendenziell eine erhöhte Phosphorylierung unter einem Sauerstoffgehalt von 4% festgestellt werden. Deutlich wurde jedoch, dass die Varianz in der Expression sehr hoch war, so dass keine statistische Aussage getroffen werden konnte (Abb. 3.3.5.1 D, F).



**Abb. 3.4.5.1 Der BMP-Signalweg wird durch eine Differenzierung von hES Zellen unter einem Sauerstoffgehalt von 4% induziert.** Werden hES Zellen unter physiologischen Bedingungen differenziert, so löst dies auf mRNA-Ebene eine Heraufregulation Signalweg-assoziiierter Marker aus (A, B). Auf Protein-Ebene kann eine erhöhte Phosphorylierung der Signaltransduktionsmarker Smad1/5/8 und Smad2 detektiert werden (C2, E, D2, F)

hES Zellen wurden auf Matrigel® in einer definierten Dichte von  $2,0 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  und in Differenzierungsmedium unter Entzug des Wachstumsfaktors bFGF und Supplementierung des BMP-Antagonisten Noggin differenziert. An Tag 7 und 14 der Differenzierung wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Proben genommen. Die für die hypoxische Differenzierung erhobenen qPCR Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch kultivierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A, B). Die erhobenen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ und über Normalisierung der Bandenstärke auf den Gesamtproteingehalt bezogen (C2, D2, E, F). Immunzytochemische Bilder und Western Blots (C, D) stellen repräsentative Bilder für die jeweiligen Kultivierungsbedingungen dar. Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, B, E, F) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. T-Tests zeigen statistisch signifikante Unterschiede mit  $**P < 0,025$  und  $***P < 0,01$ . Maßstab (C1, D1) =  $100\mu\text{m}$ .

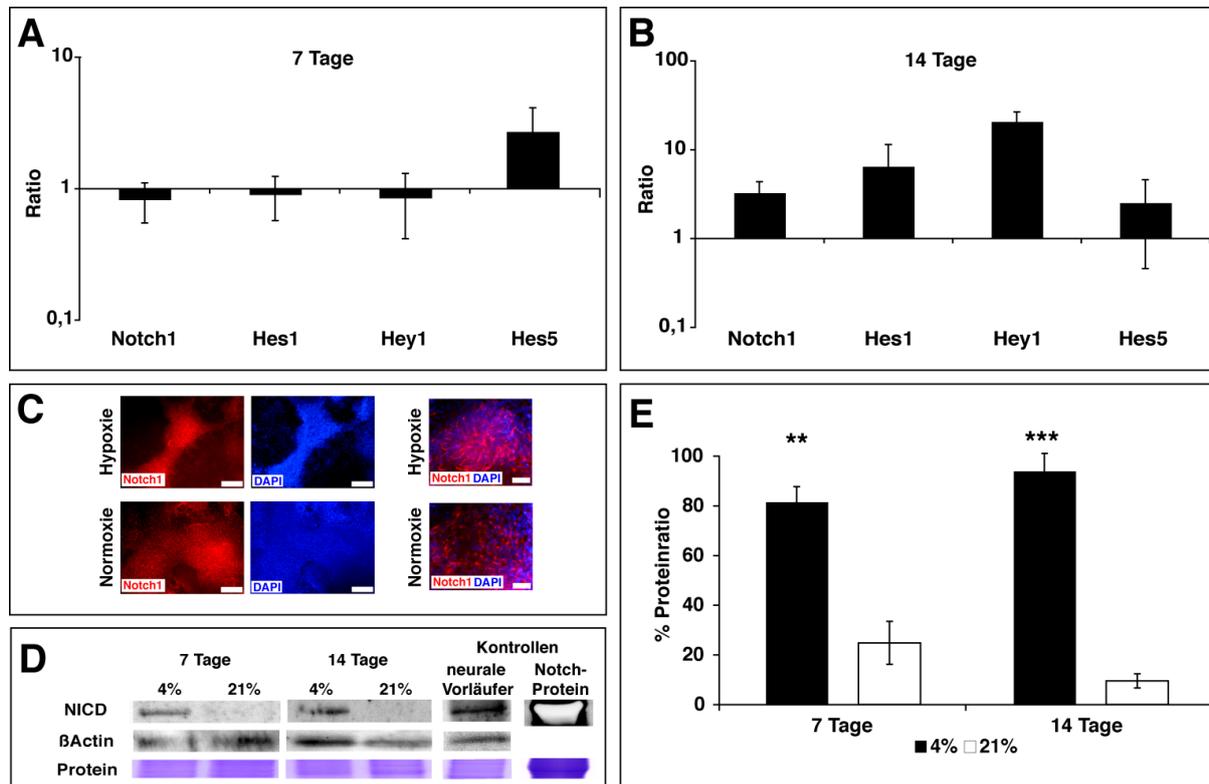
Zusammenfassend zeigen die Daten, dass während einer hypoxischen Differenzierung der TGFβ/BMP-Signalweg trotz Zugabe des Signalwegs-Inhibitors Noggin nicht unterdrückt werden konnte. Die erhöhte Aktivität des BMP-Signalweges

unter physiologischen Bedingungen konnte durch die erhöhte Präsenz von pSmad1/5/8 und die erhöhte mRNA-Expression mesodermaler und entodermaler Marker bestätigt werden.

### **3.3.6 Stabilisierung der gespaltenen Notch-intrazellulären Domäne während der direkten Konversion unter hypoxischen Bedingungen**

Dem Notch-Signalweg wird eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des multipotenten Stadiums von verschiedensten Vorläuferzellen zugeordnet. Darüber hinaus ist bekannt, dass in myogenen und neuronalen Vorläuferzellen die abgespaltene intrazelluläre Domäne von Notch (NICD) mit Hif1 $\alpha$  interagiert und über diesen Interaktion die Differenzierung inhibiert wird (Gustafsson et al. 2005). Inwieweit der Notch-Signalweg während der direkten Konversion von hES Zellen aktiv ist, und ob dieser unter hypoxischen Bedingungen beeinflusst wird, wurde im Folgenden auf mRNA- und Protein-Ebene analysiert (Abb. 3.2.). Die Analyse der mRNA-Expression ergab, dass im Bezug auf normoxische Bedingungen nach sieben Tagen einer direkten Konversion unter einem subatmosphärischen Sauerstoffgehalt, das direkte Notch-Signalwegszielgen Hes5 eine erhöhte Expression aufwies (Abb.3.4.6.1 A; Hes5:  $2,52\pm 1,20$ ). Die Expression der Marker Notch1, Hes1 und Hey1 unter 4% Sauerstoff lag zum Anfang der Konversion auf Kontrollzellniveau. Nach weiteren sieben Tagen der hypoxischen Differenzierung zeigten die Marker Notch1, Hes1 und Hey1 eine erhöhte Expression, wohingegen die Hes5 Expression auf dem Niveau von normoxisch differenzierten Kontrollzellen lag (Abb.3.4.6.1 B; Notch1:  $3,26\pm 1,11$ ; Hes1:  $6,48\pm 4,95$ ; Hey1:  $20,76\pm 5,79$ ). Die immunzytochemische Analyse des Notch-Rezeptors Notch1 und der Notch-Liganden Jagged und Delta ergab, dass diese unter hypoxischen Bedingungen gleich stark wie unter normoxischen Bedingungen exprimiert wurden (Abb.3.4.6.1 C). Proteinbiochemische Analysen konnte nachweisen, dass sowohl bei einer direkten Differenzierung von hES Zellen unter einem Sauerstoffgehalt von 4% als auch von 21% NICD detektiert werden konnte (Abb.3.4.6.1 D, E). Eine hypoxische Kultivierung führte jedoch sowohl nach sieben als auch nach vierzehn Tagen zu einer erhöhte

Stabilisierung von NICD (Abb.3.4.6.1 D, E). Die Stabilisierung von NICD unter physiologischen Sauerstoffbedingungen war mit  $80,52 \pm 6,09\%$  für sieben und mit  $92,77 \pm 8,10\%$  für vierzehn Tage mit einem  $P^{**} < 0,0025$  bzw.  $P^{***} < 0,001$  statistisch signifikant von der Kontrolle verschieden.



**Abb. 3.4.6.1 Die Abspaltung von NICD und Stabilisierung ist in hypoxisch differenzierten hES Zellen erhöht.** Werden hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so wird auf mRNA-Ebene die Expression von Signalwegs-assoziierten Markern verstärkt (A, B). Auf Protein-Ebene kann eine erhöhte Abspaltung der Notch-Intrazellulären Domäne detektiert werden (D, E).

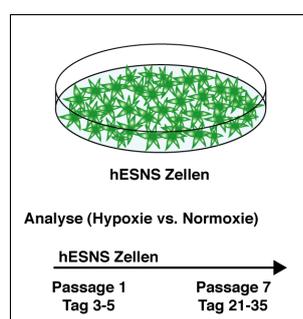
hES Zellen wurden auf Matrigel<sup>®</sup> in einer definierten Dichte von  $2,0 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  und in Differenzierungsmedium unter Entzug des Wachstumsfaktors bFGF und Supplementierung des BMP-Antagonisten Noggin differenziert. An Tag 7 und 14 der Differenzierung wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Proben genommen. Die für die hypoxische Differenzierung erhobenen qPCR Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch kultivierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A, B). Die erhobenen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ und über Normalisierung der Bandenstärke auf den Gesamtproteingehalt bezogen (D, E). Immunzytochemische Bilder und Western Blots (C, D) stellen repräsentative Bilder für die jeweiligen Kultivierungsbedingungen dar. Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, B, E) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. T-Tests zeigen statistisch signifikante Unterschiede mit  $^{**}P < 0,025$  und  $^{***}P < 0,01$ . Maßstab (C1)= $100\mu\text{m}$ . Maßstab (C1 Notch1Dapi Überlagerung)= $25\mu\text{m}$ . Maßstab (C2, C3)= $25\mu\text{m}$ .

Die Ergebnisse des Notch-Signalweges, die Stabilisierung von NICD und die Heraufregulation direkter Signal-assoziiierter mRNAs bestätigten die Hypothese, dass eine hypoxische Kultivierung einen direkten Einfluss auf den Notch-Signalweg hat.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine direkte Konversion von hES Zellen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt eine Verlangsamung der Proliferation auslöst. Daneben löste eine adhärenz Differenzierung von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte GSK3 $\beta$ -Expression und eine erhöhte Phosphorylierung der TGF $\beta$ /BMP-Signaltransduktionsprotein-Komplex Smad1/5/8 aus. Des Weiteren erwies sich die direkte Konversion unter hypoxischen Bedingungen stabilisierend auf NICD, so dass eine erhöhte Signalwegsaktivität festgestellt werden konnte.

### 3.4 Kultivierung von hES Zell-abgeleiteten neuroepithelialen Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen

Die hypoxische Kultivierung von neuronalen Vorläuferzellen des Nervengewebes wurde anhand verschiedenster Zell- und Gewebetypen beschrieben (Morrison et al. 2000; Studer et al. 2000; Shin et al. 2006; Pistollato et al. 2007). Welche Auswirkungen eine Kultivierung unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt auf aus humanen ES Zellen differenzierte neuroepitheliale Zellen (hESNS Zellen; Zhang et al. (2001) und Koch et al. (2009)) hat, sollte in den folgenden Experimenten verifiziert werden (Abb.3.4). Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob eine hypoxische Kultivierung von hESNS Zellen Differenzierungs-induzierend wirkt und inwieweit die vorangegangenen beschriebenen Signalwege beeinflusst werden.



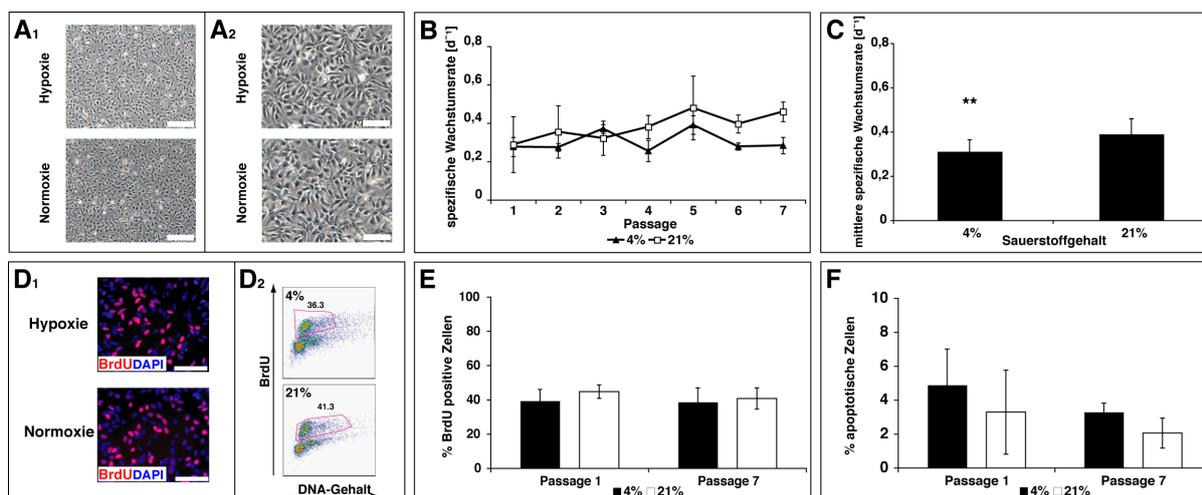
**Abb. 3.4 Zeitverlauf der normoxischen und hypoxischen Kultivierung von hESNS Zellen.**

Die Analyse der hESNS Zellen erfolgte nach einer und sieben Passage unter den jeweiligen Sauerstoffbedingungen, welches etwa Tag 3-5 (Passage 1) und Tag 21-35 (Passage 7) der Kultivierung entspricht.

### **3.4.1 Eine Kultivierung von neuroepithelialen Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen hat eine leichte Reduktion der Proliferation zur Folge**

Eine erste qualitative Evaluierung des Effektes einer Kultivierung von hESNS Zellen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt erfolgte über die morphologische Beurteilung. Wurden hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so konnten optisch keine morphologischen Unterschiede detektiert werden (Abb.3.5.1.1 A). Zur Quantifizierung der Proliferation unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt wurden zunächst die spezifischen Wachstumsraten unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen erhoben. Die Kultivierung von hESNS Zellen hatte im Vergleich zu Kontrollen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt zu Beginn (Passage 1, 3-5 Tage) keine Änderung in der spezifischen Wachstumsrate zur Folge (Abb.3.5.1.1 B). Die spezifische Wachstumsrate der hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen sank aber mit zunehmender Kultivierungsdauer (Passage 7, 21-35 Tage) auf  $0,292 \pm 0,04 d^{-1}$  ab und war damit durchschnittlich  $0,176 d^{-1}$  langsamer als normoxische Kontrollen (Abb.3.5.1.1 B; 21%:  $0,468 \pm 0,05 d^{-1}$ ). Die verlangsamte Proliferation unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt wurde jedoch erst durch die Erhebung der mittleren spezifischen Wachstumsrate deutlich. Gemittelt über den gesamten Kultivierungszeitraum konnte unter physiologischen Bedingungen eine statistisch signifikante verlangsamte Proliferation der hESNS Zellen im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden (Abb.3.5.1.1 C; 4%:  $0,312 \pm 0,05 d^{-1}$ ; 21%:  $0,39 \pm 0,06 d^{-1}$ ;  $**P < 0,025$ ). Darüber hinaus wurde die Proliferation hypoxisch kultivierter hESNS Zellen über den durchflusszytometrischen Nachweis von Zellen in der Synthesephase des Zellzyklus mit Hilfe des Thymidin-Analogon BrdU untersucht (Abb.3.5.1.1 D1, D2, E). Es konnte im Vergleich zu Kontrollen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt nur ein leichtes Absinken der Anzahl an BrdU-positiven hESNS Zellen sowohl nach einer als auch nach sieben Passagen gemessen werden (3.5.1.1 E; Passage 1: 4%:  $39,36 \pm 6,74\%$ ; 21%:  $44,82 \pm 3,97\%$ ; Passage 7: 4%:  $38,68 \pm 8,39\%$ ; 21%:  $40,83 \pm 6,19\%$ ). Um auszuschließen, dass die unter hypoxischen Bedingungen beobachtete Verminderung der Proliferation durch apoptotische Zellen verfälscht wurde, wurde

die Anzahl an apoptotischen Zellen über durchflusszytometrischen Nachweis von Phosphatidylserin erhoben (Abb.3.5.1.1 F). Die durchflusszytometrische Analyse ließ erkennen, dass im Vergleich zu konventionell kultivierten Zellen, die Kultivierung von hESNS Zellen unter einem Sauerstoffgehalt von 4% nur eine leichte aber keine statistisch signifikante Erhöhung des Anteils an apoptotischen Zellen verursachte.



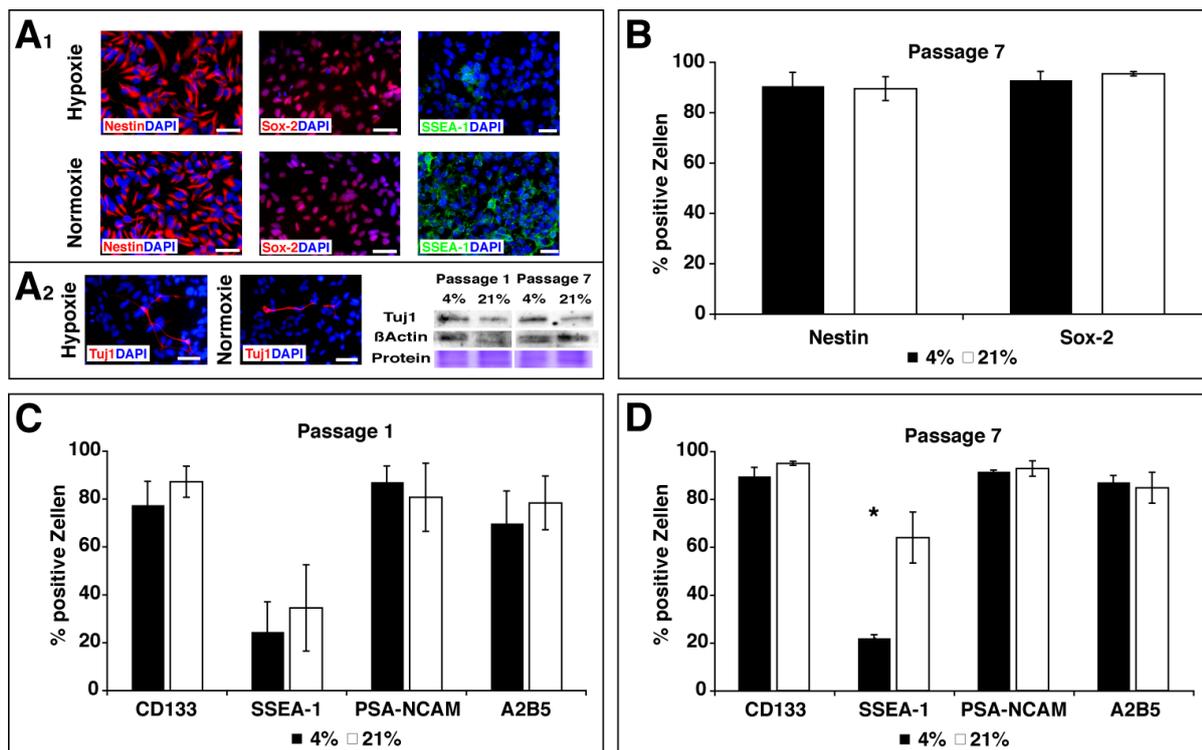
**Abb. 3.5.1.1 Die Kultivierung von neuroepithelialen Stammzellen unter einem Sauerstoffgehalt von 4% verursacht eine Verlangsamung der Proliferation.** hESNS Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert werden, weisen nach sieben Passagen der Kultivierung eine gesunkene Wachstumsrate (B, C), eine geringere Anzahl an Zellen, die BrdU inkorporieren (D1, D2, E), und einen leicht erhöhten Anteil an apoptotischen Zellen auf (F).

hESNS Zellen wurden auf Poly-Ornithin und Laminin in einer definierten Dichte von  $4,2 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät und unter Zugabe von Wachstumsfaktoren kultiviert. Die Zellzahl wurde anschließend vor jeder Passage, maximal aber über 7 Passagen mit Hilfe von Trypanblau-Färbung erhoben (B, C). Für den Nachweis von Zellen in der Synthesephase des Zellzyklus wurden hESNS Zellen für die Dauer von 3 Stunden mit  $1 \mu\text{M}$  BrdU markiert und anschließend fixiert (D1). Der Nachweis von Zellen, die BrdU inkorporiert hatten, erfolgte über Durchflusszytometrie (D2, E). Am Tag des Passagierens wurde die Anzahl an apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (F). Für die durchflusszytometrische Analyse wurden Zelldubletten und Zelldebris über Gating nach Granularität und Größe sowie nach Hoechst 33258-Aufnahme von der Analyse ausgeschlossen. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte an einem Phasenkontrast- oder Fluoreszenzmikroskop. Bilder stellen repräsentative hESNS Zellen für 4% und 21% Sauerstoff dar (A, D1). Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (B, C, E, F) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. T-Tests zeigten statistisch signifikante Unterschiede mit  $**P < 0,025$ . Maßstab (A1) =  $100 \mu\text{m}$ . Maßstab (A2) =  $50 \mu\text{m}$ .

Abschließend erwies sich eine hypoxische Kultivierung nur leicht Proliferations-reduzierend auf die hESNS Zellen, welches durch die gesunkene spezifische Wachstumsrate und die leicht gesunkene Anzahl an Zellen die BrdU inkorporiert hatten, bestätigt werden konnte.

### 3.4.2 Die Multipotenz von neuroepithelialen Zellen wird unter hypoxischen Bedingungen nicht beeinflusst

Um eine Aussage über den Multipotenz-Status von hESNS Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, treffen zu können, wurde in einem ersten Experiment die Expression Multipotenz-assoziiierter Marker (Nestin, Sox-2, SSEA-1, CD133, PSA-NCAM) und die Expression differenzierungsassoziierter Marker (Tuj1, A2B5) immunzytochemisch, durchflusszytometrisch und proteinbiochemisch analysiert (Abb.3.5.2.1). Immunzytochemisch konnte, im Bezug zu Kontrollen, bei einem niedrigen atmosphärischen Sauerstoffgehalt von 4% sowohl nach einer (3-5 Tage) als auch nach sieben Passagen (21-35 Tage) keine statistisch signifikante Reduktion in der Anzahl an Zellen, die das Intermediärfilament Nestin und den Transkriptionsfaktor Sox-2 exprimieren, festgestellt werden (Abb.3.5.2.1 A1, B). Durchflusszytometrisch konnte folgendes festgestellt werden: Über den gesamten hypoxischen Kultivierungszeitraum lag die Expression von CD133 leicht unter dem Niveau von normoxisch kultivierten hESNS Zellen (Abb.3.5.2.1 C, D). Die Expression von PSA-NCAM und A2B5 unterschied sich sowohl nach Kurzzeit- als auch nach Langzeitkultivierung unter hypoxischen Bedingungen nicht signifikant von Kontrollen (Abb.3.5.2.1 C, D). Wurden hESNS Zellen über sieben Passagen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt kultiviert, so resultierte daraus ein niedrigerer Anteil an SSEA-1 exprimierenden Zellen (Abb.3.5.2.1 C, D; SSEA-1; Passage 1: 4%: 21,48±12,40%; 21%: 31,16±17,99%; Passage 7: 4%: 22,05±1,27%; 21%: 63,93±10,67%). Die Herunterregulation des Multipotenz-assoziierten Oberflächenantigens SSEA-1 nach Langzeitkultivierung unter hypoxischen Bedingungen war mit einem \*P<0,05 statistisch signifikant von der Kontrolle verschieden. Die proteinbiochemische Analyse des frühen neuronalen Markers Tuj1 ergab, dass im Vergleich zu Kontrollen sowohl nach Kurzzeit- als auch Langzeitkultivierung von hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Expression des Markers Tuj1 detektiert werden konnte (Abb.3.5.2.1 A2 und Diagramm nicht gezeigt; Proteinratio [%]: Tuj1: Passage 1: 4%: 82,03±10,13%; 21%: 44,04±19,55%; Passage 7: 4%: 279,28±33,14%; 21% 131,63±16,20% [n=3, STERR]).

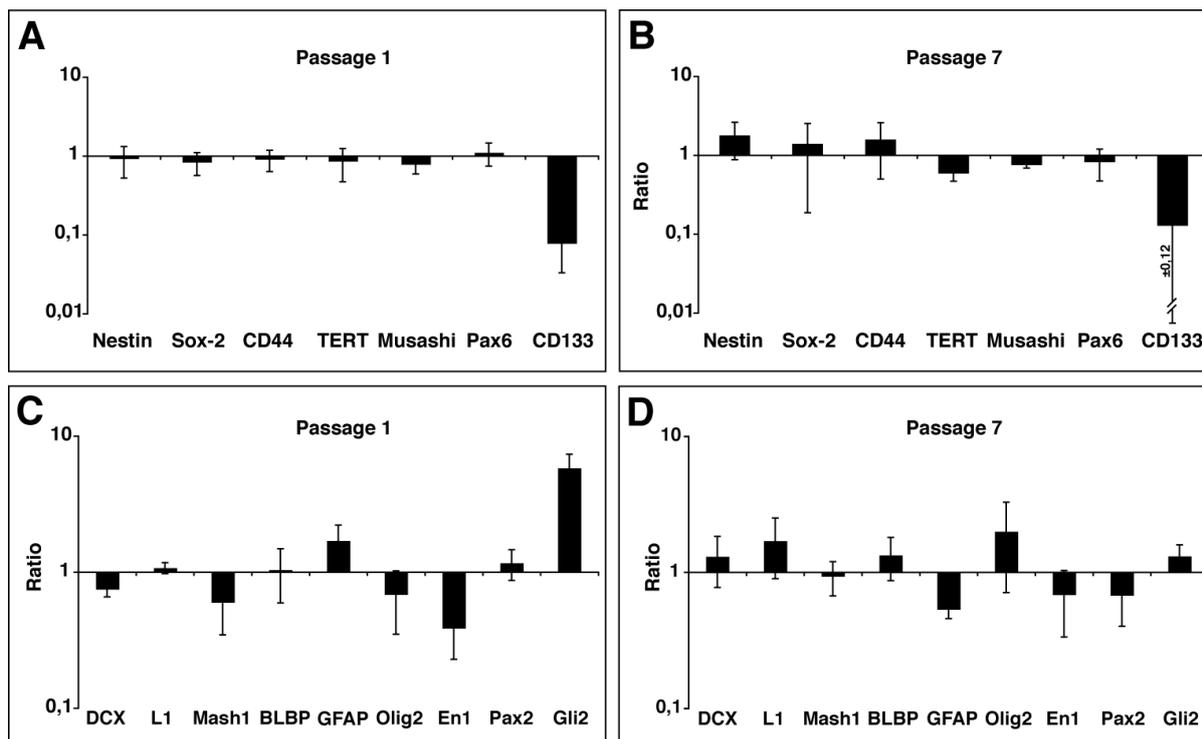


**Abb. 3.5.2.1 Eine hypoxische Kultivierung von hESNS Zellen hat nur einen geringen Einfluss auf die Expression Multipotenz-assoziiierter Marker.** Werden hESNS Zellen unter einem Sauerstoffgehalt von 4% kultiviert, so hat dies keinen Einfluss auf die Expression der Multipotenz-assoziierten Marker Nestin und Sox-2 (A1, B), aber eine erhöhte Expression des Differenzierungs-assoziierten Markers Tuj1 (A2) zur Folge. Die Expression von Multipotenz- und Differenzierungs-assoziierten Oberflächenantigenen wird unter hypoxischen Bedingungen kaum beeinflusst (C, D).

hESNS Zellen wurden auf Poly-Ornithin und Laminin in einer definierten Dichte von  $4,2 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät und unter Zugabe von Wachstumsfaktoren kultiviert. Der Nachweis von Zellen, die Nestin, Sox-2, SSEA-1 und Tuj1 exprimierten, erfolgte über Immunocytochemie (A, B). Die mikroskopische Auswertung und Quantifizierung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (A, B). Am Tag des Passagierens wurde für Western Blot Analysen Protein isoliert (A2). Die Anzahl an Zellen, die die Marker CD133, SSEA-1, PSA-NCAM und A2B5 exprimieren, wurde nach einer und sieben Passagen durchflusszytometrisch bestimmt (C, D). Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden Zelldoubletten, Zelldebris und tote Zellen über Gating nach Forward Scatter- und Sideward-Scatter sowie nach Hoechst 33258-Aufnahme von der Analyse ausgeschlossen. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (A1, A2). Fluoreszenzbilder stellen repräsentative nES Zellen für 4% und 21% Sauerstoff dar (A1, A2). Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (B) und Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. T-Tests zeigten statistisch signifikante Unterschiede mit  $*P < 0,05$ . Maßstab (A1, A2) =  $25 \mu\text{m}$ .

Die Daten, dass hypoxische Bedingungen keinen Einfluss auf die Expression von Multipotenz-assoziierten Markern (Nestin, Sox2) hatten, konnten auf mRNA-Ebene über quantitative RT-PCR bestätigt werden. hESNS Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, zeigten nach einer Passage keine Reduktion in der Expression der Multipotenz-assoziierten Marker Nestin, Sox-2, CD44, TERT, Musashi und Pax6 (Abb.3.5.2.2 A). Im Gegensatz dazu für CD133 sowohl nach einer hypoxischen Kurzzeit- als auch Langzeitkultivierung eine Herunterregulation der mRNA-Expression festgestellt

werden (Abb.3.5.2.2 A; Passage 1:  $0,08 \pm 0,05$ ; Passage 7:  $0,13 \pm 0,12$ ). Wurden hESNS Zellen weitere sechs Passagen hypoxisch kultiviert, so konnte für Nestin, Sox-2, CD44 und Pax6 keine Änderung der Expression im Vergleich zu Kontrollen detektiert werden (Abb.3.5.2.2 B). Hingegen wurde für Musashi und TERT eine Herunterregulation detektiert (Abb. B; Musashi:  $0,77 \pm 0,08$ ; TERT:  $0,60 \pm 0,13$ ). Die Analyse der mRNA-Expression Differenzierungs-assoziiierter Marker unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt ergab Folgendes: Die Expression der frühen neuronalen Marker DCX, L1, Mash1 und BLBP zeigten eine Marker-abhängige Herunterregulation oder lagen auf dem Niveau normoxisch kultivierter Kontrollzellen (Abb.3.5.2.2 C; DCX:  $0,74 \pm 0,09$ ; L1:  $1,07 \pm 0,09$ ; Mash1:  $0,59 \pm 0,25$ ; BLBP:  $1,03 \pm 0,44$ ). Der Astrozyten-assoziierte Marker GFAP wies nach einer Passage unter physiologischen Bedingungen eine leichte Heraufregulation auf ( $1,69 \pm 0,51$ ). Die Expression von Olig2 (Oligodendrozyten-assoziiierter Marker) hingegen lag unter dem Expressionslevel von normoxischen Kontrollen ( $0,69 \pm 0,33$ ). Die regionalspezifischen Marker En1 und Pax2 (Mesencephalon/Metenzephalon) zeigten im Bezug zu Kontrollen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt eine Herunterregulation oder keine Änderung der mRNA-Expression. Gli2 (Neuralleiste) wies nach Kurzzeitkultivierung unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte mRNA-Expression auf. Nach Langzeitkultivierung unter hypoxischen Bedingungen konnte detektiert werden, dass die mRNA-Expression von DCX, L1, Mash1 und BLBP auf dem Expressionsniveau von normoxisch kultivierten Kontrollen lag (Abb.3.5.2.2 D; DCX:  $1,29 \pm 0,52$ ; L1:  $1,68 \pm 0,79$ ; Mash1:  $0,92 \pm 0,26$ ; BLBP:  $1,32 \pm 0,46$ ). Für GFAP konnte eine Herunterregulation der mRNA-Expression detektiert werden ( $0,53 \pm 0,08$ ). Im Vergleich zu Kontrollen zeigte Olig2 eine hohe Varianz in der mRNA-Expression, welche im Mittel auf Kontrollzellebene lag ( $1,97 \pm 1,27$ ). En1, Pax2 und Gli2 zeigten in Relation zu Kontrollen eine Marker-abhängige Herunterregulation oder keine Veränderung in der mRNA-Expression.



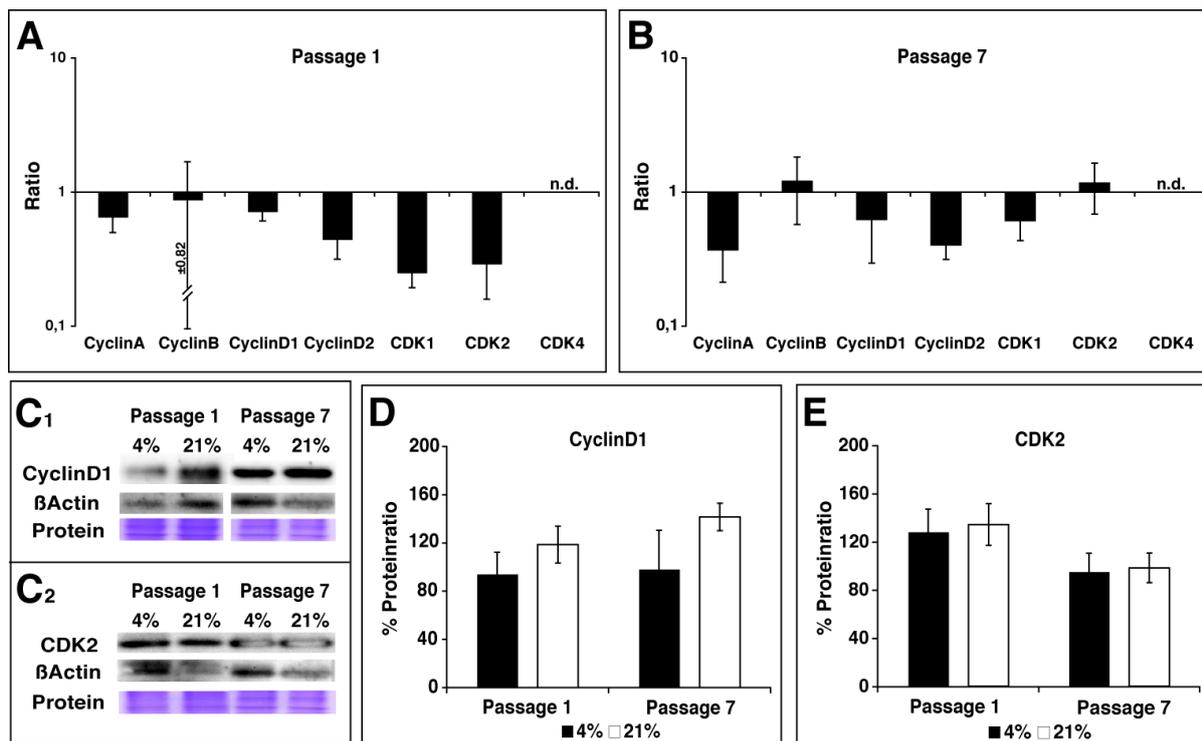
**Abb. 3.5.2.2 Die Expression Multipotenz- und Differenzierungs-assoziiierter Gene wird durch eine hypoxische Kultivierung kaum beeinflusst.** Werden hESNS Zellen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt kultiviert, so löst dies auch nach einer kontinuierlichen hypoxischen Kultivierung keine eindeutige Änderung in der Expression der Multipotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Nestin, Sox-2, CD44 und Pax6 aus (A, B). Die Differenzierungs- und Regional-spezifischen Marker zeigen keine klare Tendenz der Regulation unter hypoxischen Bedingungen (C, D)

hESNS Zellen wurden auf Poly-Ornithin und Laminin in einer definierten Dichte von  $4,2 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät und unter Zugabe von Wachstumsfaktoren kultiviert. Am Tag der Passage wurde für die quantitative RT-PCR Proben genommen. Die für die hypoxische Kultivierung erhobenen Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch kultivierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten  $\pm$  Standardfehler.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine hypoxische Kultivierung von hESNS Zellen keinen negativen Einfluss auf die Multipotenz hat, welches durch immunzytochemische und quantitative RT-PCR Daten bestätigt werden konnte. Inwieweit eine Kultivierung unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt einen Effekt auf die Expression neuronaler, Astrozyten- und Oligodendrozyten-assoziiierter Marker hat, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

### 3.4.3 Eine hypoxische Kultivierung von hESNS Zellen hat nur einen geringen Effekt auf den Zellzyklus

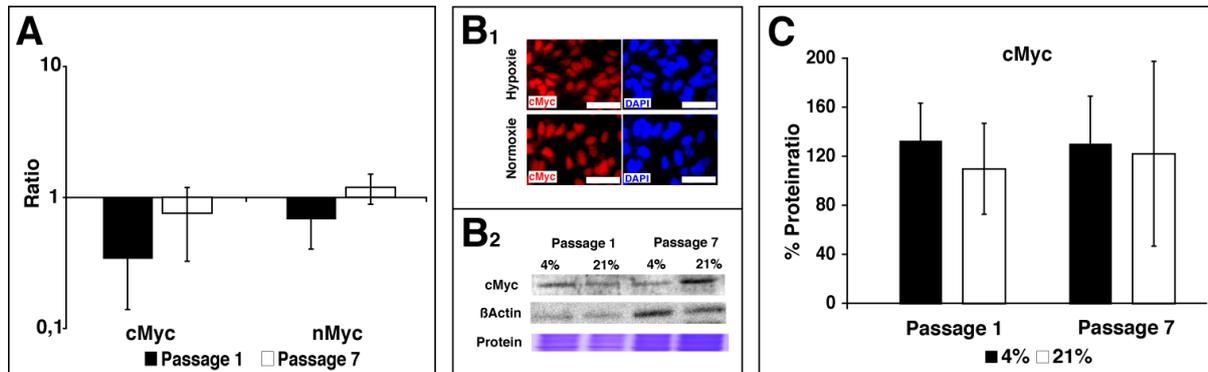
Die unter 3.4.1 präsentierten Daten zur Proliferation lassen vermuten, dass die Transition von Zellen im Zellzyklus durch die Kultivierung von hESNS Zellen unter einem physiologischen, niedrigen Sauerstoffgehalt leicht beeinflusst wird. Vor diesem Hintergrund wurde evaluiert, inwieweit die hypoxische Kultivierung von hESNS Zellen einen Einfluss auf die mRNA- und Proteinexpression von Zellzyklus-assoziierten Markern hat (Abb.3.5.3.1). Verglichen mit normoxischen Zellen hatte eine Kultivierung von hESNS Zellen unter physiologischen Bedingungen eine Herunterregulation von CyclinA, CyclinD1, CyclinD2, CDK1 und CDK2 zur Folge (Abb.3.5.3.1 A). Die Expression von CyclinB lag auf dem Niveau von Kontrollen, zeigte aber eine starke Variabilität in der mRNA-Expression ( $0,88 \pm 0,82$ ). Die Expression von CDK4 konnte sowohl in hypoxischen als auch normoxischen hESNS Zellen nicht detektiert werden. Zum Ende der hypoxischen Kultivierung lag die Expression von CyclinA, CyclinD1, CyclinD2 und CDK2 unter dem Niveau normoxisch propagierter Kontrollen (Abb.3.5.3.1 B). Die Marker CyclinB und CDK2 wiesen hingegen unter hypoxischen Bedingungen keine veränderte mRNA-Expression auf (Abb.3.5.3.1 B; CyclinB:  $1,19 \pm 0,62$ ; CDK2:  $1,16 \pm 0,48$ ). Auf Protein-Ebene konnten die Daten zur mRNA-Untersuchung der Zellzyklus-assoziierten Marker bestätigt werden (Abb.3.5.3.1 C, D, E). Proteinbiochemische Analysen konnten zeigen, dass eine Kultivierung von hESNS Zellen unter einem Sauerstoffgehalt von 4% nach einer Passage eine niedrigere Expression des Proteins CyclinD1 zur Folge hatte (Abb.3.5.3.1 C1, D; Passage 1: 4%:  $94,21 \pm 18,06\%$ ; 21%:  $118,57 \pm 15,29\%$ ). Die geringere CyclinD1-Expression in hypoxischen hESNS Zellen konnte auch nach einer Langzeitkultivierung detektiert werden (Abb.3.5.3.1 C1, D; Passage 7: 4%:  $98,33 \pm 32,13\%$ ; 21%:  $141,53 \pm 11,40\%$ ). Die Analyse des Zellzyklusproteins CDK2 ließ erkennen, dass sich die Protein-Expression von CDK2 in hESNS Zellen sowohl nach einer als auch nach sieben Passagen unter hypoxischen Bedingungen nicht von Kontrollen unterschied (Abb.3.5.3.1 C2, E).



**Abb. 3.5.3.1 Die Expression Zellzyklus-assoziiierter Gene und Proteine wird durch eine hypoxische Kultivierung von hESNS Zellen auf mRNA- und Protein-Ebene beeinflusst.** Werden hESNS Zellen unter physiologischen Bedingungen kultiviert, so löst dies eine Marker-abhängige Herunterregulation der Expression Zellzyklus- und Apoptose-assoziiierter Marker auf mRNA-Ebene aus (A, B). Auf Protein-Ebene (C, D, E) löst eine hypoxische Kultivierung von hESNS Zellen eine Herunterregulation der Expression des Zellzyklus-assoziierten Proteins CyclinD1 (C1, D) aus. Die Proteinexpression des Zellzyklus-Marker CDK2 wird nicht beeinflusst (C2, D). hESNS Zellen wurden auf Poly-Ornithin und Laminin in einer definierten Dichte von  $4,2 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät und unter Zugabe von Wachstumsfaktoren kultiviert. Am Tag der Passage wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Proben genommen. Die für die hypoxische Differenzierung erhobenen qPCR Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch differenzierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A, B). Die erhobenen quantitativen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ® über Normalisierung der Bandenstärke des entsprechenden Proteins auf den Gesamtproteingehalt bezogen (D, E). Die gezeigten Western Blots (C) sind repräsentativ für alle durchgeführten Versuche ( $n=3$ ). Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, B, D, E) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Zusätzlich zu den vorangegangenen Daten konnte die Herunterregulation der Expression des mit der G1/S-Transition assoziierten Zielgen cMyc auf mRNA-Ebene detektiert werden (Abb.3.5.3.2 A). Die Expression von cMyc auf mRNA-Ebene unter hypoxischen Bedingungen lag nur nach einer kurzzeitigen Kultivierung unter dem Niveau von normoxischen Kontrollen. Nach weiteren sechs Passagen einer hypoxischen Kultivierung zeigte cMyc, im Vergleich zu Kontrollzellen keine Veränderung in der Expression (Abb.3.5.3.2 A; Passage 1:  $0,34 \pm 0,20$ ; Passage 7:  $0,76 \pm 0,43$ ). Lag die nMyc-Expression auf mRNA-Ebene unter physiologischen Bedingungen nach einer Passage unter dem Expressionslevel von Kontrollen, so konnte nach sieben Passagen kein Expressionsunterschied mehr detektiert werden

(Abb.3.5.3.2 A; Passage 1:  $0,68 \pm 0,28$ ; Passage 7:  $1,20 \pm 0,31$ ) Unter hypoxischen Bedingungen wurde darüber hinaus auf Protein-Ebene sowohl nach Kurzzeit- als auch Langzeitkultivierung ein leicht erhöhter cMyc-Proteingehalt festgestellt (Abb. 3.3.3.2 B, C).



**Abb. 3.5.3.2 Die Expression der Zellzyklus-assoziierten Onkogene cMyc und nMyc wird durch eine hypoxische Kultivierung kaum beeinflusst.** Werden hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so löst dies nur nach Kurzzeitkultivierung eine Herunterregulation der Expression der Zellzyklus-assoziierten Marker cMyc und nMyc auf mRNA-Ebene aus (A). Auf Protein-Ebene löst eine hypoxische Differenzierung von hES Zellen nur nach sieben Tagen eine erhöhte Expression von cMyc aus (B).

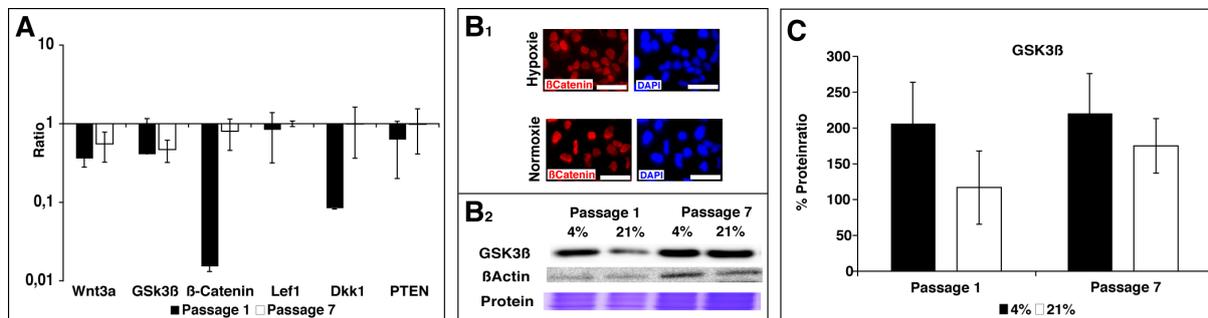
hESNS Zellen wurden auf Poly-Ornithin und Laminin in einer definierten Dichte von  $4,2 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät und unter Zugabe von Wachstumsfaktoren kultiviert. Am Tag der Passage wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Proben genommen. Die für die hypoxische Kultivierung erhobenen qPCR Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch differenzierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A, B). Die erhobenen quantitativen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ® über Normalisierung der Bandenstärke des entsprechenden Proteins auf den Gesamtproteingehalt bezogen (D, E). Der gezeigte Western Blot (B) ist repräsentativ für alle durchgeführten Versuche ( $n=3-4$ ). Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, B) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Maßstab (B1) =  $25\mu\text{m}$ .

Abschließend zeigten die präsentierten Daten, dass eine hypoxische Kultivierung von neuroepithelialen Stammzellen nur einen geringen Einfluss auf die Proliferation von hESNS Zellen hat. hESNS Zellen proliferieren unter hypoxischen Bedingungen nur wenig langsamer als normoxische Kontrollen. Die verlangsamte Proliferation kann aber durch die Herunterregulation von CyclinD1 auf mRNA- und Protein-Ebene und die gesunkene cMyc-mRNA-Expression bestätigt werden. Kontrovers zu diesen Daten steht aber die tendenziell erhöhte Proteinexpression von cMyc.

### 3.4.4 Die Kultivierung von hESNS Zellen unter einem Sauerstoffgehalt von 4% hat eine erhöhte GSK3 $\beta$ -Expression zur Folge

Wie schon unter 1.3.5 (Einleitung) beschrieben spielt der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg eine wichtige regulatorische Rolle in der Entwicklung der Neuralleiste (Dorsky et al. 2000; Abu-Khalil et al. 2004). Inwieweit der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg bei Kultivierung von neuroepithelialen Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen reguliert ist, wurde in den folgenden Experimenten analysiert. Die quantitative RT-PCR Analyse ließ erkennen, dass im Vergleich zu normoxisch kultivierten hESNS Zellen, nach einer Passage unter hypoxischen Bedingungen der Ligand Wnt3a, das Signaltransduktionsprotein  $\beta$ -Catenin und der Wnt-Inhibitor Dkk1 deutlich herunterreguliert waren (Abb.3.5.4.1 A; Wnt3a:  $0,37\pm 0,09$ ;  $\beta$ -Catenin:  $0,02\pm 0,002$ ; Dkk1:  $0,08\pm 0,07$ ). Hingegen konnte für die GSK3 $\beta$  ( $\beta$ -Catenin Inhibitor) und PTEN zwar eine Reduktion der Expression gemessen werden, die Varianz war jedoch sehr hoch (GSK3 $\beta$   $0,41\pm 0,71$ ; PTEN:  $0,64\pm 0,43$ ). Hingegen lag die mRNA-Expression von Lef1 (Transkriptionsfaktor) über den gesamten hypoxischen Kultivierungszeitraum auf dem Niveau von normoxisch kultivierten hESNS Zellen. Die Langzeitkultivierung unter hypoxischen Bedingungen führte zu einer konstanten Herunterregulation der mRNA-Expression der Marker Wnt3a und GSK3 $\beta$  (Abb.3.5.4.1 A; Wnt3a:  $0,55\pm 0,23$ ; GSK3 $\beta$ :  $0,42\pm 0,15$ ). Im Gegensatz dazu konnte für  $\beta$ -Catenin, Dkk1 und PTEN keine Änderung in der mRNA-Expression detektiert werden, sie bewegte sich auf Kontrollzellniveau (Abb.3.5.4.1 A;  $\beta$ -Catenin:  $0,80\pm 0,35$ ; Dkk1:  $0,99\pm 0,63$ ; PTEN:  $0,98\pm 0,57$ ). Die immunzytochemische Analyse ließ erkennen, dass  $\beta$ -Catenin sowohl in hypoxisch als auch normoxisch kultivierten hESNS Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb.3.5.4.1 B1). Deutlich wurde jedoch, dass kein eindeutiger Unterschied in der Signalstärke detektiert werden konnte (Abb.3.5.4.1 B1). Proteinbiochemisch wurde das Signalwegs-Inhibitor-Protein GSK3 $\beta$  auf seine Konzentration unter hypoxischen Bedingungen hin untersucht. Eine Passage einer hypoxischen Kultivierung hatte, im Vergleich zu Kontrollen eine erhöhte Proteinkonzentration von GSK3 $\beta$  zur Folge (Abb.3.5.4.1 B2, C; Passage 1: 4%:  $206,61\pm 57,38\%$ ; 21%:  $116,84\pm 51,19\%$ ). Dies konnte auch nach weiteren sechs

Passagen der Kultivierung von hESNS Zellen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt festgestellt werden (Abb.3.5.4.1 B2, C; 4%:  $220,90 \pm 50,13\%$ ; 21%:  $175,02 \pm 38,06\%$ ).



**Abb. 3.5.4.1 Der WNT/βCatenin-Signalweg wird durch eine Kultivierung von hESNS Zellen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt reprimiert.** Werden hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so löst dies eine Herunterregulation von Wnt3a und GSK3β auf mRNA-Ebene aus (A). Auf Proteinebene (B, C) löst eine hypoxische Kultivierung eine erhöhte Konzentration von GSK3β aus (B2, C).

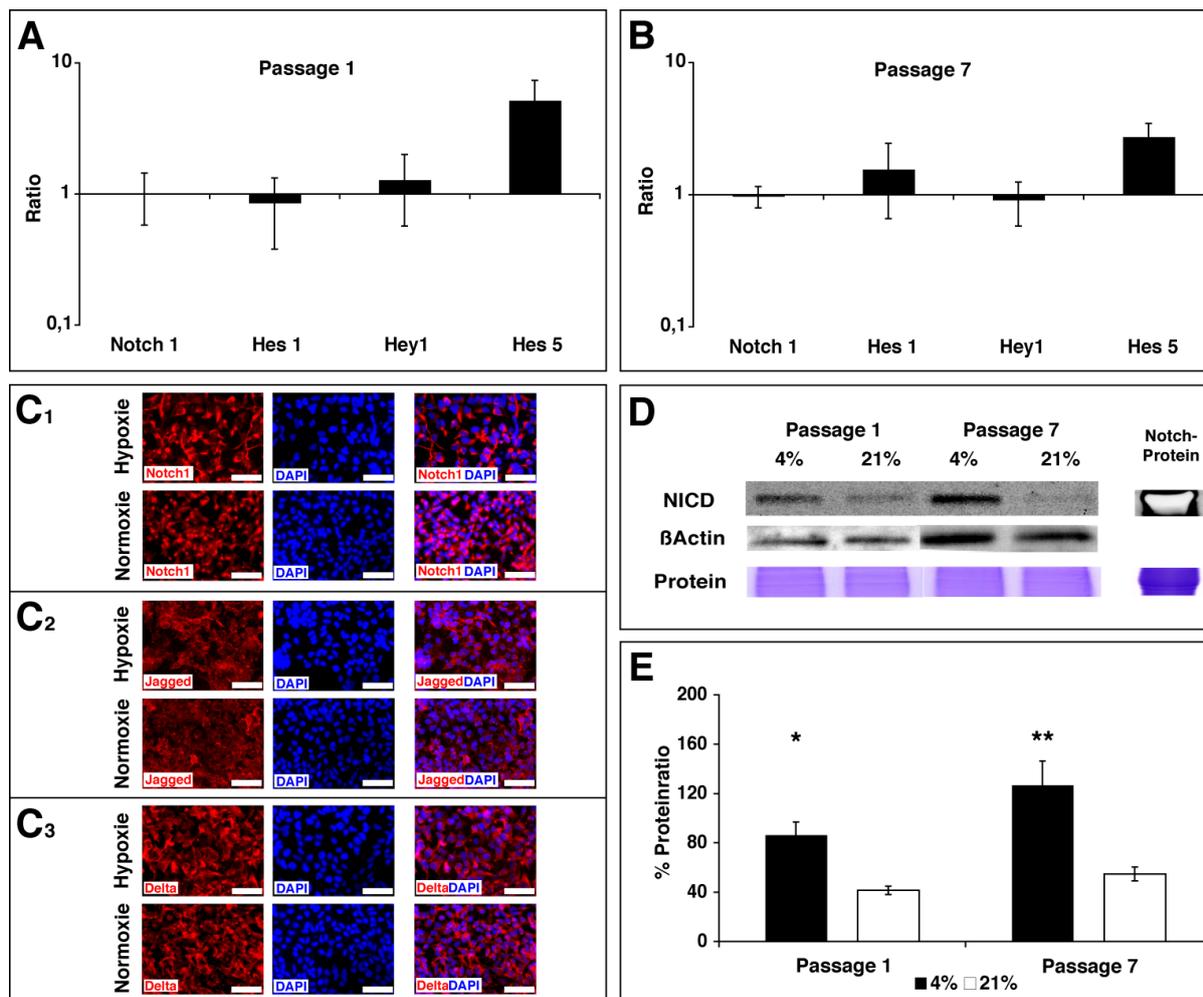
hESNS Zellen wurden auf Poly-Ornithin und Laminin in einer definierten Dichte von  $4,2 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät und unter Zugabe von Wachstumsfaktoren kultiviert. Am Tag der Passage wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Proben genommen. Die für die hypoxische Kultivierung erhobenen qPCR Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch kultivierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A). Die erhobenen quantitativen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ® über Normalisierung der Bandenstärke des entsprechenden Proteins auf den Gesamtproteingehalt bezogen (B2, C). Die gezeigten Fluoreszenzbilder (B1) und Western Blots (B2) sind repräsentativ für alle durchgeführten Versuche ( $n=3-4$ ). Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, C) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Maßstab (B1) =  $25\mu\text{m}$ .

Die Daten lassen vermuten, dass eine Kultivierung von hESNS Zellen unter einem hypoxischen Sauerstoffgehalt von 4% einen leicht unterdrückenden Einfluss auf den Wnt/β-Catenin Signalweg und die β-Catenin Signaltransduktion hat. Die Vermutung kann durch die gesunkene mRNA-Expression der direkten Zielgene des Wnt/βCatenin-Signalweges CyclinD1 und cMyc und durch die erhöhte Proteinkonzentration von GSK3β gestützt werden. Zusätzlich kann durch die erhöhte GSK3 Expression vermutet werden, dass dies der Auslöser für die tendenziell erhöhte Apoptose unter hypoxischen Bedingungen ist.

### 3.4.5 Erhöhung der Aktivität des Notch-Signalwegs bei Kultivierung von hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen

Es ist bekannt, dass dem Notch-Signalweg eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des multipotenten Stadiums verschiedenster Vorläuferzellen zugeordnet wird. Des weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass in myogenen und neuronalen Vorläuferzellen die abgespaltene intrazelluläre Domäne von Notch (NICD) mit Hif1α interagiert und über diese Interaktion die Differenzierung inhibiert

wird (Gustafsson et al. 2005). Vor diesem Hintergrund soll der Notch-Signalweg während der hypoxischen Kultivierung von neuroepithelialen Stammzellen analysiert werden. Mit Hilfe von quantitativer RT-PCR Analyse konnte, im Vergleich zu normoxischen Kontrollen, über den gesamten hypoxischen Kultivierungszeitraum keine Änderung in der mRNA-Expression des Notch-Rezeptors Notch1 und der direkten Signalwegszielgene Hes1, Hey1 festgestellt werden (Abb. 3.5.5.1 A, B). Das direkte Notch-Signalwegszielgen Hes5 wies hingegen im Bezug zu Kontrollen unter hypoxischen Bedingungen nach einer und nach sieben Passagen eine Heraufregulation um das Zwei- bis Fünffache auf (Abb. 3.5.5.1 A, B: Passage 1:  $5,18 \pm 2,21$ ; Passage 5:  $2,72 \pm 0,72$ ). Immunzytochemische Analysen zeigten, dass es keine Unterschiede einer normoxischen oder hypoxischen Kultivierung auf die Protein-Expression des Notch-Rezeptors Notch1 und der Notch-Liganden Jagged und Delta gab (Abb. 3.5.5.1 C). Die erhöhte Abspaltung und Stabilisierung der Notch-Intrazellulären Domäne (NICD) unter hypoxischen Bedingungen konnte über proteinbiochemische Analysen bestätigt werden (Abb. 3.5.5.1 D, E). Über den gesamten hypoxischen Kultivierungszeitraum konnte eine erhöhte NICD-Expression detektiert werden. Betrag der NICD-Proteingehalt unter physiologischen Bedingungen nach einer Passage  $87,60 \pm 10,15\%$ , so lag der Proteingehalt nach fünf Passagen bei  $126,87 \pm 19,40\%$ . Im Vergleich zu Kontrollen konnte unter hypoxischen Bedingungen ein um das Zwei- bis Dreifache höherer NICD-Gehalt gemessen werden (Abb. 3.5.5.1 E; 21%: Passage 1:  $41,49 \pm 3,48$ ; Passage 7:  $54,74 \pm 5,57\%$ ). Der erhöhte Proteingehalt von NICD während der hypoxischen Kultivierung von hESNS Zellen war mit einem  $P^* < 0,05$  nach einer Passage und  $P^{**} < 0,025$  nach sieben Passagen statistisch signifikant von der Kontrolle verschieden.



**Abb. 3.5.5.1 Die Abspaltung der Notch-Intrazellulären Domäne wird durch eine Kultivierung von hESNS Zellen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt induziert.** Die Kultivierung von hESNS Zellen hat eine erhöhte mRNA-Expression von Hes5 zur Folge (A, B). Auf Proteinebene (D, E) löst eine hypoxische Kultivierung eine verstärkte Abspaltung und Stabilisierung von NICD aus (D, E).

hESNS Zellen wurden auf Poly-Ornithin und Laminin in einer definierten Dichte von  $4,2 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät und unter Zugabe von Wachstumsfaktoren kultiviert. Am Tag der Passage wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Proben genommen. Die für die hypoxische Kultivierung erhobenen qPCR Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch kultivierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A, B). Die erhobenen quantitativen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ® über Normalisierung der Bandenstärke des entsprechenden Proteins auf den Gesamtproteingehalt bezogen (D, E). Die gezeigten Fluoreszenzbilder (C) und Western Blots (D) sind repräsentativ für alle durchgeführten Versuche ( $n=3-4$ ). Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, B, E) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. T-Tests zeigen statistisch signifikante Unterschiede mit \* $P < 0,05$  und \*\* $P < 0,025$  Maßstab (C) =  $25\mu\text{m}$ .

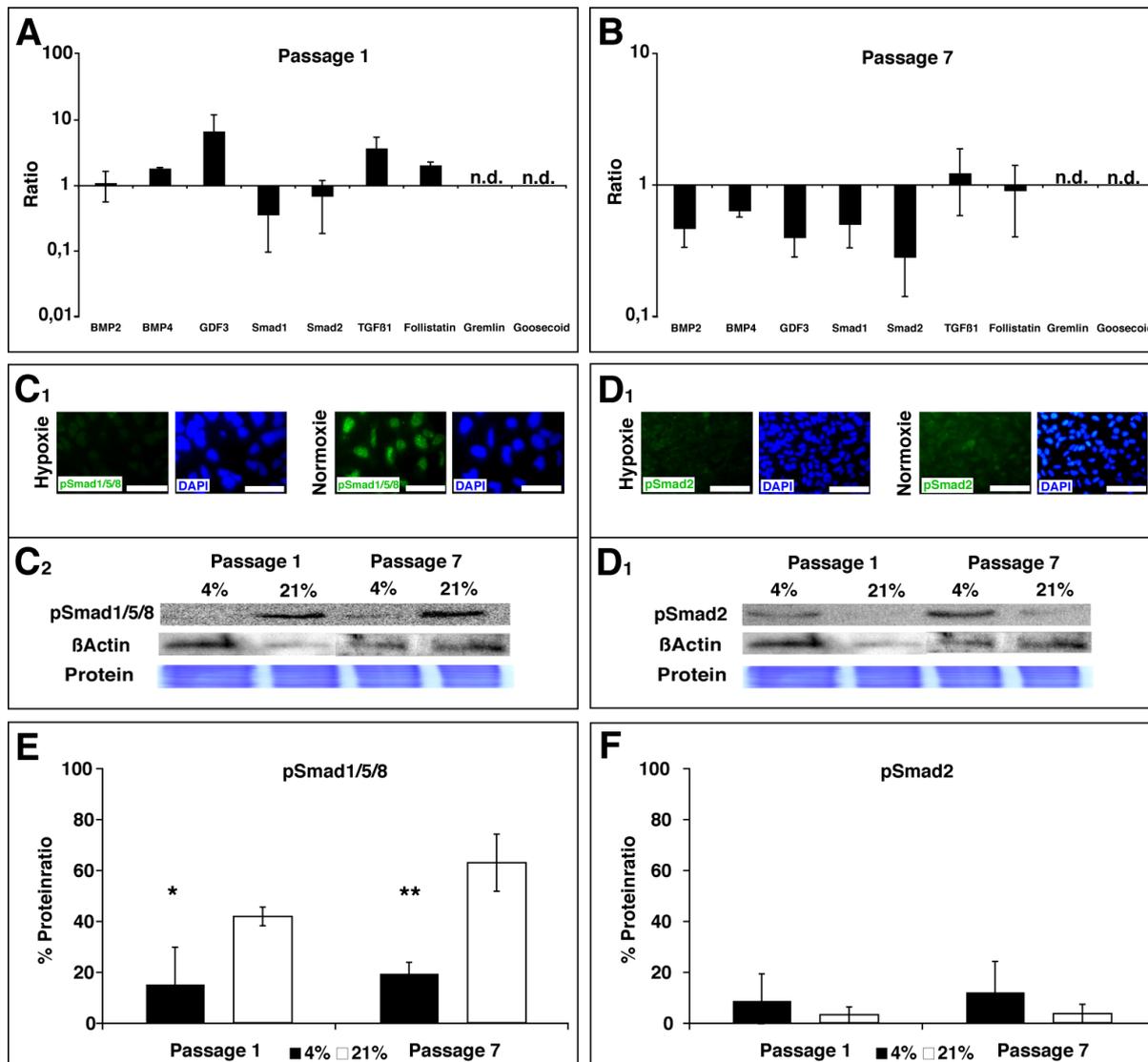
Abschließend konnte gezeigt werden, dass die Intrazelluläre Domäne von Notch (NICD) durch eine hypoxische Kultivierung stabilisiert und die mRNA-Expression des direkten Signalwegszielgens Hes5 induziert wird. Darüber hinaus kann zusammen mit den Daten zur mRNA-Expression Multipotenz-assoziiierter Marker die Aussage von Gustafsson, dass eine hypoxische Kultivierung den Notch-Signalweg zur

Multipotenzzerhaltung benötigt, auch für hypoxisch kultivierte hESNS Zellen bestätigt werden.

### **3.4.6 Reprimierung des Signaltransduktions-Proteins Smad1/5/8 bei Kultivierung von hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen**

Wie schon einleitend unter 1.3.4 erwähnt, nimmt der TGF $\beta$ /BMP-Signalweg eine tragende Rolle in der Entwicklung der Neuralleiste ein (Dorsky et al. 2000). Darüber hinaus ist bekannt, dass der Notch-Signalweg reprimierend auf die Smad1/5/8-Signaltransduktion wirkt (Panchision 2009; Pistollato et al. 2009). Auf Grundlage der vorangegangenen Daten wurde analysiert, welchen Einfluss eine hypoxische Kultivierung von hESNS Zellen auf den TGF $\beta$ /BMP-Signalweg hat. In einem ersten Experiment wurde mit Hilfe von quantitativer RT-PCR auf mRNA-Ebene folgendes festgestellt: Im Vergleich zu Kontrollen wiesen hESNS Zellen nach einer Passage unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Expression des BMP-Rezeptors BMP4 auf (Abb. 3.5.6.1 A;  $1,84 \pm 0,05$ ). Für BMP2 konnte im Gegensatz dazu keine Veränderung der Expression gemessen werden. Im Vergleich zu Kontrollen zeigte unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt der BMP-Inhibitor GDF3 eine erhöhte mRNA-Expression ( $6,79 \pm 5,32$ ). Dem gegenüber konnte für das Signaltransduktionsprotein Smad1 eine Herunterregulation und für Smad2 keine Veränderung der mRNA-Expression detektiert werden (Abb. 3.5.6.1 A; Smad1:  $0,36 \pm 0,26$ ; Smad2:  $0,69 \pm 0,50$ ). Im Vergleich zu normoxisch kultivierten hESNS Zellen wiesen TGF $\beta$  und der BMP-Antagonist Follistatin eine um das Doppelte bis Dreifache erhöhte Expression auf (TGF $\beta$ :  $3,74 \pm 1,74$ ; Follistatin:  $2,05 \pm 0,23$ ). Wurden hESNS Zellen weitere sechs Passagen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert und abschließend analysiert, konnte auf mRNA-Ebene folgendes festgestellt werden: Die BMP-Rezeptoren BMP2 und BMP4 waren, ebenso wie GDF3, auf durchschnittlich die Hälfte der Kontrollzellexpression herunterreguliert (Abb. 3.5.6.1 B; BMP-2:  $0,47 \pm 0,13$ ; BMP4:  $0,63 \pm 0,07$ ; GDF3:  $0,40 \pm 0,11$ ). Die mRNA-Expression von Smad1 und Smad2 lag im Bezug zu Kontrollen in hypoxischen Zellen ebenfalls reduziert vor (Abb. 3.5.6.1; Smad1:  $0,50 \pm 0,17$ ; Smad2:  $0,28 \pm 0,14$ ). Für TGF $\beta$ 1 und Follistatin konnte keine Änderung in der mRNA-Expression festgestellt werden, die

Streuungsweite der Expression war jedoch sehr hoch. Neben der mRNA-Expressionsanalyse wurde die Aktivität von Smad1/5/8 und Smad2 immunzytochemisch und proteinbiochemisch analysiert (Abb. 3.5.6.1 C, D, E, F): Immunzytochemisch konnte die Expression von pSmad1/5/8 und pSmad2 unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen detektiert werden, wobei sich für pSmad1/5/8 die Fluoreszenzfärbung schwächer darstellte und für pSmad2 keine klare Aussage getroffen werden konnte (Abb. 3.5.6.1 C1, D1). Proteinbiochemische Analysen bestätigten den optischen Eindruck von pSmad1/5/8, dass im Vergleich zu normoxisch kultivierten Kontrollzellen, eine Kultivierung von hESNS Zellen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt eine Reduktion der Phosphorylierung des Signaltransduktionsprotein Smad1/5/8 zur Folge hat (Abb. 3.5.6.1 C2, E). Sowohl nach einer als auch nach sieben Passagen einer hypoxischen Kultivierung lag die Phosphorylierung von Smad1/5/8 deutlich unter dem Niveau von normoxisch kultivierten Kontrollen (Abb. 3.5.6.1 E; Passage 1: 4%:  $15,21 \pm 14,54\%$ ; 21%:  $41,90 \pm 3,68\%$ ; Passage 7: 4%:  $19,42 \pm 4,43\%$ ; 21%:  $63,06 \pm 11,25\%$ ). Die reduzierte Aktivität von Smad1/5/8 unter physiologischen Bedingungen war mit einem  $P^* < 0,05$  (Passage 1) und  $P^{**} < 0,025$  (Passage 7) statistisch signifikant von der Kontrolle verschieden (Abb. 3.5.6.1 E). Im Gegensatz dazu konnte unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt für Smad2 eine leicht erhöhte Proteinaktivität detektiert werden, die Varianz der Proteinexpression war jedoch sehr hoch und damit nicht statistisch signifikant von der Kontrolle verschieden (Abb. 3.5.6.1 D2, F).



**Abb. 3.5.6.1 Die Aktivität des Signaltransduktionsprotein Smad1/5/8 des TGFβ/BMP-Signalwegs wird bei Kultivierung von hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen reduziert.** Werden hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so löst dies eine Herunterregulation der TGFβ/BMP-Signalweg-assoziierten Marker auf mRNA-Ebene aus (A, B). Auf Proteinebene (C, D, E, F) löst eine hypoxische Kultivierung eine reduzierte Aktivität von Smad1/5/8 aus (C2, E). Smad2 zeigt unter hypoxischen Bedingungen eine leicht erhöhte Phosphorylierung (D2, F).

hESNS Zellen wurden auf Poly-Ornithin und Laminin in einer definierten Dichte von  $4,2 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät und unter Zugabe von Wachstumsfaktoren kultiviert. Am Tag der Passage wurde für die quantitative RT-PCR und Western Blot Proben genommen. Die für die hypoxische Kultivierung erhobenen qPCR Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für normoxisch kultivierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen (A, B). Die erhobenen quantitativen Protein-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ® über Normalisierung der Bandenstärke des entsprechenden Proteins auf den Gesamtproteingehalt bezogen (C2, D2, E, F). Die gezeigten Fluoreszenzbilder (C1, D1) und Western Blots (C2, D2) sind repräsentativ für alle durchgeführten Versuche (n=3-4). Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (A, B, E, F) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. T-Tests zeigten statistisch signifikante Unterschiede mit \* $P < 0,05$  und \*\* $P < 0,025$ . Maßstab (C1, C2) =  $25\mu\text{m}$ .

Abschließend kann für die Regulation des TGFβ/BMP-Signalweges in hypoxisch kultivierten hESNS Zellen festgestellt werden, dass neben einer reduzierten mRNA-Expression der Signalwegs-assoziierten Marker (BMP2, BMP4, GDF3, Smad1,

Smad2) auch die Aktivität von Smad1/5/8 deutlich reduziert war. Dies lässt die Folgerung zu, dass bei einer Kultivierung von hESNS Zellen unter physiologischen Sauerstoffbedingungen die TGF $\beta$ /BMP-Signaltransduktion über Smad1/5/8 durch die erhöhte Aktivität des Notch-Signalweges und damit die Differenzierung unterdrückt wird. Die Beobachtungen von (Panchision 2009; Pistollato et al. 2009) konnten somit für hESNS Zellen bestätigt werden.

Die Ergebnisse der Analyse einer hypoxischen Kultivierung von hESNS Zellen zeigen, dass die Proliferation bei Kultivierung unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt leicht reduziert ist, aber die Multipotenz erhalten bleibt. Die Multipotenz erhaltung unter hypoxischen Bedingungen kann über die Interaktion und Regulation der beiden Signalwege Notch und TGF $\beta$ /BMP erklärt werden.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Regulation der Zellproliferation und Apoptose unter hypoxischen Bedingungen**

#### **4.1.1 Die Verlangsamung der Proliferation unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt ist abhängig vom Differenzierungsstatus der hES Zellen**

Konventionell wird in der Zellkulturtechnik ein atmosphärischer Sauerstoffgehalt von 20,8% während der Kultivierung von Säugerzellen eingesetzt, welches aber nicht den in vivo Sauerstoffbedingungen, welche die Zellen vorfinden, entspricht. Somit liegt nahe, einen physiologischen, niedrigen Sauerstoffgehalt während der in vitro Kultivierung von Säugerzellen, und somit auch ES Zellen, anzuwenden. Bereits 1978 beschrieben Quinn und Harlow et al. in vitro den förderlichen Effekt eines physiologischen, niedrigen Sauerstoffgehalt auf die Embryonalentwicklung der Maus bis zum Blastozysten-Stadium (Quinn and Harlow 1978). Ein Jahr später beschrieben Morriss und New et al. den toxischen Effekt einer atmosphärischen Sauerstoffkonzentration während der ex utero Neuralfaltenentwicklung von Rattenembryonen (Morriss and New 1979). In den Folgejahren wurden weitere Studien publiziert, die einen physiologischen Sauerstoffgehalt während der in vitro Fertilisation und der frühen Embryonalentwicklung bis zum Blastozystenstadium bei den verschiedensten Säugerspezies, wie Ratte, Maus, Hamster, Kaninchen einsetzten. Sie alle zeigten einen positiven Effekt eines niedrigen Sauerstoffgehalt während der in vitro Blastozystenentwicklung (Pabon et al. 1989; McKiernan and Bavister 1990; Kishi et al. 1991; Li and Foote 1993). Kontrovers dazu zeigten andere Studien keinen positiven Effekt eines niedrigen Sauerstoffgehaltes während der frühen in vitro Embryonalentwicklung (Nasr-Esfahani et al. 1992; Ali et al. 1993). Dumoulin und Kollegen zeigten 1995 und 1998, dass ein niedriger Sauerstoffgehalt während der in vitro Fertilisation und weiteren Embryonalentwicklung humaner Embryonen weder einen positiven noch negativen Effekt hat (Dumoulin et al. 1995; Dumoulin et al. 1999). Eine erste Studie zur Kultivierung von murinen ES Zellen

unter hypoxischen Bedingungen, wurde bereits 1998 von Carmeliet et al. publiziert (Carmeliet et al. 1998). Carmeliet und Kollegen zeigten, dass eine Kultivierung von murinen ES Zellen unter einem niedrigen, physiologischen Sauerstoffgehalt ein Absinken der Proliferation verursacht und darüber hinaus auch eine erhöhte Apoptose der Zellen hervorruft. Wenige Jahre später bestätigten weitere Arbeitsgruppen den negativen Effekt einer Kultivierung von murinen ES Zellen unter einem physiologischen, niedrigen Sauerstoffgehalt auf die Proliferation (Kurosawa et al. 2006; Jeong et al. 2007).

Eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen wurde erstmals 2005 von Ezashi et al. beschrieben (Ezashi et al. 2005). Sie zeigten, dass im Gegensatz zu murinen ES Zellen, eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen auf einem Fibroblasten-Rasen keinen negativen Effekt auf die Proliferation hat. Dem gegenüber stehen kürzlich veröffentlichte Daten von Chen et al., die in ihrer Studie zeigten, dass hES Zellen, die unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt kultiviert werden langsamer, proliferieren. Selber gingen sie jedoch nicht näher auf die Kinetik der Proliferation ein (Chen et al. 2009). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Feeder-freie Kultivierung von hES Zellen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt ein deutliches Absinken der Proliferation verursacht. So zeigten hES Zellen ein statistisch signifikantes Absinken der spezifischen Wachstumsrate unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 3.3.1.1). Die Abnahme der Proliferation unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt konnte durch eine statistisch signifikante Reduktion der Anzahl an BrdU-positiven hES Zellen sowohl nach hypoxischer Kurzzeit- als auch Langzeitkultivierung um durchschnittlich fünf bis zehn Prozentpunkte nachgewiesen werden (Abb. 3.3.1.2). Somit hat der Einsatz eines niedrigen Sauerstoffgehaltes während der Kultivierung von hES Zellen eine verlangsamte Proliferation zur Folge. Die hier präsentierten Daten stehen im Einklang mit den veröffentlichten Daten von Chen et al., beschreiben aber detaillierter die Proliferationskinetik hypoxisch kultivierter hES Zellen. Kontrovers dazu wurde kürzlich von Forristal et al. postuliert, dass eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen einen förderlichen Effekt auf die Proliferation hat (Forristal et al.). Auch stehen die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse konträr zu den Daten, die von Ezashi et al. bereits 2005 veröffentlicht wurden (Ezashi et al. 2005). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse zur

hES Zellproliferation und deren Kinetik unter hypoxischen Bedingungen kann zum einen sein, dass die oben aufgeführten Publikationen andere Zelllinien als die in der hier vorliegenden Arbeit verwendet haben. Darüber hinaus geht aus beiden Publikationen nicht deutlich hervor, nach wie vielen Tagen oder Passagen einer hypoxischen Kultivierung die Ergebnisse gewonnen wurden. Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Effekte eines niedrigen Sauerstoffgehaltes auf hES Zellen kann darüber hinaus die unterschiedlichen Kultivierungsmethoden von Ezashi et al. und Forristal et al., wie die Verwendung höherer bFGF Konzentration (basic Fibroblast Growth Factor), höherer Gelöstsauerstoffgehalt, eines Fibroblasten-Zellrasens, die nicht Äquilibration des Mediums und der während eines Mediumwechsels nicht konstante Sauerstoffgehalt sein. In der hier vorliegenden Dissertation wurde während dem Mediumwechsel und Passagieren ein konstant niedriger Sauerstoffgehalt gewährleistet, um den Einfluss eines normoxischen Schocks so gering wie möglich zu halten. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei Ezashi et al. und Forristal et al. Schwankungen im Gelöstsauerstoffgehalt aufgetreten sind und somit eine weitere Ursache für die unterschiedlichen Effekte auf die Proliferation von hES Zellen sein. Kontrovers zu der Äquilibrationshypothese stehen die Proliferationsdaten von Chen et al.. Chen und Kollegen verwendeten augenscheinlich, ebenso wie Ezashi et al. und Forristal et al. kein äquilibriertes Medium, wiesen aber den Effekt einer verlangsamten Proliferation unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt nach einen längeren Zeitraum nach. Der Nachweis des Absinken der Proliferation mit der Zeit ließen jedoch Ezashi et al. und Forristal et al. missen. Abschließend kann behauptet werden, dass eine hypoxische Kultivierung die Proliferation von hES Zellen nicht positiv unterstützt, sondern eine Verlangsamung der Proliferation hervorruft.

Direkt in neuroepithelialen Stammzellen konvertierte hES Zellen zeigten im Einklang mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten zur Proliferation von hES Zellen auch einen Einfluss eines niedrigen Sauerstoffgehaltes auf die Proliferation. Die Analyse der Proliferation hypoxisch direkt konvertierter hES Zellen zeigte, im Gegensatz zu normoxisch differenzierenden hES Zellen, unter hypoxischen Bedingungen eine Stagnation der Proliferation, welches auch im Phasenkontrastbild deutlich wurde (Abb. 3.4.1.1). Bereits 2006 zeigten Kurosawa et al., dass eine hypoxische Differenzierung von murinen Embryoidkörperchen (mEB) eine verlangsamte

Proliferation zur Folge hat (Kurosawa et al. 2006). Zwei Jahre später zeigten Cameron und Kollegen die Auswirkungen eines niedrigen Gelöstsauerstoffgehaltes auf die Proliferation von aus humanen ES Zellen generierten Embryoidkörperchen (hEB; Cameron et al. 2008). Anhand von Zellzählungen wiesen sie nach, dass eine hypoxische Kultivierung eine Stagnation der Proliferation der hEB verursacht. Diese Studien untermauern die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass sowohl eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen als auch von direkt in neuroepithelialen Zellen konvertierten hES Zellen eine Verlangsamung oder gar eine Stagnation der Proliferation verursacht. Vermutlich reduziert oder inhibiert ein niedriger Sauerstoffgehalt wichtige, Proliferations- und Entwicklungsbiologisch-assoziierte Signalwege und beeinflusst dadurch die Proliferation und Differenzierung von hES Zellen.

Neben in neuroepithelialen Zellen differenzierenden hES Zellen wurden im Rahmen der Dissertation Daten zum Wachstum von neuroepithelialen Stammzellen (hESNS) unter hypoxischen Bedingungen erhoben. Es zeigte sich, dass hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen langsamer proliferieren als normoxisch kultivierte hESNS Zellen (Abb. 3.5.1.1). So zeigte die Erhebung der spezifischen Wachstumsrate eine Reduktion der Proliferation hypoxisch kultivierter hESNS Zellen, welches durch BrdU-Inkorporation bestätigt werden konnte (Abb. 3.5.1.2). Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten stehen jedoch kontrovers zu publizierten Daten von Studer et al., Morrison et al., Shin et al. und Pistollato et al., um nur einige zu nennen (Morrison et al. 2000; Studer et al. 2000; Shin et al. 2006; Chen et al. 2007; Pistollato et al. 2007). Sie postulierten, dass ein niedriger Sauerstoffgehalt einen positiven Effekt auf das Überleben und die Proliferation von multipotenten neuralen Vorläuferzellen aus den verschiedensten Spezies hat (Maus, Ratte, Mensch). Man darf jedoch nicht außer acht lassen, dass die in den Publikationen ermittelten Daten sich nicht auf humane Zellen beziehen. Auch wurden diese Studien an primären Zellkulturen durchgeführt, die an einen niedrigen Sauerstoffgehalt in vivo (2-7% atmosphärischer Sauerstoffgehalt) adaptiert waren, und nicht an den in der Zellkultur konventionell verwendeten atmosphärischen Sauerstoffgehalt von 21%, wie die in dieser Arbeit verwendeten Zellen. Es kann vermutet werden, dass sich aufgrund der Adaptation von hESNS Zellen an den niedrigen Sauerstoffgehalt die Proliferation verlangsamt.

Zusammenfassend bietet sich für die in dieser Dissertation erhobenen Daten zur Proliferation von hES Zellen und deren differenzierte Derivate unter hypoxischen Bedingungen folgende Hypothese an: Zellen, die sich an hypoxische Bedingungen adaptieren, proliferieren langsamer und spiegeln anschließend nach erfolgter Adaptation unter hypoxischen Bedingungen die „wahre“ in vivo Proliferation der Zellen wieder, welche vermutlich langsamer ist als unter einem atmosphärischem Sauerstoffgehalt. Diese Hypothese kann dadurch gestützt werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien bereits unter normoxischen Bedingungen generiert und somit an das vorliegende atmosphärische Sauerstoffsystem adaptiert sind. An einem niedrigen Sauerstoffgehalt müssen sich die Zellen erst adaptieren, welches aufgrund der Umstellung des Zellmetabolismus eine Verlangsamung der Proliferation hervorruft. Das Phänomen der Umstellung des Stoffwechsels unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt wurde erstmals an Tumorzellen von Warburg et al. beschrieben (Warburg 1931). So gewinnen hypoxische Zellen den größten Teil ihrer Energie nicht über den Zitratzyklus, sondern durch Verwertung von Pyruvat und Produktion von Laktat, welches auch für den sich entwickelnden Embryo und hES Zellen nachgewiesen werden konnte (Gott et al. 1990; Ley 2005). Die kaum noch erfolgte Verwertung von Pyruvat über den Zitratzyklus löst, im Gegensatz zu normoxisch kultivierten Zellen, darüber hinaus eine Limitierung an Metabolit-zwischenprodukten aus, die essentiell für die Lipid- und auch Aminosäure-synthese sind, um nur einige zu nennen. Die Limitierung an Stoffwechsel-zwischenprodukten und ATP hält auch nach erfolgter Adaptation an und kann somit eine Ursache für die langsamere Proliferation hypoxisch kultivierter Zellen sein, da ihnen zum Beispiel im Gegensatz zu normoxisch kultivierten Zellen, zur Protein-Synthese eine geringere Konzentration an Aminosäuren zur Verfügung steht. Darüber hinaus kann die oben angerissene Adaptations-Hypothese auch dadurch gestärkt werden, dass alle bis zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Daten zur erhöhten Proliferation von z.B. neuronalen Vorläuferzellen an aus Geweben frisch isolierten Zellen, die unter einem physiologischen, hypoxischen Sauerstoffgehalt „generiert“ wurden, gewonnen wurden und sie somit an eine hypoxische Kultivierung und nicht normoxische Kultivierung adaptiert sind (Morrison et al. 2000; Studer et al. 2000; Shin et al. 2006; Chen et al. 2007; Pistollato et al. 2007).

#### **4.1.2 Eine erhöhte Apoptose kann nur in undifferenzierten und differenzierenden hES Zellen festgestellt werden**

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verlangsamte Proliferation unter hypoxischen Bedingungen nicht nur durch Adaptation und Stoffwechsellumstellung sondern auch durch eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen hervorgerufen wurde. 1998 zeigten Carmeliet et al., dass eine Kultivierung von murinen ES Zellen unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt eine erhöhte Apoptose zur Folge hat (Carmeliet et al. 1998). Ergänzend dazu zeigten Cosse und Kollegen, dass ein niedriger Sauerstoffgehalt abhängig vom eingesetzten Zelltyp Apoptose auslösen kann (Cosse and Michiels 2008). Darüber hinaus detektierten Gassmann et al. in hypoxisch kultivierten EBs nekrotische Areale (Gassmann et al. 1996). Für hypoxisch kultivierte hES Zellen und differenzierende Derivate liegen bis zum heutigen Zeitpunkt noch keine detaillierten Studien vor, die untersuchen, welchen Effekt ein physiologischer Sauerstoffgehalt auf die Apoptose hat. So zeigten hypoxisch kultivierte hES Zellen eine um das Doppelte erhöhte Apoptose (Abb. 3.3.1.4). Auch hypoxisch, direkt konvertierte Zellen zeigten eine Erhöhung der Apoptose (Abb. 3.4.1.1). Im Gegensatz dazu zeigten hESNS Zellen nur eine leicht erhöhte Apoptose, wenn diese unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt kultiviert wurden (Abb. 3.5.1.1). Die erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen kann jedoch nicht die gesunkene Proliferation von hES Zellen und deren differenzierenden Derivate erklären. Vermutlich ist die erhöhte Apoptose, die bei allen Differenzierungsstadien verstärkt nach einer Passage auftrat, eine Folge des Adaptationsprozesses. Auch war die Anzahl der apoptotischen Zellen im Durchschnitt nicht so hoch, als dass die Anzahl an apoptotischen Zellen die Erhebung der Proliferation explizit beeinflusst hätten. Carmeliet et al. deutete an, dass eine erhöhte Apoptose unter hypoxischen Bedingungen die Folge der Hif1 $\alpha$ -Stabilisierung, somit des Adaptationsprozesses an den niedrigen Sauerstoffgehalt und in diesem Zusammenhang mit der Umstellung des Stoffwechsels ist (Carmeliet et al. 1998). Auch Cosse und Kollegen wiesen auf eine erhöhte Apoptose durch einen Adaptationsprozess hin (Cosse and Michiels 2008). Zusammenfassend kann für hES Zellen und deren differenzierende Derivate festgestellt werden, dass die sowohl von Carmeliet et al. als auch die von Cosse und Kollegen aufgestellte Hypothese, dass der Adaptationsprozesses und die

Stoffwechselumstellung die Ursache einer erhöhte Apoptose unter einem physiologisch, niedrigen Sauerstoffgehalt ist, auf hES und direkt konvertierte hES Zellen übertragen werden kann. Warum hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen nur eine leicht erhöhte Apoptose aufwiesen, kann nur vermutet werden. So zeigten Clarke et al. das unter hypoxischen Bedingungen neurale Stammzellen der Maus unter hypoxischen Bedingungen eine Caspase-abhängige Apoptose blockieren (Clarke and van der Kooy 2009). Vermutlich trifft dies auch auf hESNS Zellen zu, welches aber um diese Vermutung zu bestätigen noch detaillierterer Analysen bedarf.

#### **4.1.3 Die G1/S-Transition wird unter hypoxischen Bedingungen abhängig vom Differenzierungsstatus beeinflusst**

ES Zellen zeichnen sich normalerweise durch einen sehr kurzen Zellzyklus und G1/S-Transition aus (Neganova and Lako 2008). Jedoch verlängert sich mit Zunahme der Differenzierung der Zellzyklus, und die ES Zellen verbleiben länger in der G1-Phase (White and Dalton 2005). Auf molekularer Ebene zeigten Neganova und Kollegen 2009, dass eine Blockierung von CDK2 einen Arrest von hES Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus verursacht und eine Differenzierung in extraembryonale Zellen induziert (Neganova et al. 2009). Zusätzlich konnten Zhang und Kollegen Nanog eine Schlüsselrolle in der G1-S-Phasen-Transition zuordnen (Zhang et al. 2009). So resultiert eine Heraufregulation von Nanog in eine schnellere Progression von hES Zellen durch den Zellzyklus, unter dem Erhalt des pluripotenten Stadiums (Zhang et al. 2009). In dieser Arbeit zeichnete sich für hES Zellen, sowohl nach hypoxischer Kurzzeit- als auch bei Langzeitkultivierung, eine leichte Verlängerung des Zellzyklus ab, welches durch die gesunkene Anzahl an BrdU-positiven Zellen gezeigt werden konnte (Abb. 3.3.1.2). So brauchen hypoxisch kultivierte hES Zellen länger für die Durchschreitung des Zellzyklus (Abb. 3.3.1.3), welches sich in einer geringeren Anzahl an Zellen in der S-Phase äußerte. Eine hypoxische Kurzzeitkultivierung löste bei hES Zellen eine erhöhte Produktion von CDK2 auf Protein- und mRNA-Ebene aus (Abb. 3.3.3.1). Im Gegensatz dazu zeigte Nanog im Vergleich zu normoxischen Bedingungen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt eine deutlich geringere Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 3.3.2.2). Neben Nanog

zeigten hES Zellen nach hypoxischer Langzeitkultivierung eine niedrigere Expression von CyclinD1 auf mRNA- und Protein-Ebene. Die leicht erhöhte Expression von CDK2 nach Kurzzeitkultivierung ist vermutlich die Folge des Adaptationsprozesses und ein Versuch der Zelle, der reduzierten G1/S-Transition entgegenzuwirken. Bereits 2003 zeigten Goda et al., dass eine Stabilisierung von Hif1 $\alpha$  unter hypoxischen Bedingungen einen Zellzyklusarrest in primären Zellen hervorrufen kann, ohne jedoch einen Einfluss auf die CDK2-Proteinexpression zu haben (Goda et al. 2003). Dies konnte auch von Neganova und Kollegen an hES Zellen beobachtet werden (Neganova et al. 2009). Zusätzlich wiesen Zhang et al. cMyc und CyclinA auf mRNA-Ebene eine wichtige Rolle in der hES-Zellzyklustransition zu (Zhang et al. 2009). Somit ist der erhöhten CDK2 Proteinexpression zwar eine Rolle zuzuordnen, scheint aber bei der G1/S-Transition von hypoxisch kultivierten hES Zellen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse, dass eine hypoxische Kultivierung eine verlangsamte Proliferation durch Herunterregulation wichtiger Bestandteile der G1/S-Transition sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene wie cMyc, Nanog, CyclinA, CyclinD2 von hES Zellen hervorruft, kann durch Analysen von Koshiji und Kollegen unterstützt werden (Koshiji et al. 2004). Koshiji und Kollegen zeigten, dass eine verminderte Proliferation von Karzinomzellen durch Hif1 $\alpha$ -vermittelte Inhibierung von Signalwegzielgenen einen Zellzyklus-Arrest aufgrund der Blockierung von Myc auslöst (Koshiji et al. 2004). Somit kann die verminderte Expression von cMyc auf Protein- und mRNA-Ebene in hypoxisch kultivierten hES Zellen einen Rückschluss auf eine verminderte Proliferation oder gar Zellzyklus-Arrest geben (Abb. 3.3.3.2). Darüber hinaus stehen die Daten von hES Zellen im Einklang mit Daten, die von Jeong et al. an hypoxisch kultivierten mES Zellen erhoben worden sind (Jeong et al. 2007). Auch sie konnten eine Herunterregulation von cMyc auf mRNA-Ebene und eine damit verbundene verminderte Proliferation von mES Zellen detektieren. Konträr zu den Daten von hES stehen die hier vorliegenden Daten zu hypoxisch, direkt konvertierten hES Zellen, die proliferativ inaktiv sind (Abb. 3.4.1.1). Sie zeigen initial eine erhöhte Expression von cMyc sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene und eine konstante Heraufregulation von CyclinA (Abb. 3.4.3.1 und Abb. 3.4.3.2). Warum dies so ist, kann nicht abschließend geklärt werden. Es kann spekuliert werden, dass hypoxisch

differenzierende hES Zellen der verlangsamten Proliferation durch eine erhöhte Produktion von Zellzyklus-assoziierten Markern auf mRNA- und Protein-Ebene entgegenzusteuern zu versuchen. Diese Hypothese kann durch die Analyse von Zellzyklus-assoziierten Markern auf mRNA- und Protein-Ebene (CDK2 und CyclinD1) bestätigt werden. Obwohl direkt konvertierte hES Zellen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt nicht mehr proliferieren, ist der Proteinanteil an CDK2 und CyclinD1 konstant, oder nur leicht unter dem Niveau von normoxisch kultivierten Zellen. Der mRNA-Anteil Zellzyklus-assoziiierter Marker lag auch nach vierzehn Tagen noch deutlich über Kontrollzellniveau (Abb. 3.4.3.1). Vermutlich wird die Proliferation und die Zellzyklustransition, der Zellzyklus-Arrest in differenzierenden hES Zellen über andere Signalwege gesteuert, wie es schon Koshiji et al. und auch Neganova und Zhang et al. in ihren Arbeiten initial beschrieben haben (Koshiji and Huang 2004; Koshiji et al. 2004; Neganova and Lako 2008; Lako et al. 2009; Neganova et al. 2009; Zhang et al. 2009).

Im Gegensatz zu hES und direkt konvertierten hES Zellen reagieren hESNS Zellen auf eine hypoxische Kultivierung mit einer Verminderung der mRNA-Expression einiger Zellzyklus-assoziiierter Gene wie CyclinD2, CyclinA und einer Herunterregulation von CyclinD1 auf Protein-Ebene (Abb. 3.5.3.1). Jedoch konnte für cMyc sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene nach Langzeitkultivierung keine Veränderung festgestellt werden (Abb. 3.5.3.2). Studien zeigten, dass eine Herunterregulation von CyclinD1 in murinen Retinazellen eine Verlängerung des Zellzyklus und eine Induktion der Neurogenese verursacht, welches auch für CyclinD2 in vivo an kortikalen Vorläuferzellen festgestellt werden konnte (Kowalczyk et al. 2004; Glickstein et al. 2009). Unter Berücksichtigung dieser Daten konnte auf Protein-Ebene in hypoxisch kultivierten hESNS Zellen eine erhöhte Expression des neuronalen Markers Tuj1 festgestellt werden (Abb. 3.5.2.1 A<sub>2</sub>). Zusammen mit den Daten zur Proliferation ergibt sich folgendes Bild: hESNS Zellen, welche unter hypoxischen Bedingungen kultiviert werden, spiegeln vermutlich die in vivo Regulation des Zellzyklus und die damit eng verknüpfte Multipotenzzerhaltung und Differenzierung von neuralen Vorläuferzellen wieder (Salomoni and Calegari).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine hypoxische Kultivierung die G1/S-Transition von hES Zellen und deren differenzierende Derivate reduziert,

welches eine erhöhte Differenzierung zur Folge hat (Salomoni and Calegari; Neganova and Lako 2008; Lako et al. 2009).

## **4.2 Pluripotenzerhaltung, Spontandifferenzierung und Multipotenzerhaltung**

Murine ES Zellen zeigen bei einer Kultivierung unter einem physiologischen, niedrigen Sauerstoffgehalt eine Verringerung des pluripotenten und einer Erhöhung des differenzierten Phänotyps, welches sich durch Herunterregulation der Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Oct-4, Nanog und Sox-2 auf mRNA-Ebene und eine erniedrigte Alkalische Phosphatase Aktivität äußert (Kurosawa et al. 2006; Jeong et al. 2007; Powers et al. 2008). Darüber hinaus wurde in hypoxisch kultivierten mES Zellen eine Blockierung des in der murinen Pluripotenzerhaltung involvierten Jak/Stat-3-Signalweges und damit eine verstärkte Differenzierung unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt festgestellt (Jeong et al. 2007). Erstmals wurde 2006 von Covello et al. die Regulation von Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren unter hypoxischen Bedingungen untersucht. Sie zeigten, dass die Transkription von Oct-4 bei einem niedrigen Sauerstoffgehalt durch Hif2 $\alpha$ , nicht aber Hif1 $\alpha$  aktiviert wird (Covello et al. 2006). Ergänzend dazu zeigten kürzlich Forristal et al., dass auch die Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Nanog und Sox-2 direkt über Hif2 $\alpha$  induziert werden können (Forristal et al.). Westfal et al. publizierten im Gegensatz dazu, dass bei einer hypoxischen Kultivierung von hES Zellen die Expression von Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren wie Sox-2 und Nanog nicht beeinflusst wird (Westfall et al. 2008). Im Einklang mit Forristal et al. proklamierten Ezashi und Kollegen bereits 2005 den Pluripotenz-erhaltenden Effekt eines niedrigen Sauerstoffgehaltes während der Kultivierung von hES Zellen (Ezashi et al. 2005). Wenige Jahre später publizierten ergänzend mehrere Arbeitsgruppen, dass bei einer Kultivierung von hES Zellen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt die Pluripotenzerhaltung nicht negativ beeinflusst wird (Forristal et al.; Forsyth et al. 2006; Westfall et al. 2008; Prasad et al. 2009). Kontrovers dazu wurde jedoch 2009 von Chen et al. publiziert, dass sich ein niedriger Sauerstoffgehalt nicht zur Propagierung und zum Erhalt des pluripotenten Stadiums von hES Zellen eignet und diese unter hypoxischen Bedingungen verstärkt differenzieren (Chen et al. 2009).

Zusätzlich konnte kürzlich von Prado-Lopez demonstriert werden, dass eine hypoxische Kultivierung die Induzierung der Differenzierung und die Differenzierung von hES Zellen in endodermale Zellen begünstigt (Prado-Lopez et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit zeigten ausführliche Analysen von Feeder-freien, hypoxisch kultivierten hES Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene folgende Resultate: Für die Pluripotenz-assoziierten Marker Rex-1, Nanog und Sox-2 konnte nach hypoxischer Langzeitkultivierung eine deutliche, für Oct-4 eine leichte Herunterregulation festgestellt werden (Abb. 3.3.2.2 A, B). In Einklang mit der Herunterregulation Pluripotenz-assoziiierter Marker konnte auf mRNA-Ebene eine Heraufregulation vor allem von Mesodermal- und Entodermal-assoziierten Markern unter hypoxischen Bedingungen detektiert werden (Abb. 3.3.2.2 C, D). Zusammen mit der Herunterregulation der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenantigene Tra-1-60 und Tra-1-81 (Abb. 3.3.2.1) kann für hypoxisch kultivierte hES Zellen proklamiert werden, dass eine Kultivierung unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt nicht zur Pluripotenzerhaltung geeignet ist und die Differenzierung in mesodermale und entodermale Linien induziert wird. Dies wurde auch schon von Chen et al. und Prado-Lopez et al. initial bestätigt (Chen et al. 2009, Prado-Lopez et al. 2010). Jedoch stehen die hier vorliegenden Daten konträr zu den oben aufgeführten Publikationen von Ezashi et al., Forrista et al., Forsyth et al., Prasad et al. und Westfall et al. Sie alle zeigten, dass eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen keinen negativen Einfluss auf die Oct-4-, Nanog-, oder Sox-2-mRNA-Expression hat. Forristal und Kollegen zeigten darüber hinaus, dass durch die Kultivierung unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt die Expression von Oct-4 ( $Hif2\alpha$ ), Nanog ( $Hif2\alpha$ ) und Sox-2 ( $Hif3\alpha$ ) unter hypoxischen Bedingungen aufgrund der Stabilisierung von  $Hif2\alpha$  und  $Hif3\alpha$  erhöht werden kann (Forristal et al.; Covello et al. 2006; Westfall et al. 2008). Betrachtet man die Arbeiten von Forristal und Kollegen näher, bleiben sie es jedoch zum Teil schuldig, das pluripotente Stadium hypoxisch kultivierter hES Zellen, z.B. durch Proteinexpressionsanalysen genauer zu beschreiben (Forristal et al.; Ezashi et al. 2005; Forsyth et al. 2006; Westfall et al. 2008; Prasad et al. 2009). Ein weiterer Grund für die konträren Ergebnisse der hier vorliegenden Dissertation und den oben aufgeführten Publikationen ist, dass sich die experimentellen Ansätze von dem der hier vorliegenden Doktorarbeit unterscheiden. So kultivierten zum

Beispiel Ezashi et al. hES Zellen über einen Zeitraum von zwei Wochen auf einem Fibroblasten-Rasen, ohne die Zellen zu transferieren. Der Kultivierungsansatz in der vorliegenden Arbeit zielte jedoch darauf ab, die hES Zellen Feeder-frei in einem Standard-Kultursystem (Passagierungsintervall 6-8 Tage; atmosphärischer Sauerstoffgehalt 4%) zu analysieren. Auch konnte bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien die Expression von Hif2 $\alpha$  sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene nicht nachgewiesen werden. So konnte bei hypoxisch kultivierten hES Zellen (Zelllinien H9, H9.2, I3) nur die Stabilisierung von Hif1 $\alpha$  nachgewiesen werden, nicht jedoch die von Hif2 $\alpha$ , wie von Forristal et al. und Westphal et al. beschrieben (Abb. 3.1.2). Studien zeigten jedoch, dass die Expression der sauerstoffsensitiven Untereinheiten Hif2 $\alpha$  und Hif3 $\alpha$  Zelllinien-abhängig ist und auch innerhalb von Zelllinien gleichen Typus die Expression stark variieren kann (Blancher et al. 2000; Talks et al. 2000; Semenza 2003). So verwendeten Forristal et al. und Westphal et al. andere Zelllinien wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten. Es kann spekuliert werden, dass der hervorgerufene Unterschied in der Pluripotenzerhaltung von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen abhängig von der Expression von Hif-sauerstoffsensitiven Untereinheiten und ein Grund für die Differenz in den Analysen und der Pluripotenzerhaltung ist. Die gesunkene Fähigkeit des Erhalts des pluripotenten Stadiums von hES Zellen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt kann auch durch die erhöhte Präsenz mesodermaler und entodermaler Marker auf mRNA-Ebene bestätigt werden. So wurden unter hypoxischen Bedingungen entodermale, mesodermale und ektodermale Marker um das durchschnittlich Fünffache in hES Zellen heraufreguliert (Abb. 3.3.2.2 C, D). Die Verwendung eines niedrigen Sauerstoffgehaltes während der Differenzierung von hES Zellen ist eine gängige Methode in der Gewinnung von mesodermalen und entodermalen Subtypen. So zeigten bereits verschiedenste Arbeitsgruppen, dass unter hypoxischen Bedingungen hES Zellen ein erhöhtes Potential haben, mesodermale und entodermale Subtypen auszubilden (Caniggia et al. 2000; Koay and Athanasiou 2008; Bianco et al. 2009; Niebruegge et al. 2009). Somit ist eine Kultivierung unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt abhängig von der hES Zelllinie nicht zum Erhalt des pluripotenten Stadiums geeignet, sondern kann eine

erhöhte Spontandifferenzierung insbesondere in mesodermale und entodermale Zellen induzieren.

Eine Differenzierung in mesodermale und entodermale Keimbahnzellen konnte auch bei der direkten Konversion von hES Zellen in neuroepitheliale Zellen trotz Verwendung des BMP-Antagonisten Noggin, welcher die mesodermale und entodermale Differenzierung unterdrückt, detektiert werden. Zellen, die zwei Wochen unter hypoxischen oder normoxischen Bedingungen kultiviert worden waren, zeigten keine Expression der Pluripotenz-assoziierten Marker Oct-4, Rex-1 und Nanog (Abb. 3.4.2.2 A). Der auch mit dem multipotenten Stadium von neuroepithelialen Stammzellen verbundene Transkriptionsfaktor Sox-2 war in hypoxisch differenzierten hES Zellen präsent und lag auf Kontrollzellniveau (Abb. 3.4.2.2 A). Die unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt direkt differenzierten hES Zellen zeigten zusätzlich eine um das Zehnfache verstärkte Expression von mesodermalen und entodermalen Markern wie Brachyury, Desim, Vimentin und Cytokeratin auf mRNA-Ebene (Abb. 3.4.2.2 B). Konträr dazu zeigten die immunzytochemischen und durchflusszytometrischen Analysen ein einheitliches Bild von hypoxisch und normoxisch direkt differenzierten hES Zellen (Abb. 3.4.2.1). So konnten bei der immunzytochemischen Analyse der mit dem multipotenten, neuralen Vorläuferzellstadium verbundenen Marker Sox-2 und Nestin keine Expressionsunterschiede festgestellt werden, welches auch auf den mit der Neuralrohrbildung verbundenen Marker SSEA-1 und die mit dem neuralen, multipotenten Stadium assoziierten Marker CD133 und PSA-NCAM zutrif. Im Gegensatz dazu konnte auch nach zwei Wochen der Differenzierung der mit dem pluripotenten Stadium assoziierte Marker SSEA-4 sowohl unter hypoxischen als auch normoxischen Bedingungen nachgewiesen werden, wobei hypoxische Zellen eine höhere Expression von SSEA-4 aufwiesen (Abb. 3.4.2.1). Es darf jedoch nicht außer acht gelassen werden, dass neben der Assoziation mit dem pluripotenten Stadium von hES Zellen SSEA-4 auch als Marker für mesenchymale, mesodermale Stammzellen gilt (Gang et al. 2007). So steht die erhöhte Expression von SSEA-4 unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt im Einklang mit der erhöhten Expression mesodermaler Marker auf mRNA-Ebene (Abb. 3.4.2.2 B). Kontrovers zur erhöhten mesodermalen und entodermalen Differenzierung zeigten hypoxisch konvertierte

hES Zellen bereits nach einer Woche eine erhöhte Expression eines Markers für frühe Neurone, Tuj1, welches sich nach zwei Wochen noch verstärkte (Abb. 3.4.2.1 C). Die Daten zu einer verstärkten neuronalen Differenzierung unterstützen die Daten der mRNA-Analyse (Abb. 3.4.2.2 D). So ergab die mRNA-Analyse früher neuronaler, astrozytärer und oligodendrozyten-assoziiierter Marker eine Zunahme der neuronalen und glialen- Markerexpression unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt (Abb. 3.4.2.2 D). Anscheinend untergehen unter hypoxischen Bedingungen differenzierende Zellen schneller eine replikative Seneszenz, welches die erhöhte Expression der Differenzierungs-assoziierten Marker und die verlangsamte Proliferation der Zellen erklärt (Alberts 2002; Gilbert 2006).

Aufgrund der hier vorgestellten Daten, dass unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt direkt differenzierende hES Zellen eine erhöhte Expression mesodermaler, entodermaler und ektodermaler Marker zeigen und langsamer proliferieren, kann vermutet werden, dass hES und direkt konvertierende hES Zellen die in vivo Entwicklung, die Bildung der Keimscheibe und Einwanderung der extraembryonalen Gewebe des Embryos rekapitulieren (Gilbert 2006). Eine hypoxische direkte Konversion von hES Zellen in neuroepitheliale Zellen resultiert in einer Stagnation der Proliferation mit erhöhten mesodermalen und entodermalen Anteilen. Parallel dazu zeige hypoxisch direkt konvertierte Zellen eine Tendenz zur Differenzierung in neuronale Zelltypen. Eine verbesserte Ausreifung von Neuronen unter hypoxischen Bedingungen konnte bereits 2000 von Studer et al. und Morrison et al. an primären Zellen beobachtet werden (Morrison et al. 2000; Studer et al. 2000). Eine Erklärung, warum direkt konvertierte hES Zellen einen erhöhten Anteil an Tuj1 und damit neuronalen Zelltyp aufweisen, kann nicht abschließend geklärt werden, und bedarf weiterer Analysen.

Eine verbesserte Multipotenz-erhaltung neuraler Vorläuferzellen, wie sie unter anderem von Studer et al. und Morrison et al. unter hypoxischen Bedingungen beschrieben wurde, konnte bei hESNS Zellen nur bedingt beobachtet werden (Morrison et al. 2000; Studer et al. 2000; Zhu et al. 2005; Chen et al. 2007). So zeigten hESNS Zellen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt weder einen positiven noch einen negativen Einfluss auf die mRNA-Expression Multipotenz-assoziiierter Marker mit Ausnahme von CD133, welcher herunterreguliert war (Abb. 3.5.2.2). Die

Analyse Differenzierungs-assoziiertes Marker zeigte eine Marker-abhängige Herauf- oder Herunterregulation, jedoch kein klares Muster einer glialen- oder neuronalen-Differenzierung (Abb. 3.5.2.2 C, D). Auf Protein-Ebene konnten für die Multipotenz-Marker Nestin und Sox-2 keine Expressionsunterschiede festgestellt werden, welches auch für die Marker CD133, PSA-NCAM und A2B5 galt (Abb. 3.5.2.1). SSEA-1 zeigte hingegen unter hypoxischen Bedingungen eine um das Dreifache reduzierte Expression (Abb. 3.5.2.1 D). Es ist anzumerken, dass SSEA-1 auch als Marker für sich entwickelnde Neuralrücken zellen herangezogen wird (Sieber-Blum 1989; Liu et al. 1990). Somit ist vermutlich der Anteil an multipotenten hESNS Zellen, die an der Formierung des Neuralrückens partizipieren, unter hypoxischen Bedingungen reduziert, welches eine Einschränkung der Multipotenz widerspiegelt. Im Einklang damit konnte in hESNS Zellen ein um das Doppelte erhöhter Proteinanteil des frühen neuronalen Markers Tuj1 detektiert werden (Abb. 3.5.2.1 A2). Es kann spekuliert werden, dass unter Berücksichtigung der erhöhten Tuj1-Expression, hESNS Zellen die unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt kultiviert werden, leichter in einen neuronalen Phänotyp differenzieren können. Auch Studer et al., Morrison et al. und Zhu et al., um nur einige zu nennen, beschrieben den positiven Effekt hypoxischer Bedingungen während der Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen in verschiedenste neuronale Subtypen. So zeigten die Arbeitsgruppen, dass hypoxische Bedingungen die Differenzierung und das Überleben neuronaler Zellen begünstigen (Morrison et al. 2000; Studer et al. 2000; Zhu et al. 2005).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen nicht förderlich für die Pluripotenz-erhaltung ist und die Spontandifferenzierung nicht reduziert ist. Im Gegenteil, bei den in dieser Arbeit verwendeten hES Zelllinien löste die Anwendung eines niedrigen Sauerstoffgehaltes während der Kultivierung eine Reduktion des Anteils an pluripotenten Zellen und eine erhöhte Differenzierung in mesodermale und entodermale Zelltypen aus. Erstmals konnte in der hier vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass eine hypoxische Kultivierung und die direkte Konversion von hES Zellen in neurale Vorläuferzellen und die Kultivierung von hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen möglich ist. Eine Folge der hypoxischen Kultivierung ist jedoch eine erhöhte Proteinsynthese von Tuj1, welche

neben den mRNA-Ergebnissen darauf hindeutet, dass direkt konvertierte hES Zellen und hESNS Zellen, die unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt kultiviert werden, verbessert in neuronale Subtypen ausdifferenzieren können (Morrison et al. 2000; Studer et al. 2000).

### **4.3 Regulation entwicklungsbiologisch relevanter Signalwege unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt**

#### **4.3.1 Ein niedriger Sauerstoffgehalt reprimiert die Wnt-Signaltransduktion in allen drei hES Zellstadien**

Der in eine Vielzahl von Prozessen involvierte Wnt-Signalweg ist neben dem TGF $\beta$ /BMP-Signalweg ein wichtiger regulatorischer Signalweg während der Ontogenese (McMahon and Bradley 1990; Logan and Nusse 2004). In hES Zellen nimmt der Wnt-Signalweg eine regulatorische Rolle bei der Expression von Oct-4 ein und kann durch positive Oct-4 Regulation das pluripotente Stadium aufrechterhalten (Sato et al. 2004). Darüber hinaus partizipiert der Wnt-Signalweg in der Proliferation und Differenzierung von multipotenten Stammzellen (Toledo et al. 2008). Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die Regulation des Wnt-Signalweges unter hypoxischen Bedingungen in hES Zellen noch nicht untersucht, es ist jedoch bekannt, dass eine hypoxische Kultivierung von Stammzellen die  $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion reduziert (Kaidi et al. 2007). So beschrieben Kaidi und Kollegen 2007, dass unter hypoxischen Bedingungen ein Co-Transkriptionsfaktor von  $\beta$ -Catenin (Abb. 1.2.3) durch Hif1 $\alpha$  blockiert ist, dadurch die Bindung von  $\beta$ -Catenin an den LEF/TCF-Promotor und somit die Transkription von Signalwegszielgenen des Wnt-Signalweges unterbunden wird (Kaidi et al. 2007). Dadurch kann es als Folge der hypoxischen Blockierung der Wnt-Signaltransduktion in Stammzellen zu einem hypoxisch-vermittelten Zellzyklusarrest, einer Inhibierung der transkriptionalen Aktivität und einer erhöhten Apoptose kommen (Kaidi et al. 2007). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen in einer Reprimierung der Wnt-Signaltransduktion resultiert (Abb. 3.3.4.1), welche sich durch eine um das bis zu dreifach erhöhte GSK3 $\beta$  Proteinexpression, eine erniedrigte Expression direkter Wnt-Signalwegszielgene wie Nanog, Sox-2, Oct-4, Rex-1, cMyc und CyclinD1 und

direkt mit dem Signalweg assoziierten Marker  $\beta$ -Catenin äußerte (Abb. 3.3.2.2, 3.3.3.1, 3.3.3.2; Nusse 2008). Die Hypothese, dass unter hypoxischen Bedingungen die Wnt-Signaltransduktion in hES Zellen reduziert und somit die Aufrechterhaltung des pluripotenten Stadiums unter hypoxischen Bedingungen erschwert ist, kann dadurch gestärkt werden, dass verschiedenste Gruppen bereits berichteten, dass eine hypoxische Differenzierung von Embryoidkörperchen in einer höheren Ausbeute an differenzierten Derivaten, wie Kardiomyozyten (Mesoderm) resultiert (Bauwens et al. 2005; Niebruegge et al. 2008; Bianco et al. 2009). Zusätzlich dazu beobachteten Kaidi et al. an Karzinom- und humanen embryonalen Nierenzellen eine Erhöhung der Apoptose und einen G1-Zellzyklusarrest, ohne jedoch eine Veränderung in der  $\beta$ -Catenin-Expression zu detektieren (Kaidi et al. 2007). Somit kann logisch die erhöhte Apoptose und die verlangsamte Proliferation von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen erklärt werden, sie ist eine direkte Folge der erhöhten GSK3 $\beta$ -Proteinexpression und der damit verbundenen gesunkenen Wnt-Signaltransduktion und erhöhten CyclinD1-Blockierung (Haegele et al. 2003; Sato et al. 2004). Zusätzlich kann eine erhöhte GSK3 $\beta$  Konzentration direkt mit einem physiologischen Sauerstoffgehalt assoziiert werden. Flugel et al. zeigten, dass GSK3 $\beta$  an der Degradation von Hif1 $\alpha$  beteiligt ist (Flugel et al. 2007). Eine erhöhte GSK3 $\beta$ -Konzentration kann somit auch direkt eine Folge der erhöhten Stabilisierung von Hif1 $\alpha$  sein. So kann vermutet werden, dass eine erhöhte GSK3 $\beta$  Expression auch direkt einer erhöhten Hif1 $\alpha$  Stabilisierung entgegen wirkt. Auch PTEN, ein Protein des PTEN/Akt-Signalweges, ist an der Regulation und Translokation von  $\beta$ -Catenin beteiligt, so kann PTEN die Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Nukleus blockieren (He et al. 2007; Huang et al. 2007). In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte PTEN-Expression auf mRNA-Ebene detektiert werden (Abb. 3.3.4.1), welches zusammen mit einer erhöhten GSK3-Proteinexpression die These untermauert, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg und die  $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion, in hypoxisch kultivierten hES Zellen reprimiert werden und darüber hinaus auch die Funktion von CyclinD1 im Zellzyklus unterbinden kann.

In Vereinbarkeit mit den Daten von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Wnt-Signalweg in direkt konvertierten hES Zellen untersucht. Hier zeigte sich auf mRNA-Ebene eine Heraufregulation von den

Signalwegs-assoziierten Markern GSK3 $\beta$ , Lef1 und Dkk1 (Abb. 3.4.4.1). Zusätzlich zeigte sich eine um das Fünffache höhere PTEN mRNA-Expression. Auf Proteinebene konnte unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt eine deutliche, um das durchschnittlich Fünfzigfache erhöhte GSK3 $\beta$ -Konzentration detektiert werden, (Abb. 3.4.4.1). Die Reprimierung des Wnt-Signalweges bei hES Zelldifferenzierung unter hypoxischen Bedingungen spiegelt sich jedoch nicht in der Expression direkter Signalwegszielgene wieder. Im Gegenteil, direkte Signalwegszielgene wie cMyc, CyclinD1, CD44, BMP4 und L1 wiesen eine erhöhte Expression auf mRNA-Ebene auf. Entwicklungsbiologisch zeichnet sich der Wnt-Signalweg dadurch aus, dass eine Blockierung des Wnt-Signalweges in der Bildung der Kopfregion des Embryos involviert ist (Shtutman et al. 1999; Haegeler et al. 2003; Zwaka and Thomson 2005; Gilbert 2006). Somit kann spekuliert werden, dass GSK3 $\beta$  in direkt konvertierten hES Zellen zwar deutlich erhöht ist, aber nicht direkt die  $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion beeinflusst. Von GSK3 $\beta$  hingegen ist bekannt, dass es regulatorisch in den Zellzyklus eingreifen und die G1/S-Transition von Tumorzellen über CyclinD1 Phosphorylierung unterbinden kann (Diehl et al. 1998; Surjit and Lal 2007; Takahashi-Yanaga and Sasaguri 2008), welches wiederum die Stagnation der Proliferation in hypoxisch direkt konvertierten Zellen erklären könnte. Zusätzlich kann die Stagnation der Proliferation durch Daten von Kaidi et al. erklärt werden (Kaidi et al. 2007). So kann spekuliert werden, dass in direkt konvertierten Zellen Hif1 $\alpha$  mit dem TCF4-Transkriptionsfaktor interagiert und zusammen mit einer erhöhten GSK3 $\beta$ -basierten Blockierung von  $\beta$ -Catenin einen Zellzyklusarrest auslöst, welches durch die Daten zur Proliferation bestätigt werden konnte.

In neuronalen Vorläuferzellen zeichnete sich für den Wnt-Signalweg ein ähnliches Bild ab. So zeigten hESNS Zellen, die unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt kultiviert worden waren, eine erhöhte GSK3 $\beta$ -Aktivität, welches auf eine erniedrigte Wnt-Signaltransduktion hindeutet (Abb. 3.5.4.1). Dies konnte auf mRNA-Ebene durch Herunterregulation direkter Signalwegszielgene wie CyclinD1, cMyc, BMP4 bestätigt werden. Interessanterweise spielt der Wnt-Signalweg bei der Formierung des Neuralrückens eine wichtige Rolle. So wird dem Wnt-Signalweg eine Rolle in der Induktion der Entwicklung des Neuralrückens während der Embryogenese zugeordnet (Ikeya et al. 1997; Dorsky et al. 2000; Gilbert 2006). So konnte für hESNS Zellen die

Herunterregulation des Wnt-Signalweges auf Protein-Ebene durch eine erhöhte GSK3 $\beta$ -Aktivität und eine gesunkene Anzahl an SSEA-1 (Neuralrücken-assoziiertes Marker) positiven Zellen bestätigt werden. Die erhöhte GSK3 $\beta$  Expression unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt hat in hESNS Zellen jedoch nur einen geringeren Einfluss auf die Proliferation (Abb. 3.5.1.1). Es kann vermutet werden, dass unter hypoxischen Bedingungen in hESNS Zellen durch Reduktion der WNT-Signalwegsaktivität, die Bildung von Zellen, die an der Bildung des Neuralrückens partizipieren, reduziert ist. Diese Hypothese kann dadurch unterstützt werden, dass unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt die Anzahl an Zellen, die SSEA-1 exprimieren reduziert vorliegt (Abb. 3.5.2.1).

Zusammenfassend kann spekuliert werden, dass hES Zellen und daraus differenzierte Subtypen in vitro unter hypoxischen Bedingungen durch Stabilisierung von Hif1 $\alpha$  eine Blockierung des Wnt-Signalweges erfahren und damit die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Stadiums und Proliferation erschwert ist (Haegele et al. 2003; Sato et al. 2004; Kaidi et al. 2007). Darüber hinaus stellt die bereits von Kaidi et al. publizierte These, dass eine Blockierung des Wnt-Signalweges in einen Zellzyklusarrest resultiert, eine logische Erklärung für die reduzierte Proliferation hypoxischer hES Zellen und die proliferativ fast inaktiven hypoxisch konvertierten hES Zellen dar. Beide Zellstadien wiesen eine deutlich erhöhte GSK-3 $\beta$  Aktivität und reduzierte Aktivität von Signalwegzielgenen des Wnt-Signalweges unter hypoxischen Bedingungen auf. Somit kann in diesem Zusammenhang die reduzierte Proliferation und die erhöhte Apoptose logisch erklärt werden. In hESNS Zellen zeigte sich kein negativer Einfluss einer Reprimierung des Wnt-Signalweges auf die Proliferation, einzig die Fähigkeit der Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen in Neuralrückenstrukturen scheint reduziert zu sein. Eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen, direkt konvertierten hES Zellen und hESNS Zellen hat eine Reduktion der Wnt-Signaltransduktion zur Folge, hat jedoch unterschiedliche Einflüsse auf die Proliferation und den Zellphänotyp.

### **4.3.2 Ein niedriger Sauerstoffgehalt induziert abhängig vom hES Zellstadium die Notch-Signaltransduktion**

In hES Zellen kann die Expression von Notch-Rezeptoren, -Liganden und Notch-Signalweg-assoziierten Genen nachgewiesen werden, jedoch ist die Rolle des Notch-Signalweges in der Pluripotenzerhaltung von hES Zellen bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig geklärt (Walsh and Andrews 2003; Lowell et al. 2006; Noggle et al. 2006; Yu et al. 2008). So zeigten Lowell et al., dass der Notch-Signalweg in ES Zellen nicht aktiv ist, jedoch ES Zellen Rezeptoren und Liganden exprimieren, die für die Induktion der neuroektodermalen Differenzierung von ES Zellen essentiell sind (Lowell et al. 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Notch-Signalweg in hES Zellen, die unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, untersucht. Es konnten in undifferenzierten hES Zellen sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen Notch-Liganden, -Rezeptoren und Notch-Signalwegs-assoziierte Gene detektiert werden. Eine Stabilisierung der NICD unter hypoxischen Bedingungen, wie von Gustafsson et al. in neuronalen Vorläuferzellen beschrieben, konnte in hypoxischen hES Zellen nicht detektiert werden (Abb. 3.3.6.1; Gustafsson et al. 2005). Somit war unter beiden Sauerstoffgehalten keine Notch-Signalwegsaktivität detektierbar. Eine Stabilisierung der Notch-Intrazellulären Domäne nach Abspaltung von Notch durch Hif1 $\alpha$  in hypoxisch kultivierten hES Zellen scheint somit nicht gegeben zu sein. Jedoch stehen die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse kontrovers zu den Daten von Prasad et al., welche nicht bestätigt werden konnten (Prasad et al. 2009). Prasad und Kollegen zeigten, dass eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen das pluripotente Stadium über die Aktivierung des Notch-Signalweges unter hypoxischen Bedingungen erhalten kann. Prasad et al. blieben es jedoch schuldig, molekularbiologische Analysen der Notch Intrazellulären Domäne NICD und der Signalwegszielgene wie Hes1, Hey1 oder Hes5 zu präsentieren. So zeigten sie keine Analysen, die ihre Behauptungen, dass der Notch-Signalweg in die Aufrechterhaltung des pluripotenten Stadiums in hypoxisch kultivierten hES Zellen involviert ist und unterstützt. Auch stehen die Daten von Prasad et al. konträr zu den Daten von Lowell et al., die zeigten, dass der Notch-Signalweg in ES Zellen nicht aktiv ist, jedoch Rezeptoren und Liganden exprimiert werden, die für die Induktion

der neuroektodermalen Differenzierung essentiell sind (Lowell et al. 2006). Somit sind den in dieser Arbeit präsentierten Daten zum Notch-Signalweg und Hypoxie eine größere Aussagekraft zuzuordnen als den Daten von Prasad et al.. Im Einklang mit den in dieser Arbeit publizierten Daten zum Notch-Signalweg konnte unterstützend dazu kürzlich von Yu und Kollegen beschrieben werden, dass der Notch-Signalweg und eine Notch-Signalwegsaktivität nicht für den Erhalt des undifferenzierten Stadiums in hES Zellen nötig sind, welches auch schon initial von Lowell et al. beschrieben wurde (Lowell et al. 2006; Yu et al. 2008).

Der Notch-Signalweg ist zur Aufrechterhaltung des multipotenten Stammzellstadiums verschiedenster Vorläuferzellen essentiell (Gustafsson et al. 2005; Gilbert 2006). So wird die Differenzierung von myogenen, hämatopoetischen und neuralen Vorläuferzellen durch Mitglieder der Notch-Familie unterbunden (de la Pompa et al. 1997; Nofziger et al. 1999; Varnum-Finney et al. 2000; Dahlqvist et al. 2003). Erstmals wurde 2005 von Gustafsson et al. gezeigt, dass Hypoxie einen direkten, positiven Einfluss auf die Notch-Signalwegsaktivität hat (Gustafsson et al. 2005). In der hier vorliegenden Arbeit wurden hES Zellen direkt unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt unter Zugabe des BMP-Antagonisten Noggin konvertiert, so zeigten diese eine deutlich um das Fünf- bis Zehnfache erhöhte Präsenz der NICD unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 3.4.6.1). Im Einklang damit konnte auch für direkte Signalwegszielgene wie Hes1, Hey1, Hes5, CyclinD1 und cMyc eine erhöhte Expression festgestellt werden. Eine Stabilisierung von NICD unter hypoxischen Differenzierungsbedingungen konnte somit in Übereinstimmung mit den Daten von Gustafsson et al. detektiert werden. Aus entwicklungsbiologischem Gesichtspunkt ist die Induzierung der neuralen Differenzierung und die damit verbundene erhöhte Präsenz der NICD und Notch-assoziiierter Signalwegszielgene eine logische Konsequenz. So kann spekuliert werden, dass aus einer hypoxischen neuralen Differenzierung von hES Zellen ein „verstärkter“ neuraler / neuronaler Phänotyp an Zellen hervorgeht. Dies kann mit Studien von Studer et al., Morrison et al. und Zhu et al. bestätigt werden. Sie zeigten, dass eine Kultivierung unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt eine Verbesserung des Erhalts des multipotenten Stadiums hervorruft und die Differenzierung in neuronale Subtypen fördert (Morrison et al. 2000; Studer et al. 2000; Zhu et al. 2005). Eine verstärkte Differenzierung von hES

Zellen in einen neuronalen Phänotyp konnte auch in hypoxisch direkt konvertierten hES Zellen beobachtet werden. So zeigte sich auf mRNA-Ebene eine erhöhte Expression neuronaler und glialer Marker wie L1, Mash1, BLBP, GFAP und Olig2 (Abb. 3.4.2.2). Zusätzlich dazu wurde eine um das Zweifache erhöhte Proteinexpression des neuronalen Markers Tuj1 detektiert. Kontrovers zu der erhöhten Expression Differenzierungs-assoziiierter Marker konnte unter hypoxischen Konvertierungsbedingungen eine verstärkte Expression neuraler, Multipotenz-assoziiierter Marker wie Nestin, CD133, TERT, Musashi und Pax6 detektiert werden, welches vermutlich ein Resultat der erhöhten Notch-Signalwegsaktivität ist. Es kann spekuliert werden, dass eine direkte Konversion unter hypoxischen Bedingungen die Proliferation über den Wnt-Signalweg reduziert und eine verstärkte neurale/neuronale Differenzierung durch den Notch-Signalweg induziert wird. Interessanterweise scheint der Notch-Signalweg die durch die Reprimierung des Wnt-Signalweg hervorgerufene Stagnation der Proliferation direkt hypoxisch konvertierter hES Zellen nicht entgegenwirken zu können. Warum direkt konvertierte hES Zellen jedoch zusätzlich zur erhöhten Expression von ektodermalen auch eine erhöhte Expression mesodermaler und entodermaler Marker auf mRNA-Ebene zeigen, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Die Daten zur Kultivierung neuraler Vorläuferzellen unter hypoxischen Bedingungen bestätigen die bereits 2005 von Gustafsson et al. aufgestellte These, dass zum Erhalt des multipotenten Stadiums neurale Vorläuferzellen unter hypoxischen Bedingungen der Notch-Signalweg essentiell ist (Gustafsson et al. 2005). Darüber hinaus zeigten bereits verschiedenste Arbeitsgruppen, dass eine hypoxische Kultivierung von neuralen Vorläuferzellen eine verbesserte Multipotenz-erhaltung und Differenzierung in neuronale Subtypen ermöglicht (Morrison et al. 2000; Studer et al. 2000; Zhu et al. 2005). Eine erhöhte Stabilisierung von NICD unter hypoxischen Bedingungen, wie sie initial von Gustafsson beschrieben wurde, konnte in hypoxischen hESNS Zellen detektiert werden (Abb. 3.5.5.1). So konnte bei hESNS Zellen, die unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt kultiviert worden waren, eine erhöhte Expression des direkten Signalwegszielgen Hes5 auf mRNA-Ebene und auf Protein-Ebene erhöhte Expression von cMyc und der NICD gemessen werden (Abb. 3.5.3.2, Abb. 3.5.5.1). mRNA- und Proteinbiochemische Analysen zeigten,

dass die Expression Multipotenz-assoziiierter Gene und Proteine unter hypoxischen Bedingungen kaum variierte und auf Kontrollzellniveau lag (Abb. 3.5.2.2). Eine verstärkte neuronale Ausrichtung der Zellen konnte auf Protein-Ebene durch eine erhöhte Expression von Tuj1 detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten hESNS Zellen auf mRNA-Ebene nur eine geringe Streuung Differenzierungs-assoziiierter Marker (Abb. 3.5.2.1). Ergänzend dazu zeigten erste hypoxische Differenzierungsversuche von hESNS Zellen eine erhöhte Ausbildung neuronaler Phänotypen (Daten nicht gezeigt). Die hier präsentierten Daten stehen somit im Einklang mit den publizierten Ergebnissen von Studer et al., Morrison et al. und Zhu et al., um nur einige aufzuzählen (Morrison et al. 2000; Studer et al. 2000; Zhu et al. 2005). Darüber hinaus konnte erstmals die Interaktion des Notch- und Hlf1 $\alpha$ -Signalweges, wie sie von Gustafsson et al. beschrieben wurde, an hESNS Zellen demonstriert werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Notch-Signalweg in hES Zellen nicht aktiv oder auf basaler Ebene reguliert ist und mit den in dieser Arbeit verwendeten Detektionsmethoden nicht gemessen werden konnte. Darüber hinaus bestätigte sowohl die direkte Differenzierung von hES Zellen in neurale Vorläuferzellen als auch die Kultivierung von hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen die These, dass ein niedriger Sauerstoffgehalt den Multipotenz/Differenzierungsstatus auf molekularer Ebene über den Notch-Signalweg reguliert und eine Differenzierung in neuronale Subtypen begünstigt (Morrison et al. 2000; Studer et al. 2000; Gustafsson et al. 2005; Zhu et al. 2005).

### **4.3.3 Ein niedriger Sauerstoffgehalt induziert abhängig vom hES Zellstadium die BMP-Signaltransduktion**

Wie schon in der Einleitung erwähnt nimmt der TGF $\beta$ /BMP-Signalweg eine zentrale Rolle im Erhalt des pluripotenten Stadiums ein (James et al. 2005; Rao and Zandstra 2005; Vallier et al. 2005). So ist in hES Zellen die Smad2/3-Signaltransduktion essentiell mit dem Erhalt des pluripotenten Stadiums verbunden. Ergänzend dazu wird eine durch BMP/GDF ausgelöste Smad1/5/8-Phosphorylierung direkt mit einer frühen Differenzierung von hES Zellen assoziiert (James et al. 2005; Rao and Zandstra 2005; Vallier et al. 2005). Unter hypoxischen Bedingungen konnte in hES

Zellen eine erhöhte Aktivität von GDF3 und Smad1 auf mRNA-Ebene, ein um das Doppelte erhöhter Anteil der Smad1/5/8-Phosphorylierung und ein um die Hälfte reduzierter Anteil an phosphoryliertem Smad2/3 Protein detektiert werden (Abb. 3.5.5.1). Die erhöhte Smad1/5/8-Signaltransduktion konnte auch durch die gesunkene Expression des Korepressors cMyc und die gesunkene mRNA-Expression direkter Signalwegs-assoziiierter Gene wie BMP2 und Smad1 bestätigt werden. Auch zeigten die mit dem TGF $\beta$ -Signalweg assoziierten Gene Follistatin und Gremlin eine um die Hälfte gesunkene Expression (Abb.3.5.5.1). Im Gegensatz dazu zeigte TGF $\beta$ 1 auf mRNA-Ebene eine um das Dreifache erhöhte Expression auf, welches kontrovers zu den anderen Resultaten steht. Es konnte jedoch zusätzlich eine erhöhte Expression eines negativen Regulators des PI3K/Akt-Signalweges, PTEN, detektiert werden, welches auf eine Reprimierung des TGF $\beta$ - und eine erhöhte BMP-Signalwegsaktivität hindeutet. So wird in murinen ES Zellen PTEN direkt mit einer erniedrigten Proliferation, Überleben und erhöhter Differenzierung korreliert (Guo and Wang 2009). Eine erhöhte BMP-Signalwegsaktivität, z.B. von BMP4, steht darüber hinaus im direkten Zusammenhang mit einer Differenzierung von hES Zellen in Trophektoderm, der Ausbildung des Primitivstreifens und der Entwicklung von Mesoderm und Entoderm (Xu et al. 2002; Gilbert 2006; Watabe and Miyazono 2009). Auch konnte in hES Zellen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt auf mRNA-Ebene eine erhöhte Präsenz mesodermaler und entodermaler Marker detektiert werden (Abb. 3.3.2.2). Zusammen mit der erhöhten BMP-Signaltransduktion über Smad1/5/8 und einer Morphologie, die auf Differenzierung hindeutet, kann spekuliert werden, dass eine hypoxische Kultivierung initial die Differenzierung von hES Zellen auslöst. Es kann vermutet werden, dass eine hypoxische Kultivierung eine erhöhte Smad1/5/8 Signaltransduktion in hES Zellen initiiert und eine erhöhte Spontandifferenzierung auslöst. Vermutlich spiegeln hES Zellen, die unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt kultiviert werden, die in vivo Differenzierung der Inneren Zellmasse wieder. Die Hypothese kann durch die erhöhte Expression mesodermaler, entodermaler und ektodermaler Marker auf mRNA-Ebene, eine erhöhte Smad1/5/8 Phosphorylierung, eine gesunkenen Smad2/3-Phosphorylierung und die gesunkene Expression Pluripotenz-assoziiierter Marker, wie Nanog, Sox-2, Tra-1-60, Tra-1-81, gestützt werden. Zusätzlich kann

diese Vermutung durch die vorangegangenen Studien von Vallier et al., James et al., Peerani et al. 2007, Sumi et al. 2008 unterstützt werden (James et al. 2005; Vallier et al. 2005; Sumi et al. 2008). Auch kann die These, dass hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen eine höhere Spontandifferenzierungsrate haben, dadurch bestätigt werden, dass eine Differenzierung unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt die Bildung mesodermaler und entodermaler Zellen unterstützt und darüber hinaus der Erhalt des neuralen Vorläuferzellstadiums unter hypoxischen Bedingungen vereinfacht ist (Caniggia et al. 2000; Morrison et al. 2000; Studer et al. 2000; Bauwens et al. 2005; Gustafsson et al. 2005; Zhu et al. 2005; Koay and Athanasiou 2008; Bianco et al. 2009; Niebruegge et al. 2009). Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Kultivierung von hES Zellen unter einem physiologisch, niedrigen Sauerstoffgehalt eine Reduktion der TGF $\beta$ - und erhöhte BMP-Signaltransduktion auslöst, welches die *in vivo* Differenzierung der Inneren Zellmasse in den Primitivstreifen und extraembryonale Ektoderm widerspiegelt (Abb. 1.2.1; Watabe and Miyazono 2009).

Die direkte Konversion von hES Zellen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt in Gegenwart des BMP-Antagonisten Noggin resultierte nicht, wie vermutet, in einer Herunterregulation der Smad1/5/8-Signaltransduktion. Im Gegensatz zu normoxischen, zeigten hypoxisch differenzierte hES Zellen auf mRNA-Ebene ein um das Drei- bis Fünfunddreißigfache Heraufregulation aller TGF $\beta$ /BMP-Signalwegs-assoziiierter Marker mit Ausnahme von TGF $\beta$ 1 (Abb. 3.4.5.1). Im Gegensatz zu Kontrollen, bei denen proteinbiochemisch nur eine basale Expression von sowohl phosphoryliertem Smad1/5/8 als auch Smad2/3 detektiert werden konnte, zeigten hypoxisch direkt konvertierte hES Zellen eine um das Vierfache erhöhte Expression von Smad1/5/8. Die unter normoxischen Bedingungen gemessene basale Expression von Smad1/5/8 und Smad2/3 ist eine direkte Reaktion auf die Anwendung des BMP-Antagonisten Noggin, der die Smad1/5/8 Signaltransduktion inhibiert und damit die Differenzierung in Zellen des Primitivstreifens (Mesodermal und Entoderm) unterdrückt. Warum unter hypoxischen Bedingungen, trotz der Gabe des BMP-Antagonisten Noggin, auch nach Langzeitkultivierung ein Signal an pSmad1/5/8 detektiert werden konnte, kann nur spekuliert werden. Die Induktion der Vaskularisierung in der frühen Embryonalentwicklung über Hif1 $\alpha$  ist essentiell für die

Sauerstoffversorgung des sich implantierenden Embryos (Gilbert 2006; Simon and Keith 2008). Vermutlich wird Smad1/5/8 unter hypoxischen Bedingungen durch Interaktion mit Hif1 $\alpha$  stabilisiert, um die Vaskularisierung des Embryos zu gewährleisten. So konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass hES Zellen, die unter einem physiologischen Sauerstoffgehalt differenzieren, einen stabilen Kardiomyozyten-Zelltyp ausbilden (Bauwens et al. 2005; Niebruegge et al. 2008). Dies unterstützt die These, dass hypoxisch kultivierte hES Zellen verstärkt in Zellen, die dem Primitivstreifen zugehören, differenzieren. Vermutlich ist der BMP-Antagonist Noggin nicht in der Lage, diesem Phänomen während einer Differenzierung in neurale Vorläuferzellen entgegenzusteuern. Diesbezüglich konnte kürzlich in Glioblastomzellen der BMP-Signalweg als ein weiterer Signalweg ermittelt werden, der unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt mit Hif1 $\alpha$  interagiert und darüber die terminale Differenzierung reprimiert (Pistollato et al. 2009; Pistollato et al. 2009). Auch kann über die erhöhte Smad1/5/8-Signalwegsaktivität, zusammen mit der Reduktion des Wnt-Signalweg, die Stagnation der Proliferation und die erhöhte Apoptose erklärt werden. So sind BMPs (Smad1/5/8-Signaltransduktion) ein Regulator der dorsoventralen Orientierung während der Embryonalentwicklung und induzieren die astrogliale Differenzierung, den mitotischen Arrest und die Apoptose von Stammzellen des Zentralen Nervensystems (Panchision et al. 2001; Chen and Panchision 2007). Zusätzlich limitiert Noggin die gliale Differenzierung und induziert die neuronale Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen (Alvarez-Buylla and Lim 2004; Lim et al. 2007). Somit kann anhand der oben aufgeführten Publikationen der Zellzyklusarrest und die erhöhte Expression von Tuj1 fundiert erklärt werden.

In murinen ES Zellen unterbindet die TGF $\beta$ /BMP-Signaltransduktion die neurale Induktion und stimuliert die Formierung der Epidermis (Kawasaki et al. 2000; Ying et al. 2003). In Übereinstimmung mit murinen ES Zellen konnte in humanen neuronalen Vorläuferzellen bei Kultivierung unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt die Inhibierung des TGF $\beta$ /BMP-Signalweges beobachtet werden (Abb. 3.5.6.1) So wiesen neurale Vorläuferzellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert worden waren, einen deutlich um das Dreifache reduzierten Anteil an phosphoryliertem Smad1/5/8 auf Protein-Ebene und eine um das Fünf- bis Zehnfache gesunkene Expression von Signalwegs-assoziierten Markern wie BMP2, BMP4, GDF3, Smad1

auf, um nur einige aufzuzählen (Abb. 3.5.6.1). Hingegen zeigte phosphoryliertes Smad2/3 zwar eine leichte Erhöhung unter hypoxischen Bedingungen, jedoch war diese Erhöhung nur marginal und nicht statistisch signifikant. Die Blockierung der Smad1/5/8-Signaltransduktion in hESNS Zellen unter hypoxischen Bedingungen kann über die Konkurrenz mit Hif1 $\alpha$  und Unterdrückung durch erhöhte Stabilisierung mit dem Notch-Signalweg erklärt werden (Pistollato et al. 2007; Panchision 2009; Pistollato et al. 2009). Bereits 2007 zeigten Pistollato und Kollegen, dass ein niedriger Sauerstoffgehalt einen reprimierenden Effekt auf die BMP-Signaltransduktion in ZNS Vorläuferzellen hat, welche 2009 in Glioblastom-Stammzellen bestätigt werden konnte (Pistollato et al. 2007; Pistollato et al. 2009). Somit kann für hypoxisch kultivierte neurale Vorläuferzellen spekuliert werden, dass eine hypoxische Kultivierung den BMP-Signalweg in Interaktion mit dem Notch- und Hif1 $\alpha$ -Signalweg inhibiert und die neurale Differenzierung reprimiert wird. Dies konnte durch die Unterdrückung der Smad1/5/8 Signaltransduktion bewiesen werden, und darüber hinaus die nicht veränderte Expression von mit dem multipotenten Stadium assoziierten Markern wie Nestin Sox-2, CD44, CD133, sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene (Abb. 3.5.2.1, Abb. 3.5.2.2). Warum jedoch hypoxisch kultivierte hESNS Zellen eine verstärkte Expression von Tuj1 aufweisen konnte nicht eindeutig geklärt werden und bedarf weiterer Analysen.

Zusammenfassend kann für hES Zellen, abhängig vom Differenzierungsstadium, behauptet werden, dass eine Kultivierung unter einem physiologisch niedrigen Sauerstoffgehalt den TGF $\beta$ /BMP-Signalweg in einer induzierenden oder reprimierenden Form beeinflusst (Keller 1995; Keller 2005; Gilbert 2006; Irion et al. 2008; Murry and Keller 2008; Nostro et al. 2008).

In Interaktion mit anderen entwicklungsbiologisch relevanten Signalwegen wie dem Wnt/ $\beta$ -Catenin, Notch-Signalweg und der Proliferation ergibt sich eine Folge von Bildern hypoxisch kultivierter hES Zellen und deren differenzierter Derivate, welche der in vivo Entwicklung und Regulation der einzelnen Signalwege während der Differenzierung der Inneren Zellmasse in die drei Keimblätter und weiteren Ausreifung nahe kommt und diese widerspiegelt (Gilbert 2006).

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurden erstmals ausführlich die verschiedenen Effekte einer Kultivierung von hES Zellen und unterschiedlichen Differenzierungsstadien unter einem physiologisch, niedrigem Sauerstoffgehalt analysiert. Für die Kultivierung von hES Zellen und deren differenzierenden Derivate wurde zunächst eine Kultivierungsmethode anhand von hES Zellen entwickelt, die eine hypoxische Kultivierung ohne Gelöstsauerstoffschwankungen ermöglichte. Darüber hinaus konnte erstmals in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die direkte Konversion von hES Zellen in neurale Vorläuferzellen und die Kultivierung von hESNS Zellen unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt möglich ist. Die Kultivierung der verschiedenen Differenzierungsstadien von hES Zellen löst abhängig von diesem Stadium eine Reduktion der Proliferation hervor. Zur genaueren Analyse der Ursache der verlangsamten, oder stagnierenden Proliferation wurde die G1/S-Transition untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die G1/S-Transition von hypoxisch kultivierten hES Zellen und deren differenzierenden Derivaten reduziert vorliegt. Darüber hinaus wirkt sich ein niedriger Sauerstoffgehalt nicht förderlich auf die Pluripotenz-Erhaltung und Reduktion der Spontandifferenzierung von hES Zellen aus, welches durch die gesunkene RNA- und Protein-Expression Pluripotenz-assoziiierter Marker wie Tra-1-60, Oct-4, Sox-2 oder auch Nanog gezeigt werden konnte. Die gesunkene Fähigkeit zur Pluripotenz-Erhaltung unter hypoxischen Bedingungen konnte auch durch die erhöhte RNA-Expression von Keimblatt-assoziierten Markern wie  $\alpha$ -Fetoprotein, Brachyury, Vimentin und Desmin gezeigt werden. Für direkt in neuroepithelialen Zellen konvertierte hES Zellen und hESNS Zellen konnte keine verbesserte Multipotenz-erhaltung unter einem niedrigen Sauerstoffgehalt festgestellt werden. Ergänzend dazu konnte demonstriert werden, dass ein hypoxischer Sauerstoffgehalt während der direkten Konversion von hES Zellen und Kultivierung von hESNS Zellen förderlich für die Einleitung der Differenzierung in neuronale Subtypen sein kann, welches neben dem Marker Tuj1 auf Protein-Ebene auch auf mRNA-Ebene durch die Marker L1, Mash1, BLBP und GFAP bestätigt werden konnte.

Welchen Einfluss ein niedriger Sauerstoffgehalt auf entwicklungsbiologisch relevante Signalwege in hES Zellen und deren einzelnen Differenzierungsstadien hat, wurde in dieser Promotion erstmals ausführlich gezeigt. So wird bei einer Kultivierung von hES Zellen die G1/S-Transition und der Wnt-Signalweg durch erhöhte GSK3 $\beta$ -Proteinexpression reprimiert und der BMP-Signalweg durch erhöhte Smad1/5/8-Signaltransduktion induziert. Diese Signalwegregulation unter einem physiologisch niedrigen Sauerstoffgehalt ist ein erstes Indiz für die Einleitung der Differenzierung von hES Zellen in mesodermale und entodermale Zellen, und spiegelt die in vivo Entwicklung und Regelung der einzelnen Signalwege im Primitivstreifen wieder. Diese Feststellung kann auch von der kürzlich veröffentlichten Publikation von Prado-Lopez et al. bestätigt werden (Prado-Lopez et al. 2010). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es mit einem niedrigen Sauerstoffgehalt möglich ist, die für die Entwicklungsbiologie wichtigen Signalwege, wie dem Wnt-, TGF $\beta$ /BMP- und dem Notch-Signalweg in hES Zellen und deren differenzierten Derivaten zu beeinflussen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten können die Grundlage für ausführliche Analysen des Effektes eines niedrigen Sauerstoffgehaltes auf verschiedenste Signalwege, die in der Embryonalentwicklung involviert sind, an hES Zellen und differenzierten Derivaten bieten. So könnte man unter zu Hilfenahme von Differenzierungsfaktoren und hypoxischen Bedingungen einfacher und gezielter hES Zellen in die verschiedensten Zelltypen ausreifen lassen, als es eine konventionelle, normoxische Kultivierung erlaubt. Darüber hinaus bietet eine hypoxische Kultivierung und Differenzierung die Möglichkeit die in vivo Entwicklung des humanen Embryos in vitro nachzuvollziehen. Eine hypoxische Kultivierung von hES Zellen und differenzierten Phänotypen bietet zusätzlich die Möglichkeit pharmakologische Screenings unter in vivo Bedingungen zu simulieren und eröffnet somit ein neues Feld für pharmazeutische Industrie. So könnte eine hypoxische Kultivierung es ermöglichen in vitro die in vivo Embryotoxizität von Medikamenten nachzuvollziehen. Zusätzlich könnte mit der Verwendung eines niedrigen Sauerstoffgehaltes während der Kultivierung und Differenzierung von z.B. krankheitsspezifischen iPS Zellen in Zukunft erlauben, die Wirkung und Wirksamkeit von pharmakologischen Wirkstoffen näher an der in vivo Situation zu evaluieren. Dies könnte ein Beitrag zu einem verbesserten pharmazeutischen Screening oder auch personalisierten Medizin sein.

## 6. Literaturverzeichnis

Abu-Khalil, A., L. Fu, et al. (2004). "Wnt genes define distinct boundaries in the developing human brain: implications for human forebrain patterning." *J Comp Neurol* 474(2): 276-88.

Alberts (2002). *Molecular Biology Of The Cell*, Garland Science Taylor & Francis Group.

Ali, J., W. K. Whitten, et al. (1993). "Effect of culture systems on mouse early embryo development." *Hum Reprod* 8(7): 1110-4.

Alvarez-Buylla, A. and D. A. Lim (2004). "For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain." *Neuron* 41(5): 683-6.

Alvarez-Dolado, M., R. Pardal, et al. (2003). "Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes." *Nature* 425(6961): 968-73.

Amit, M., M. K. Carpenter, et al. (2000). "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture." *Dev Biol* 227(2): 271-8.

Androutsellis-Theotokis, A., R. R. Leker, et al. (2006). "Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo." *Nature* 442(7104): 823-6.

Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, et al. (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." *Science* 284(5415): 770-6.

Assady, S., G. Maor, et al. (2001). "Insulin production by human embryonic stem cells." *Diabetes* 50(8): 1691-7.

Barberi, T., P. Klivenyi, et al. (2003). "Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice." *Nat Biotechnol* 21(10): 1200-7.

Bauwens, C., T. Yin, et al. (2005). "Development of a perfusion fed bioreactor for embryonic stem cell-derived cardiomyocyte generation: oxygen-mediated enhancement of cardiomyocyte output." *Biotechnol Bioeng* 90(4): 452-61.

Besser, D. (2004). "Expression of nodal, lefty-a, and lefty-B in undifferentiated human embryonic stem cells requires activation of Smad2/3." *J Biol Chem* 279(43): 45076-84.

Beurel, E. and R. S. Jope (2006). "The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways." *Prog Neurobiol* 79(4): 173-89.

Bianco, C., C. Cotten, et al. (2009). "Cripto-1 is required for hypoxia to induce cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells." *Am J Pathol* 175(5): 2146-58.

Blancher, C., J. W. Moore, et al. (2000). "Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines." *Cancer Res* 60(24): 7106-13.

Boiani, M. and H. R. Scholer (2005). "Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(11): 872-84.

Bolton, V. N. and P. R. Braude (1987). "Development of the human preimplantation embryo in vitro." *Curr Top Dev Biol* 23: 93-114.

Bradley, A., M. Evans, et al. (1984). "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines." *Nature* 309(5965): 255-6.

Brandenberger, R., H. Wei, et al. (2004). "Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation." *Nat Biotechnol* 22(6): 707-16.

Brazelton, T. R., F. M. Rossi, et al. (2000). "From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice." *Science* 290(5497): 1775-9.

Brustle, O., K. N. Jones, et al. (1999). "Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants." *Science* 285(5428): 754-6.

- Cabrera, C. V., M. C. Alonso, et al. (1987). "Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene." *Cell* 50(4): 659-63.
- Cadigan, K. M. and R. Nusse (1997). "Wnt signaling: a common theme in animal development." *Genes Dev* 11(24): 3286-305.
- Calegari, F. and W. B. Huttner (2003). "An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis." *J Cell Sci* 116(Pt 24): 4947-55.
- Cameron, C. M., F. Harding, et al. (2008). "Activation of hypoxic response in human embryonic stem cell-derived embryoid bodies." *Exp Biol Med (Maywood)* 233(8): 1044-57.
- Caniggia, I., J. Winter, et al. (2000). "Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia." *Placenta* 21 Suppl A: S25-30.
- Carmeliet, P., Y. Dor, et al. (1998). "Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis." *Nature* 394(6692): 485-90.
- Chambers, I., D. Colby, et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." *Cell* 113(5): 643-55.
- Chambers, S. M., C. A. Fasano, et al. (2009). "Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling." *Nat Biotechnol* 27(3): 275-80.
- Chen, H. F., H. C. Kuo, et al. (2009). "A reduced oxygen tension (5%) is not beneficial for maintaining human embryonic stem cells in the undifferentiated state with short splitting intervals." *Hum Reprod* 24(1): 71-80.
- Chen, H. L. and D. M. Panchision (2007). "Concise review: bone morphogenetic protein pleiotropism in neural stem cells and their derivatives--alternative pathways, convergent signals." *Stem Cells* 25(1): 63-8.
- Chen, H. L., F. Pistollato, et al. (2007). "Oxygen Tension Regulates Survival and Fate of Mouse CNS Precursors at Multiple Levels." *Stem Cells*.
- Clarke, L. and D. van der Kooy (2009). "Low oxygen enhances primitive and definitive neural stem cell colony formation by inhibiting distinct cell death pathways." *Stem Cells* 27(8): 1879-86.
- Colas, J. F. and G. C. Schoenwolf (2001). "Towards a cellular and molecular understanding of neurulation." *Dev Dyn* 221(2): 117-45.
- Collignon, J., S. Sockanathan, et al. (1996). "A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2." *Development* 122(2): 509-20.
- Cosse, J. P. and C. Michiels (2008). "Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression." *Anticancer Agents Med Chem* 8(7): 790-7.
- Covello, K. L., J. Kehler, et al. (2006). "HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth." *Genes Dev* 20(5): 557-70.
- Cowan, C. A., J. Atienza, et al. (2005). "Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells." *Science* 309(5739): 1369-73.
- Daheron, L., S. L. Opitz, et al. (2004). "LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells." *Stem Cells* 22(5): 770-8.
- Dahlqvist, C., A. Blokzijl, et al. (2003). "Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation." *Development* 130(24): 6089-99.
- de la Pompa, J. L., A. Wakeham, et al. (1997). "Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis." *Development* 124(6): 1139-48.
- Deng, J., R. Shoemaker, et al. (2009). "Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming." *Nat Biotechnol* 27(4): 353-60.
- Diehl, J. A., M. Cheng, et al. (1998). "Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization." *Genes Dev* 12(22): 3499-511.

- Dimos, J. T., K. T. Rodolfa, et al. (2008). "Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons." *Science* 321(5893): 1218-21.
- Dorsky, R. I., R. T. Moon, et al. (2000). "Environmental signals and cell fate specification in premigratory neural crest." *Bioessays* 22(8): 708-16.
- Dorsky, R. I., D. W. Raible, et al. (2000). "Direct regulation of nacre, a zebrafish MITF homolog required for pigment cell formation, by the Wnt pathway." *Genes Dev* 14(2): 158-62.
- Dumoulin, J. C., C. J. Meijers, et al. (1999). "Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture." *Hum Reprod* 14(2): 465-9.
- Dumoulin, J. C., R. C. Vanvuchelen, et al. (1995). "Effect of oxygen concentration on in vitro fertilization and embryo culture in the human and the mouse." *Fertil Steril* 63(1): 115-9.
- Evans, M. J. (1972). "The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells." *J Embryol Exp Morphol* 28(1): 163-76.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." *Nature* 292(5819): 154-6.
- Ezashi, T., P. Das, et al. (2005). "Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(13): 4783-8.
- Fischer, B. and B. D. Bavister (1993). "Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits." *J Reprod Fertil* 99(2): 673-9.
- Flugel, D., A. Gorch, et al. (2007). "Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner." *Mol Cell Biol* 27(9): 3253-65.
- Forristal, C. E., K. L. Wright, et al. "Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions." *Reproduction* 139(1): 85-97.
- Forristal, C. E., K. L. Wright, et al. (2009). "Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions." *Reproduction* 139(1): 85-97.
- Forsyth, N. R., A. Musio, et al. (2006). "Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities." *Cloning Stem Cells* 8(1): 16-23.
- Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." *Science* 287(5457): 1433-8.
- Gage, F. H., J. Ray, et al. (1995). "Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS." *Annu Rev Neurosci* 18: 159-92.
- Gang, E. J., D. Bosnakovski, et al. (2007). "SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow." *Blood* 109(4): 1743-51.
- Garcia-Castro, M. I., C. Marcelle, et al. (2002). "Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer." *Science* 297(5582): 848-51.
- Gassmann, M., J. Fandrey, et al. (1996). "Oxygen supply and oxygen-dependent gene expression in differentiating embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(7): 2867-72.
- Gerrard, L., L. Rodgers, et al. (2005). "Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling." *Stem Cells* 23(9): 1234-41.
- Gilbert, S. F. (2006). "Developmental Biology." eighth edition.
- Glickstein, S. B., J. A. Monaghan, et al. (2009). "Cyclin D2 is critical for intermediate progenitor cell proliferation in the embryonic cortex." *J Neurosci* 29(30): 9614-24.
- Goda, N., H. E. Ryan, et al. (2003). "Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia." *Mol Cell Biol* 23(1): 359-69.
- Gorman, A. M. (2008). "Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling." *J Cell Mol Med* 12(6A): 2263-80.

- Gott, A. L., K. Hardy, et al. (1990). "Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos." *Hum Reprod* 5(1): 104-8.
- Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1985). "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts." *Cell* 43(2 Pt 1): 405-13.
- Gumbiner, B. M. (1993). "Breaking through the tight junction barrier." *J Cell Biol* 123(6 Pt 2): 1631-3.
- Guo, X. and X. F. Wang (2009). "Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways." *Cell Res* 19(1): 71-88.
- Gustafsson, M. V., X. Zheng, et al. (2005). "Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state." *Dev Cell* 9(5): 617-28.
- Haegel, L., B. Ingold, et al. (2003). "Wnt signalling inhibits neural differentiation of embryonic stem cells by controlling bone morphogenetic protein expression." *Mol Cell Neurosci* 24(3): 696-708.
- Hanna, J., M. Wernig, et al. (2007). "Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin." *Science* 318(5858): 1920-3.
- He, T. C., A. B. Sparks, et al. (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." *Science* 281(5382): 1509-12.
- He, X. C., T. Yin, et al. (2007). "PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis." *Nat Genet* 39(2): 189-98.
- Henderson, J. K., J. S. Draper, et al. (2002). "Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens." *Stem Cells* 20(4): 329-37.
- Huang, W., H. Y. Chang, et al. (2007). "GSK3 beta mediates suppression of cyclin D2 expression by tumor suppressor PTEN." *Oncogene* 26(17): 2471-82.
- Huangfu, D., R. Maehr, et al. (2008). "Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds." *Nat Biotechnol* 26(7): 795-7.
- Iannaccone, P. M., G. U. Taborn, et al. (1994). "Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras." *Dev Biol* 163(1): 288-92.
- Iavarone, A. and J. Massague (1999). "E2F and histone deacetylase mediate transforming growth factor beta repression of cdc25A during keratinocyte cell cycle arrest." *Mol Cell Biol* 19(1): 916-22.
- Ikeya, M., S. M. Lee, et al. (1997). "Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors." *Nature* 389(6654): 966-70.
- Irion, S., M. C. Nostro, et al. (2008). "Directed differentiation of pluripotent stem cells: from developmental biology to therapeutic applications." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 101-10.
- James, D., A. J. Levine, et al. (2005). "TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells." *Development* 132(6): 1273-82.
- Jeong, C. H., H. J. Lee, et al. (2007). "HIF-1alpha inhibits self-renewal of mouse embryonic stem cells in vitro via negative regulation of the LIF-Stat3 pathway." *J Biol Chem*.
- Jones, D. L. and A. J. Wagers (2008). "No place like home: anatomy and function of the stem cell niche." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(1): 11-21.
- Kaidi, A., A. C. Williams, et al. (2007). "Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia." *Nat Cell Biol* 9(2): 210-7.
- Kawasaki, H., K. Mizuseki, et al. (2000). "Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity." *Neuron* 28(1): 31-40.
- Kawasaki, Y., T. Senda, et al. (2000). "Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling." *Science* 289(5482): 1194-7.
- Kea, B., J. Gebhardt, et al. (2007). "Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of in vitro fertilization." *Fertil Steril* 87(1): 213-6.

- Kehat, I., D. Kenyagin-Karsenti, et al. (2001). "Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes." *J Clin Invest* 108(3): 407-14.
- Kehat, I., L. Khimovich, et al. (2004). "Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells." *Nat Biotechnol* 22(10): 1282-9.
- Keller, G. (2005). "Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine." *Genes Dev* 19(10): 1129-55.
- Keller, G. M. (1995). "In vitro differentiation of embryonic stem cells." *Curr Opin Cell Biol* 7(6): 862-9.
- Kim, H. S., S. K. Oh, et al. (2005). "Methods for Derivation of Human Embryonic Stem Cells." *Stem Cells*.
- Kinder, S. J., T. E. Tsang, et al. (1999). "The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo." *Development* 126(21): 4691-701.
- Kishi, J., Y. Noda, et al. (1991). "Block to development in cultured rat 1-cell embryos is overcome using medium HECM-1." *Hum Reprod* 6(10): 1445-8.
- Klimanskaya, I., Y. Chung, et al. (2006). "Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres." *Nature* 444(7118): 481-5.
- Klimanskaya, I., Y. Chung, et al. (2007). "Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres." *Nat Protoc* 2(8): 1963-72.
- Klimanskaya, I., Y. Chung, et al. (2005). "Human embryonic stem cells derived without feeder cells." *Lancet* 365(9471): 1636-41.
- Koay, E. J. and K. A. Athanasiou (2008). "Hypoxic chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells enhances cartilage protein synthesis and biomechanical functionality." *Osteoarthritis Cartilage* 16(12): 1450-6.
- Koch, P., T. Opitz, et al. (2009). "A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9): 3225-30.
- Kopan, R. (2002). "Notch: a membrane-bound transcription factor." *J Cell Sci* 115(Pt 6): 1095-7.
- Korinek, V., N. Barker, et al. (1997). "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma." *Science* 275(5307): 1784-7.
- Koshiji, M. and L. E. Huang (2004). "Dynamic balancing of the dual nature of HIF-1alpha for cell survival." *Cell Cycle* 3(7): 853-4.
- Koshiji, M., Y. Kageyama, et al. (2004). "HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc." *Embo J* 23(9): 1949-56.
- Kowalczyk, A., R. K. Filipkowski, et al. (2004). "The critical role of cyclin D2 in adult neurogenesis." *J Cell Biol* 167(2): 209-13.
- Kurosawa, H., M. Kimura, et al. (2006). "Effect of oxygen on in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells." *J Biosci Bioeng* 101(1): 26-30.
- Lai, E. C. (2004). "Notch signaling: control of cell communication and cell fate." *Development* 131(5): 965-73.
- Lako, M., I. Neganova, et al. (2009). "G1 to S transition and pluripotency: two sides of the same coin?" *Cell Cycle* 8(8): 1108-9.
- Lange, C., W. B. Huttner, et al. (2009). "Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors." *Cell Stem Cell* 5(3): 320-31.
- Lecourtois, M. and F. Schweisguth (1998). "Indirect evidence for Delta-dependent intracellular processing of notch in Drosophila embryos." *Curr Biol* 8(13): 771-4.

- Lee, G., H. Kim, et al. (2007). "Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells." *Nat Biotechnol* 25(12): 1468-75.
- Lee, Y. M., C. H. Jeong, et al. (2001). "Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development." *Dev Dyn* 220(2): 175-86.
- Leese, H. J. (1995). "Metabolic control during preimplantation mammalian development." *Hum Reprod Update* 1(1): 63-72.
- Levenstein, M. E., T. E. Ludwig, et al. (2006). "Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal." *Stem Cells* 24(3): 568-74.
- Ley (2005). Kultivierung humaner embryonaler Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen. Diplomarbeit, Fachhochschule Weihenstephan: 1-72.
- Li, J. and R. H. Foote (1993). "Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen." *J Reprod Fertil* 98(1): 163-7.
- Li, X. J., Z. W. Du, et al. (2005). "Specification of motoneurons from human embryonic stem cells." *Nat Biotechnol* 23(2): 215-21.
- Lim, D. A., Y. C. Huang, et al. (2007). "The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies." *Neurosurg Clin N Am* 18(1): 81-92, ix.
- Liu, L. and M. C. Simon (2004). "Regulation of transcription and translation by hypoxia." *Cancer Biol Ther* 3(6): 492-7.
- Liu, S., D. A. Wilcox, et al. (1990). "Developing neural crest cells in culture: correlation of cytochrome oxidase activity with SSEA-1 and dopamine-beta-hydroxylase immunoreactivity." *Brain Res* 535(2): 271-80.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810.
- Loh, Y. H., Q. Wu, et al. (2006). "The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells." *Nat Genet* 38(4): 431-40.
- Lowell, S., A. Benchoua, et al. (2006). "Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells." *PLoS Biol* 4(5): e121.
- Ludwig, T. E., M. E. Levenstein, et al. (2006). "Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions." *Nat Biotechnol* 24(2): 185-7.
- Ma, D. K., M. A. Bonaguidi, et al. (2009). "Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system." *Cell Res* 19(6): 672-82.
- Maltepe, E. and M. C. Simon (1998). "Oxygen, genes, and development: an analysis of the role of hypoxic gene regulation during murine vascular development." *J Mol Med* 76(6): 391-401.
- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12): 7634-8.
- Masuda, S., M. Okano, et al. (1994). "A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes." *J Biol Chem* 269(30): 19488-93.
- May, B. C., C. Govaerts, et al. (2006). "Developing therapeutics for the diseases of protein misfolding." *Neurology* 66(2 Suppl 1): S118-22.
- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." *Science* 276(5309): 66-71.
- McKiernan, S. H. and B. D. Bavister (1990). "Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage." *Biol Reprod* 43(3): 404-13.
- McMahon, A. P. and A. Bradley (1990). "The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain." *Cell* 62(6): 1073-85.
- Menendez, P., C. Bueno, et al. (2006). "Human embryonic stem cells: A journey beyond cell replacement therapies." *Cytotherapy* 8(6): 530-41.

- Mezey, E., K. J. Chandross, et al. (2000). "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow." *Science* 290(5497): 1779-82.
- Mitsui, K., Y. Tokuzawa, et al. (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." *Cell* 113(5): 631-42.
- Molofsky, A. V., R. Pardal, et al. (2004). "Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal." *Curr Opin Cell Biol* 16(6): 700-7.
- Moreadith, R. W. and K. H. Graves (1992). "Derivation of pluripotential embryonic stem cells from the rabbit." *Trans Assoc Am Physicians* 105: 197-203.
- Morrison, S. J., M. Csete, et al. (2000). "Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells." *J Neurosci* 20(19): 7370-6.
- Morriss, G. M. and D. A. New (1979). "Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial neural folds and neural crest in cultured rat embryos." *J Embryol Exp Morphol* 54: 17-35.
- Murray, P. and D. Edgar (2004). "The topographical regulation of embryonic stem cell differentiation." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359(1446): 1009-20.
- Murry, C. E. and G. Keller (2008). "Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development." *Cell* 132(4): 661-80.
- Nagafuchi, A. and M. Takeichi (1989). "Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin." *Cell Regul* 1(1): 37-44.
- Nasr-Esfahani, M. H., N. J. Winston, et al. (1992). "Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo in vitro." *J Reprod Fertil* 96(1): 219-31.
- Neganova, I. and M. Lako (2008). "G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells." *J Anat* 213(1): 30-44.
- Neganova, I., X. Zhang, et al. (2009). "Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells." *Oncogene* 28(1): 20-30.
- Nguyen, V. H., J. Trout, et al. (2000). "Dorsal and intermediate neuronal cell types of the spinal cord are established by a BMP signaling pathway." *Development* 127(6): 1209-20.
- Niebruegge, S., C. L. Bauwens, et al. (2008). "Generation of human embryonic stem cell-derived mesoderm and cardiac cells using size-specified aggregates in an oxygen-controlled bioreactor." *Biotechnol Bioeng*.
- Niebruegge, S., C. L. Bauwens, et al. (2009). "Generation of human embryonic stem cell-derived mesoderm and cardiac cells using size-specified aggregates in an oxygen-controlled bioreactor." *Biotechnol Bioeng* 102(2): 493-507.
- NIH (2001). "Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions." The National Institute of Health resource for stem cell research.
- Niwa, H., T. Burdon, et al. (1998). "Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3." *Genes Dev* 12(13): 2048-60.
- Nofziger, D., A. Miyamoto, et al. (1999). "Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts." *Development* 126(8): 1689-702.
- Noggle, S. A., D. Weiler, et al. (2006). "Notch signaling is inactive but inducible in human embryonic stem cells." *Stem Cells* 24(7): 1646-53.
- Nostro, M. C., X. Cheng, et al. (2008). "Wnt, activin, and BMP signaling regulate distinct stages in the developmental pathway from embryonic stem cells to blood." *Cell Stem Cell* 2(1): 60-71.
- Notarianni, E., C. Galli, et al. (1991). "Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep." *J Reprod Fertil Suppl* 43: 255-60.

- Nusse, R. (2008). "Wnt signaling and stem cell control." *Cell Res* 18(5): 523-7.
- Nusse, R., C. Fuerer, et al. (2008). "Wnt signaling and stem cell control." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 59-66.
- Okamoto, K., H. Okazawa, et al. (1990). "A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells." *Cell* 60(3): 461-72.
- Okazaki, K. (2006). "Oxyge, epigenetics and stem cell fate." *regenerative Med.* 1(1): 71-83.
- Okita, K., T. Ichisaka, et al. (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." *Nature* 448(7151): 313-7.
- Pabon, J. E., Jr., W. E. Findley, et al. (1989). "The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development." *Fertil Steril* 51(5): 896-900.
- Pain, B., M. E. Clark, et al. (1996). "Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities." *Development* 122(8): 2339-48.
- Panchision, D. M. (2009). "The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease." *J Cell Physiol* 220(3): 562-8.
- Panchision, D. M., J. M. Pickel, et al. (2001). "Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate." *Genes Dev* 15(16): 2094-110.
- Park, I. H., R. Zhao, et al. (2008). "Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors." *Nature* 451(7175): 141-6.
- Peerani, R., B. M. Rao, et al. (2007). "Niche-mediated control of human embryonic stem cell self-renewal and differentiation." *Embo J* 26(22): 4744-55.
- Pera, M. F. and A. O. Trounson (2004). "Human embryonic stem cells: prospects for development." *Development* 131(22): 5515-25.
- Perrier, A. L., V. Tabar, et al. (2004). "Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(34): 12543-8.
- Pistollato, F., H. L. Chen, et al. (2009). "Hypoxia and HIF1alpha repress the differentiative effects of BMPs in high-grade glioma." *Stem Cells* 27(1): 7-17.
- Pistollato, F., H. L. Chen, et al. (2007). "Oxygen tension controls the expansion of human CNS precursors and the generation of astrocytes and oligodendrocytes." *Mol Cell Neurosci* 35(3): 424-35.
- Pistollato, F., E. Rampazzo, et al. (2009). "Molecular mechanisms of HIF-1alpha modulation induced by oxygen tension and BMP2 in glioblastoma derived cells." *PLoS One* 4(7): e6206.
- Pouton, C. W. and J. M. Haynes (2007). "Embryonic stem cells as a source of models for drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* 6(8): 605-16.
- Powers, D. E., J. R. Millman, et al. (2008). "Effects of oxygen on mouse embryonic stem cell growth, phenotype retention, and cellular energetics." *Biotechnol Bioeng* 101(2): 241-54.
- Prado-Lopez, S., A. Conesa, et al. (2010). "Hypoxia promotes efficient differentiation of human embryonic stem cells to functional endothelium." *Stem Cells* 28(3) 407-18.
- Prasad, S. M., M. Czepiel, et al. (2009). "Continuous hypoxic culturing maintains activation of Notch and allows long-term propagation of human embryonic stem cells without spontaneous differentiation." *Cell Prolif* 42(1): 63-74.
- Prelle, K., N. Zink, et al. (2002). "Pluripotent stem cells--model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy." *Anat Histol Embryol* 31(3): 169-86.
- Quinn, P. and G. M. Harlow (1978). "The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro." *J Exp Zool* 206(1): 73-80.
- Ramirez-Bergeron, D. L. and M. C. Simon (2001). "Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system." *Stem Cells* 19(4): 279-86.

- Rankin, E. B. and A. J. Giaccia (2008). "The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis." *Cell Death Differ* 15(4): 678-85.
- Rao, B. M. and P. W. Zandstra (2005). "Culture development for human embryonic stem cell propagation: molecular aspects and challenges." *Curr Opin Biotechnol* 16(5): 568-76.
- Rao, M. S. (1999). "Multipotent and restricted precursors in the central nervous system." *Anat Rec* 257(4): 137-48.
- Reubinoff, B. E., M. F. Pera, et al. (2000). "Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro." *Nat Biotechnol* 18(4): 399-404.
- Rodic, N., M. S. Rutenberg, et al. (2004). "Cell fusion and reprogramming: resolving our transdifferences." *Trends Mol Med* 10(3): 93-6.
- Rogers, M. B., B. A. Hosler, et al. (1991). "Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes." *Development* 113(3): 815-24.
- Rosenthal, M. D., R. M. Wishnow, et al. (1970). "In vitro growth and differentiation of clonal populations of multipotential mouse cells derived from a transplantable testicular teratocarcinoma." *J Natl Cancer Inst* 44(5): 1001-14.
- Salomoni, P. and F. Calegari "Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1." *Trends Cell Biol* 20(5): 233-43.
- Sato, N., L. Meijer, et al. (2004). "Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor." *Nat Med* 10(1): 55-63.
- Schmandt, T., E. Meents, et al. (2005). "High-purity lineage selection of embryonic stem cell-derived neurons." *Stem Cells Dev* 14(1): 55-64.
- Schuldiner, M., O. Yanuka, et al. (2000). "Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21): 11307-12.
- Semenza, G. L. (1999). "Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 551-78.
- Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 3(10): 721-32.
- Sharma, R. P. and V. L. Chopra (1976). "Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*." *Dev Biol* 48(2): 461-5.
- Shi, Y., C. Desponts, et al. (2008). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds." *Cell Stem Cell* 3(5): 568-74.
- Shin, S., M. Mitalipova, et al. (2006). "Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions." *Stem Cells* 24(1): 125-38.
- Shtutman, M., J. Zhurinsky, et al. (1999). "The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10): 5522-7.
- Sieber-Blum, M. (1989). "SSEA-1 is a specific marker for the spinal sensory neuron lineage in the quail embryo and in neural crest cell cultures." *Dev Biol* 134(2): 362-75.
- Silver, I. and M. Erecinska (1998). "Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells." *Adv Exp Med Biol* 454: 7-16.
- Simon, M. C. and B. Keith (2008). "The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(4): 285-96.
- Smith, J. R., L. Vallier, et al. (2008). "Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm." *Dev Biol* 313(1): 107-17.
- Stadtfeld, M., M. Nagaya, et al. (2008). "Induced pluripotent stem cells generated without viral integration." *Science* 322(5903): 945-9.
- Struhl, G. and A. Adachi (1998). "Nuclear access and action of notch in vivo." *Cell* 93(4): 649-60.

- Studer, L., M. Csete, et al. (2000). "Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen." *J Neurosci* 20(19): 7377-83.
- Sumi, T., N. Tsuneyoshi, et al. (2008). "Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin, Activin/Nodal and BMP signaling." *Development* 135(17): 2969-79.
- Surjit, M. and S. K. Lal (2007). "Glycogen synthase kinase-3 phosphorylates and regulates the stability of p27kip1 protein." *Cell Cycle* 6(5): 580-8.
- Takahashi, K., K. Tanabe, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* 131(5): 861-72.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* 126(4): 663-76.
- Takahashi-Yanaga, F. and T. Sasaguri (2008). "GSK-3 $\beta$  regulates cyclin D1 expression: a new target for chemotherapy." *Cell Signal* 20(4): 581-9.
- Talks, K. L., H. Turley, et al. (2000). "The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages." *Am J Pathol* 157(2): 411-21.
- Tam, P. P. and R. R. Behringer (1997). "Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan." *Mech Dev* 68(1-2): 3-25.
- Temple, S. (2001). "The development of neural stem cells." *Nature* 414(6859): 112-7.
- Terada, N., T. Hamazaki, et al. (2002). "Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion." *Nature* 416(6880): 542-5.
- Terstegge, S. (2006). *Entwicklung von Automatisierten und skalierbaren Verfahren zur Kultivierung humaner embryonaler Stammzellen*. Bonn, rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Dissertation.
- Tetsu, O. and F. McCormick (1999). "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells." *Nature* 398(6726): 422-6.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* 282(5391): 1145-7.
- Thomson, J. A., J. Kalishman, et al. (1996). "Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts." *Biol Reprod* 55(2): 254-9.
- Toledo, E. M., M. Colombres, et al. (2008). "Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation." *Prog Neurobiol* 86(3): 281-96.
- Uzan, G., M. H. Prandini, et al. (1996). "Hematopoietic differentiation of embryonic stem cells: an in vitro model to study gene regulation during megakaryocytopoiesis." *Stem Cells* 14 Suppl 1: 194-9.
- Vallier, L., M. Alexander, et al. (2005). "Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells." *J Cell Sci* 118(Pt 19): 4495-509.
- Varelas, X., R. Sakuma, et al. (2008). "TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal." *Nat Cell Biol* 10(7): 837-48.
- Varnum-Finney, B., L. Xu, et al. (2000). "Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling." *Nat Med* 6(11): 1278-81.
- Wakayama, T., A. C. Perry, et al. (1998). "Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei." *Nature* 394(6691): 369-74.
- Walker, M. R., K. K. Patel, et al. (2009). "The stem cell niche." *J Pathol* 217(2): 169-80.
- Walsh, J. and P. W. Andrews (2003). "Expression of Wnt and Notch pathway genes in a pluripotent human embryonal carcinoma cell line and embryonic stem cell." *Apmis* 111(1): 197-210; discussion 210-1.
- Warburg (1931). "The Metabolism of Tumours."

- Warkentin, P. I., M. E. Clay, et al. (1981). "Successful engraftment of NA1 positive bone marrow in a patient with a neutrophil antibody, anti-NA1." *Hum Immunol* 2(2): 173-84.
- Watabe, T. and K. Miyazono (2009). "Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation." *Cell Res* 19(1): 103-15.
- Wernig, M., A. Meissner, et al. (2007). "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state." *Nature* 448(7151): 318-24.
- Wernig, M., K. L. Tucker, et al. (2002). "Tau EGFP embryonic stem cells: an efficient tool for neuronal lineage selection and transplantation." *J Neurosci Res* 69(6): 918-24.
- Wernig, M., J. P. Zhao, et al. (2008). "Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(15): 5856-61.
- Westfall, S. D., S. Sachdev, et al. (2008). "Identification of oxygen-sensitive transcriptional programs in human embryonic stem cells." *Stem Cells Dev* 17(5): 869-81.
- Whalen, W. J., R. Ganfield, et al. (1970). "Effects of breathing O<sub>2</sub> or O<sub>2</sub> +CO<sub>2</sub> and of the injection of neurohumors on the PO<sub>2</sub> of cat cerebral cortex." *Stroke* 1(3): 194-200.
- White, J. and S. Dalton (2005). "Cell cycle control of embryonic stem cells." *Stem Cell Rev* 1(2): 131-8.
- Wobus, A. M. and K. R. Boheler (2005). "Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy." *Physiol Rev* 85(2): 635-78.
- Wouters, B. G., T. van den Beucken, et al. (2005). "Control of the hypoxic response through regulation of mRNA translation." *Semin Cell Dev Biol* 16(4-5): 487-501.
- Wu, J., J. P. Saint-Jeannet, et al. (2003). "Wnt-frizzled signaling in neural crest formation." *Trends Neurosci* 26(1): 40-5.
- Xiao, L., X. Yuan, et al. (2006). "Activin a maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells." *Stem Cells* 24(6): 1476-86.
- Xu, C., E. Rosler, et al. (2005). "Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium." *Stem Cells* 23(3): 315-23.
- Xu, R. H., X. Chen, et al. (2002). "BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast." *Nat Biotechnol* 20(12): 1261-4.
- Xu, R. H., T. L. Sampsel-Barron, et al. (2008). "NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs." *Cell Stem Cell* 3(2): 196-206.
- Ying, Q. L., J. Nichols, et al. (2003). "BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3." *Cell* 115(3): 281-92.
- Ying, Q. L., M. Stavridis, et al. (2003). "Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture." *Nat Biotechnol* 21(2): 183-6.
- Yoon, K. and N. Gaiano (2005). "Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants." *Nat Neurosci* 8(6): 709-15.
- Yu, J., K. Hu, et al. (2009). "Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences." *Science* 324(5928): 797-801.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, et al. (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." *Science* 318(5858): 1917-20.
- Yu, X., J. Zou, et al. (2008). "Notch signaling activation in human embryonic stem cells is required for embryonic, but not trophoblastic, lineage commitment." *Cell Stem Cell* 2(5): 461-71.
- Zechner, D., Y. Fujita, et al. (2003). "beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system." *Dev Biol* 258(2): 406-18.

---

Zhang, D., W. Jiang, et al. (2009). "Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells." *Cell Res* 19(4): 429-38.

Zhang, H., H. O. Akman, et al. (2003). "Cellular response to hypoxia involves signaling via Smad proteins." *Blood* 101(6): 2253-60.

Zhang, S. C., M. Wernig, et al. (2001). "In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells." *Nat Biotechnol* 19(12): 1129-33.

Zhang, X., I. Neganova, et al. (2009). "A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A." *J Cell Biol* 184(1): 67-82.

Zhou, H., S. Wu, et al. (2009). "Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins." *Cell Stem Cell* 4(5): 381-4.

Zhu, L. L., L. Y. Wu, et al. (2005). "Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs." *Mol Neurobiol* 31(1-3): 231-42.

Zwaka, T. P. and J. A. Thomson (2005). "Differentiation of human embryonic stem cells occurs through symmetric cell division." *Stem Cells* 23(2): 146-9.

## 7. Danksagung

Prof. Dr. Oliver Brüstle möchte ich danken, dass ich meine Doktorarbeit auf dem spannenden Gebiet der Stammzellforschung durchführen konnte. Besonders danke ich für die Freiheit der Forschung und der damit verbundenen selbständigen Verfolgung von Forschungsansätzen und Ideen.

Prof. Dr. Michael Hoch danke ich für seine Bereitschaft, diese Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu betreuen.

Prof. Dr. Hubert Schorle und PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert danke ich für die Bereitschaft als dritter und vierter Beisitzer während meines Kolloquium zu fungieren.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Stefanie Terstegge, für die nicht selbstverständliche Bereitschaft zur Korrektur meiner Dissertation. Zusätzlich danke ich ihr dafür, dass sie mir stets während meines Promotionsstudiums mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich danke ihr, dass sie mir gezeigt hat, was man mit Leidenschaft am Forschen alles erreichen kann und sie mir damals wie heute als Vorbild dient.

Iris Laufenberg danke ich für die Unterstützung und das ausgezeichnete Arbeitsklima in der Bioengineering-Gruppe.

Ich danke auch allen anderen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Rekonstruktive Neurobiologie für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank geht an Karin Frangenberg für ihre Unterstützung und stets offene Ohren für jegliche Probleme.

Ich danke Dr. Bernhard Fuß für die tolle Atmosphäre während meines Praktikums am LIMES-Institut, den interessanten Vorlesungen und die wissenschaftliche Hilfe während meiner Promotion.

Olaf und Georg danke ich dafür, dass sie mir beigebracht haben nie aufzugeben, auch wenn man in der Mitte sitzen muss.

Ich danke meinen Eltern für alles was sie mir ermöglicht haben, dafür sie mich immer in meinem Weg bestärkt haben und immer für mich da waren.

Michael danke ich für all die Jahre und die Jahre die noch kommen.

## **8. Erklärung**

An Eides statt versichere ich, dass ich die Dissertation persönlich, selbständig und unter Offenlegung der erhaltenen Hilfen angefertigt habe, dass diese oder eine ähnliche Arbeit noch nicht anderweitig als Dissertation eingereicht wurde, dass sie weder vollständig noch auszugsweise veröffentlicht worden ist. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Ich habe noch keinen früheren Promotionsversuch unternommen.

## 9. Anhang

### 9.1 Verbrauchsmaterial

#### Verbrauchsmaterial

1ml Injektionsspritzen  
 15 cm Zellkulturschalen  
 Deckgläser  
 Durchflusszytometrie-Röhrchen  
 Einmal-Pipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml)  
 Einmal-Pipettenspitzen  
 (10µl, 100µl, 200µl, 1000µl)  
 Falcon-Röhrchen  
 Filtereinheit (0,2µm)  
 Glaskugeln (Ø4mm)  
 Glaswaren  
 Kanülen Microlance 3  
 Kryoröhrchen  
 Küvetten  
 Nitrozellulose-Membran  
  
 Nylonzellsiebe (40 µm)  
  
 Objektträger  
 Polyvinylidenfluorid-Membran  
 Reaktionsgefäße  
 Reaktionsgefäßstreifen für die qPCR  
 Sechs-Well-Zellkulturplatten  
 SensorDishes  
 Stericup-Filtriereinheit (0,22µm)  
 Sterilfilter (0,2µm)  
 T175-Zellkulturflaschen  
 Whatman Filterpapier 3MM

#### Hersteller, Ort

BD Bioscience, Heidelberg  
 TPP, Trasadingen, CH  
 Engelbrecht, Edermünde  
 Falcon, Heidelberg  
 Falcon, Heidelberg  
  
 ART, San Diego, USA  
 Falcon, Heidelberg  
 Nalgene, Hereford, UK  
 Faust, Schaffhausen  
 Schott, Mainz  
 BD Bioscience, Heidelberg  
 Nunc, Wiesbaden  
 Eppendorf, Hamburg  
 Schleicher & Schnell,  
 Dassel  
 BD Bioscience, Heidelberg  
 VWR, Darmstadt  
 Menzel, Braunschweig  
 Carl Roth, Karlsruhe  
 Eppendorf, Hamburg  
 Biozym, Hess. Oldendorf  
 Nunc, Wiesbaden  
 Presens, Regensburg  
 Millipore, Schwalbach  
 PALL, Ann Arbor, USA  
 BD Bioscience, Heidelberg  
 Whatman, Kent, UK

### 9.2 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Bildbearbeitung	ImageJ	Wayne Rasband NIH, Bethesda, USA
	Illustrator	Adobe Systems Inc., SanJose, USA
	Photoshop	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
	Openlab	Improvisation, Coventry, GB

Binokular	Zeiss SMZ 1500	Carl Zeiss, Jena Nikon, Düsseldorf
Brutschränke	HERACell	Thermo Scientific, Waltham, USA
Chemilumineszenzdetektions- System	ChemiDocXRS	Bior-Rad, München
Datenauswertung	Flowjo	Tree Star Inc, Ashland, USA
Durchflusszytometrie	C 5050 Zoom	Olympus Optical, Hamburg
Digitalkamera	LSRII	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer	Agargel Mini	Biometra, Göttingen
Elektrophorese	Axioskop 2	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135	Carl Zeiss, Jena
Gefrierbehälter	Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, Hereford, UK
Gelelektrophorese- und Westernblotsystem	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Geldokumentation	Geldoc2000	Bio-Rad, München
Hybridisationsofen	OV3	Biometra
Inverses Lichtmikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge	5415R	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	S20 SevenEasy pH	Mettler Toledo, Giessen
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetboy	Brand, Wertheim
Pipetten	1µl, 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
qPCR-Analysesystem und - Software	iCycler Mastercycler® ep realplex, real-time thermal cycler	Bio-Rad, München Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage	milliQ Synthesis A10	Millipore, Schwalbach
Rotator	Rotator	VWR, Darmstadt
Sauerstoffelektroden	GOX 100	Greisinger, Regenstauf
	SDR SensorDish® Reader	Presens, Regensburg
Sterile Werkbank (horizontal)	HERAGuard	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterile Werkbank (vertikal)	Holten Safe 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
	HERAGuard	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermocycler	T3	Biometra, Göttingen
Thermomixer	Compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Biofuge Pico	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vakuum-Absaugpumpe	Vacuubrand	Brand, Wertheim
Vortex	Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA

Waagen	Grobwaage	BL610
	Analysenwaage	LA310S Sartorius, Göttingen
Wärmeplatte	OTS40	Medite, Burgdorf
Wasserbad		Memmert, Schwabach
Wippschüttler	WS10	Edmund Bühler, Tübingen
Zählkammer	Fusch-Rosenthal	Faust, Halle
Zellkultur-Kühlzentrifuge	Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

### 9.3 Chemikalien

#### Chemikalie

1kb plus DNA Leiter  
 2-Mercaptoethanol  
 6x DNA Laufpuffer  
 30 % Acrylamidlösung  
 Accustain  
 Accutase II  
 Agarose, PeqGold Universal  
 Annexin-V FITC Flow Kit  
 APS  
 B27 Supplement  
 BSA Fraktion V  
 Borax  
 BrdU  
 BrdU-FITC Flow Kit  
 Bromphenolblau  
 Chloroform  
 Coomassie-Färbelösung  
 DAPI  
 DEPC  
 DMEM  
 DMEM/F12  
 Dimethyl sulfoxid  
 Dithiothreitol  
 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)  
 dNTP  
 EDTA  
 EGF  
  
 Ethanol  
 Ethidiumbromid  
 Expand Reverse Transcriptase  
  
 FGF-2

#### Hersteller, Ort

Invitrogen, Karlsruhe  
 Invitrogen, Karlsruhe  
 Fermentas, St. Leon-Rot  
 Bio-Rad, München  
 Sigma, Deisenhofen  
 PAA, Pasching, Österreich  
 PeqLab, Erlangen  
 BD Bioscience, Heidelberg  
 Sigma, Deisenhofen  
 Invitrogen, Karlsruhe  
 Sigma, Deisenhofen  
 Sigma, Deisenhofen  
 Sigma, Deisenhofen  
 BD Bioscience, Heidelberg  
 Sigma, Deisenhofen  
 Sigma, Deisenhofen  
 Bio-Rad, München  
 Sigma, Deisenhofen  
 Fluka, Seelze  
 Invitrogen, Karlsruhe  
 Invitrogen, Karlsruhe  
 Sigma, Deisenhofen  
 Roche, Mannheim  
 Invitrogen, Karlsruhe  
 Roche, Mannheim  
 Sigma, Deisenhofen  
 R&D Systems,  
 Minneapolis, USA  
 Merck, Darmstadt  
 Sigma, Deisenhofen  
 Roche, Mannheim  
  
 Invitrogen, Karlsruhe  
 R&D Systems,

---

Fluorescein	Minneapolis, USA
FCS	Sigma, Deisenhofen
FCS, definiert	Invitrogen, Karlsruhe
Gelatine Typ A	Hyclone, Logan, USA
Gel Dry System	Sigma, Deisenhofen
Glutaraldehyd	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Sigma, Deisenhofen
HCl	Sigma, Deisenhofen
Hepes	Sigma, Deisenhofen
Hoechst 33258	Sigma, Deisenhofen
Hoechst 33342	Sigma, Deisenhofen
Igepal	Sigma, Deisenhofen
Imidazol	Sigma, Deisenhofen
Insulin	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Knockout-DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Knockout-Serum Replacement	Invitrogen, Karlsruhe
Kollagenase Typ IV	Invitrogen, Karlsruhe
Laminin	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Matrigel	BD Bioscience, Heidelberg
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Bio-Rad, München
Mowiol	Sigma, Deisenhofen
N2 Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
NP40	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdeoxycholat (DOC)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
Noggin	R&D Systems, Minneapolis, USA
Oligo-(dT)15-Primer	Roche, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Ornithin	Sigma, Deisenhofen
Propidium Iodid	Invitrogen, Karlsruhe
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma, Deisenhofen

---

Reverse Transkriptase	Roche, Mannheim
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNase Inhibitor	Roche, Mannheim
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
SuperSignal West Femto Kit	Perbio Science, Bonn
SuperSignal West Pico Kit	Perbio Science, Bonn
SYBR Green I	Sigma, Deisenhofen
Stripping-Puffer	Bio-Rad, München
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCl	Sigma, Deisenhofen
Triton-X100	Sigma, Deisenhofen
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypan-Blau	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

## 9.4 Primäre Antikörper

IF = Konzentration für die Immunfluoreszenz- und Durchflusszytometrische-Färbung

WB = Konzentration für Western Blot

Antigen	Antigen-Beschreibung	Art	Verdünnung	Besonderheit	Hersteller Ort
A2B5	Epitop von Silaogangliosiden und Sulfatiden auf der Plasmamembran von Neuronen, Neuroendokrinen und Gliazellen	Maus IgM	1:2000 (IF) 1:1000 (WB)	Lebendfärbung, kein Triton  2,5% MP/TBS-T	Millipore, Billerica, USA
BrdU	Uridin-Derivat, das anstelle von Thymidin in die DNA inkorporiert werden kann	Maus IgG	1:33 (IF)	Triton-X100, Denaturierung der DNA	Becton Dickinson, San Jose, USA
$\beta$ -Catenin	Transduktions-Protein im WNT-Signalweg	Kanninchen IgG	1:100 (IF)	Triton-X100	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
CD133	multipotenz-Assoziiertes, Transmembran- Glykoprotein	Direkt Konjugiert mit PE oder APC	1:20 (IF)	Lebendfärbung	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
CDK2	Katalytische Untereinheit einer Cyclin- Abhängigen Kinase in der G1-S-Phase des Zellzyklus	Mouse IgG	1:500 (WB)	2,5% MP/TBS-T	Millipore, Billerica, USA

cMyc	Protoonkogen ( In der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose involviert)	Kanninchen IgG	1:500 (IF)	Triton-X100	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
			1:1000 (WB)	5% BSA/TBS-T	
CyclinD1	Zellzyklus-abhängige Protein Kinase, Regulation von Schlüsselsignalen während der Zellzyklus-Progression	Maus IgG	1:500 (WB)	2,5% MP/TBS-T	Becton Dickinson, San Jose, USA
Delta	Ligand im Notch-Signalweg	Maus IgG	1:100 (IF)	kein Triton	DSHB, Iowa City, USA
GSK3 $\beta$	Komponente des entwicklungsbiologisch relevanten Wnt-Signalweges	Kanninchen IgG	1:500 (IF)	Triton-X100	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
			1:1000 (WB)	5% BSA/TBS-T	
Hif1 $\alpha$	Sauerstoffsensitive Untereinheit des Heterodimeren Transkriptionsfaktors Hif1 (Hypoxia-inducible factor 1)	Kanninchen IgG	1:200 (IF)	Triton-X100	Abcam, Cambridge, USA
			1:1000 (WB)	5%BSA/TBS-T	
Jagged	Ligand im Notch-Signalweg	Ratte IgG	1:100 (IF)	kein Triton	DSHB, Iowa City, USA
Nestin	Klasse 6 Intermediäres Filament Protein, neuraler Stammzellmarker	Maus IgG	1:1000 (IF)	Triton-X100	R&D Systems, Minneapolis, USA
Notch-Intrazelluläre Domäne (NICD)	Spaltungsprodukt des Notch-Rezeptors Notch1	Kanninchen IgG	1:1000 (WB)	5% BSA/TBS-T	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Notch1	Rezeptor des Notch-Signalweges	Ratte IgG	1:100 (IF)	kein Triton	DSHB, Iowa City, USA
Notch2	Rezeptor des Notch-Signalweges	Ratte IgG	1:100 (IF)	kein Triton	DSHB, Iowa City, USA
PSA-NCAM	neurales Adhäsions Molekül, neuraler Stammzell- und Vorläuferzellmarker	Maus IgM	1:1000 (IF)	kein Triton	Millipore (Chemicon), Temecula, USA
Tra-1-60	Pluripotenz-assoziiertes Oberflächenantigen	Maus IgM	1:500 (IF)	Lebendfärbung	Millipore (Chemicon), Temecula, USA
Tra-1-81	Pluripotenz-assoziiertes Oberflächenantigen	Maus IgM	1:500 (IF)	Lebendfärbung	Millipore (Chemicon), Temecula, USA
Phospho-Smad1 (Ser463/465; Smad5 (Ser463/465) Smad8 (Ser426/428)	Transduktions-Protein des entwicklungsbiologisch relevanten TGF $\beta$ /BMP-Signalweges	Kanninchen IgG	1:500 (IF) 1:1000 (WB)	Triton-X100 5% BSA/TBS-T	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho-Smad2 (Ser465/467) Smad3 (Ser423/425)	Transduktions-Protein des entwicklungsbiologisch relevanten TGF $\beta$ /BMP-Signalweges	Kanninchen IgG	1:500 (IF) 1:1000 (WB)	Triton-X100 5% BSA/TBS-T	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Sox-2	Pluripotenz- und multipotenz-assoziiierter Transkriptionsfaktor	Kanninchen IgG	1:1000 (IF)	Triton-X100	Millipore (Chemicon), Temecula, USA
SSEA-1	Differenzierungs-assoziiertes Oberflächenantigen Marker für Neuralrohr-partizipierende Zellen	Maus IgM	1:80 (IF)	Lebendfärbung	DSHB, Iowa City, USA
SSEA-4	Pluripotenz-assoziiertes Oberflächenantigen	Maus IgM	1:100 (IF)	Lebendfärbung	DSHB, Iowa City, USA

---

Tuj1 ( $\beta$ -III-Tubulin)	Neuron-spezifischer Zytoskelett-Bestandteil; früher neuronaler Marker	Maus IgG	1:500 (IF) 1:1000 (WB)	Triton-X100 5% BSA/TBS-T	Covance, Richmond, USA
---------------------------------	---	----------	---------------------------	-----------------------------	------------------------------

## 9.5 Sekundäre Antikörper

Farbstoff-Konjugat	Art (gerichtet gegen)	Verdünnung	Hersteller Ort
Alexa Fluor® 488	Maus IgM Maus IgG Kanninchen IgG Ratte IgG	1:1000	Invitrogen, Carlsbad, USA
Alexa Fluor® 555	Maus IgM Maus IgG Kanninchen IgG Ratte IgG	1:1000	Invitrogen, Carlsbad, USA
Alexa Fluor® 647	Maus IgM Maus IgG Kanninchen IgG Ratte IgG	1:1000	Invitrogen, Carlsbad, USA
Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierter Antikörper	Maus IgG Kanninchen IgG	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

## 9.6 Kernmarker

Farbstoff	Farbstoff-Beschreibung	Verdünnung	Besonderheit	Hersteller
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	DNA Farbstoff der sich bevorzugt an A/T-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA anlagert	1:10000 in NaHCO <sub>3</sub>	Färbt tote Zellen positiv	Sigma Aldrich, München, DE
Hoechst 33258	Bisbenzimidazol-Farbstoff der sich bevorzugt in an A/T-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA anlagert	1,2µg/ml	Kann die Zellmembran von lebenden Zellen durchdringen	Invitrogen, Carlsbad, USA
Hoechst 33342	Bisbenzimidazol-Farbstoff der sich bevorzugt in an A/T-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA anlagert	1,2µg/ml	Kann die Zellmembran von lebenden Zellen durchdringen	Invitrogen, Carlsbad, USA
Propidium-Iodid (PI)	DNA-Farbstoff der mit der Doppelhelix interkaliert, kann jedoch nur die Zellmembran von toten Zellen durchdringen	1,2µg/ml	Verwendung nur für die Zellzyklus-Analyse	Invitrogen, Carlsbad, USA

## 9.7 Primer

Wenn nicht anders angegeben wurde die quantitative RT-PCR mit 40 Zyklen und bei einer MgCl<sub>2</sub> Konzentration von 1.5mM durchgeführt.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Annealing- Temperatur (°C)	Produkt- länge (bp)	Schmelz- punkt des Produkte s (°C)	Accession Nummer
AFP	TACATTGACCACGTTCCAGCG CCCATGTACATGAGCACTGCA	60	200	85,5	NM_001134.1
β-Catenin	GCAGCATCAAAGTGTAGAT GAGGAAGAGGATGTGGATAC	62	194	84,5	NM_001904.3
BLBP	CGACCTACTCCGCTAACC CTCCAGTGTCCCTCTTCC	62	119	86	NM_001446.3
BMP2	AGCCACAATCCAGTCATTCC CCCCTTGGAGGAGAAACAA	62	257	80	NM_001200.2
BMP4	AAGCGTAGCCCTAAGCATCA TGGTTGAGTTGAGGTGGTCA	62	197	82	NM_130851.2
Brachyury	CCTGGAGGAGAGCGAGCTG CCTCCTGCCGTTCTTGGTC	60	76	81	NM_003181.2
CD133	CACCACATTTGTTACAGC CAGAAGGCATATGAATCC	60	154	83,5	NM_001145852.1
CD44	CTGTCTGTGCTGTCGGTGAT CCGCTATGTCCAGAAAGGA	62	195	85	NM_001001391.1
CDK1	TTTTCAGAGCTTTGGGCACT CCATTTTGCCAGAAATTCGT	62	195	83	NM_033379.4
CDK2	TGTACCTCCCCTGGATGAAG CATCCTGGAAGAAAGGGTGA	60	113	86	NM_001798.3
CDK4	ACTGGCCTCGAGATGTATC TGCTGCAGAGCTCGAAAGGC	60	166	86	NM_000075.2
cMyc	GGGTAGTGAAAACAGCAG GGCGCCGGGGCTGCAGC	63	167	88	NM_002467.4

CyclinA	CATGGACCTTACCAGACCT TCTGGTGGGTTGAGGAGAG	63	111	83	NM_001237.3
CyclinB	AACTTTCGCCTGAGCCTATTTT TTGGTCTGACTGCTTGCTCTT	63	228	88	NM_031966.2
CycinD1	GCCGTCCATGCGGAAGATC CCTCCTCCTCGCACTTCTGT	63	71	81,5	NM_053056.2
CyclinD2	CTGGCTAAGATCACCAACACA CAATCTGCTCCTGGCAA	60	121	82	NM_001759.3
Cytokerati	CAGTATGAGGAGATGGCCAAA CCCGGTTTCATCTCTGAAATCT	63	142	85	NM_005556.3
DCX	CCGCACTATCTACACCATC TCACAGAGGAGGCAGCAG	62	190	86-90	NM_001040261
Desmin	CCGCACTATCTACACCATC TCACAGAGGAGGCAGCAG	62	143	80,5	NM_001927.3
DKK	GGCAAGACAGACCTTCTCCA CATCAGACTGTGCCTCAGGA	62	162	84	NM_012242.2
EN1	GGCTATCCTACTTATGGGCTCAG CTTCTCGTTCTTCTTCTTCTCAG	63,5	160	89-93	NM_001426.3
Follistatin	TGAACACTGAACACTTATAGAGAG CCTCAGGTGTGCTACTGGAAG	62	153	84,5	NM_013409.1
GDF3	TCTGGCTTTGGGCCAGGCAG TGCTGCCTCGGATCCTGGA	62	139	83	NM_020634.1
GFAP	ATCAACTCACCGCCAACAGCGCC CTCATACTGCGTGCGGATCTCTT	63,5	347	92	NM_001131019.1
Goosecoid	AGCTTTCGAGCTGCTCGTCAG GGTGCTGCTGTCCCCGGTA	60	149	83	NM_173849.2
Gremlin	TTCTTGGTAGGTGGCTGTAG AATACCTGAAGCGAGACTGGT	60	241	88	NM_013372.6
GSK3β	ATTGGTCTGTCCACGTCTC AGCTGGCTGCTCGGGACTGT	62	309	87	NM_002093.3

Hes1	TACTTCCCCAGCACACTTGG GCTCTGAAGAAAGATAGCTGG	62	140	90	NM_005524.2
Hes5	GCACATTTGCCTTTTGTGAA CACACTCAGGAGCCTTTTGG	62	115	87	NM_001010926.3
Hey1	GCTTTTGAGAAGCAGGGATCTGCT TGTCCGAAGACGGTCCCCCA	62	323	91,5	NM_012258.
L1	GACTACGAGATCCACTTGTTTAAGGA CTCACAAAGCCGATGAACCA	56	131	81	NM_001130714.2
Lef1	CCTCGTCTAGCGCGCGCCG GGGTTTCGTGCAGCAGGAC	60	227	83	NM_001130714.2
Lefty-A	TGCTACAGGTGTCGGTGCAGAGG AGAAACGGCCACTTGAAGGCCAGG	60	340	89	NM_020997.2
Mash1	GTCCTGTCGCCCACCATCTC CCCTCCAACGCCACTGAC	62	251	90	NM_004316.3
Musashi	CTGCCTACGGACCAATGGCG CGGGGCTGGTGGTCCCCA	62	138	91	NM_002442.2
Nanog	GCTTGCCTTGCTTTGAAGCA TTCTTGACCGGGACCTTGTC	63	256	86,5	NM_024865.2
Nestin	GCTTGCCTTGCTTTGAAGCA TTCTTGACCGGGACCTTGTC	63	200	86,5	NM_006617.1
nMyc	GAGAGGACACCCTGAGCGATTCA ATGTGGTGACAGCCTTGGTGTGG	62	123	89	NM_005378.4
Notch1	CACTGTGGGCGGGTCC GTTGTATTGGTTCGGCACCAT	62	85	88	NM_017617.3
Oct-4	GAGAAGCTGGAGGCAAACC GACCGAGGAGTACAGTGCAGT	60	236	89	NM_002701.4
Olig2	CAGAAGCGCTGATGGTCATA TCGGCAGTTTTGGGTATTTC	63	208	90	NM_005806.2
Pax2	GCGACTCTCACAGCACAG CCACTCCACTCCTCCCATC	62	289	87	NM_003989.3

Pax6	TACCAACGATAACATACCAAGC AGCCTCATCTGAATCTTCTCC	63	265	88	NM_000280.3
PTEN	TCACAAGATGATGTTTGAACTATTCCAA CCTTTAGCTGGCAGACCACAA	62	80	81	NM_000314.4
Rex-1	CAGCATCCTAACAGCTCGCAGAAT GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA	58	306	87	NM_174900.3
Smad1	TTTGTAAGCTCATAGACTGTCTCA GATTTTCATCCTACTACTGTTTGC	62	130	82	NM_005900.2
Smad2	CTGCCTTCGGTATTCTGCTC CGAAATGCCACGGTAGAAAT	60	327	85	NM_001135937.1
Sox2	TCAGGAGTTGTCAAGGCAGAGAAGA TCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCAAAC	62	74	81	NM_003106.2
TERT	TGGCTGCGTGGTGAACCTTG GCGGTTGAAGGTGAGACTGG	63	205	95	NM_198253.2
TGFβ1	GTGTCCAGGCTCCAAATGTAGG GACATCAACGGGTTCACTACCG	62	299	85,5	NM_000660.4
Vimentin	TTCAGAATATGAAGGAGGAAATGG AACCAGAGGGAGTGAATCCAGA	65	197	91	NM_003380.3
Wnt3a	GAGAGCCTCCCCGTCCACAG CTGCCAGGAGTGTATTGCGCATC	62	223	91	NM_030753.3

## 9.8 Lösungen

### 9.8.1 Lösungen für die Zellkultur

#### CM (Konditioniertes Medium)

50 ml hES-Zellmedium ohne FGF-2 pro 10<sup>6</sup> mitotisch inaktivierte Fibroblasten

Inkubation über Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Am Folgetag Abnahme und Filtration des Mediumüberstands.

Lagerung bei -20°C. Vor Gebrauch Zugabe von 4ng/ml FGF-2

#### Direkte-Konversions-Medium (DK-Medium)

N2 Supplement	1%
Knockout-Serum Replacement	20%
Glucose	5,5mM
Insulin	7nM (4ng/ml)

In DMEM/F12

Vor Gebrauch Zugabe von 0,2µg/ml Noggin.

#### Gelatine

Gelatine Typ A 0,1%

in ddH<sub>2</sub>O (Millipore, steril)

Zur Beschichtung wurden die Schalen für mindestens 20 Minuten inkubiert.

#### hES-Gefriermedium

DMSO	10%
FCS, definiert	20%

in Knockout-DMEM

#### hES-Zellmedium

Knockout-Serum Replacement	20%
Nicht-essentielle Aminosäuren	1%
L-Glutamin	1mM
2-Mercaptoethanol	0,1mM
FGF-2	4ng/ml

in Knockout-DMEM

#### hES-Zellmedium ohne FGF-2

Knockout-Serum Replacement	20%
Nicht-essentielle Aminosäuren	1%
L-Glutamin	1mM
2-Mercaptoethanol	0,1mM

in Knockout-DMEM

#### Kollagenase

Kollagenase Typ IV 1mg/ml

in Knockout-DMEM

Sterilfiltrieren	
Laminin-Lösung	
Laminin 1mg/ml	1:500
in PBS	
Zur Beschichtung wurden die Schalen für mindestens 2 Stunden inkubiert.	
Matrigel	
Matrigel	3,3%
in Knockout-DMEM	
Zur Beschichtung wurden die Schalen entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.	
MEF-Gefriermedium	
DMSO	20%
FCS	20%
in DMEM	
MEF-Medium	
FCS	10%
Natriumpyruvat	1%
Nicht-essentielle Aminosäuren	1%
in DMEM	
N2-Medium	
N2 Supplement	1%
Glucose	5,5mM
Insulin	7nM (4ng/ml)
In DMEM/F12	
Vor Gebrauch Zugabe von 10ng/ml FGF, 10ng/ml EGF und 1:1000 B27 Supplement	
Poly-L-Ornithin-Lösung	
Poly-L-Ornithin	0,01%
in ddH <sub>2</sub> O (Millipore, steril)	
Zur Beschichtung wurden die Schalen für mindestens 2 Stunden inkubiert.	
Trypsin-EDTA 1x	
Trypsin-EDTA (10x)	10%
in PBS	
Trypsin-Inhibitor	
Trypsin-Inhibitor	10mg/ml
in ddH <sub>2</sub> O (Millipore, steril)	

## 9.8.2 Lösungen für analytische Methoden

### 9.8.2.1 Immunzytochemie

#### Blockierungslösung 1

FCS	5%
in PBS	

#### Blockierungslösung 2

FCS	5%
Triton-X100	0,1%
in PBS	

#### Boratpuffer (pH 7,5)

Borax	0,1M
in ddH <sub>2</sub> O (Millipore)	

#### Mowiol

Glycerol	6g
Mowiol	2,49g
0,2M Tris-HCl (pH 8,5)	12ml
in 6 ml ddH <sub>2</sub> O (Millipore)	

#### PFA

Paraformaldehyd	4%
in PBS	

### 9.8.2.2 Protein-Isolierung und Western Blot

#### CE-Puffer

Hepes (pH 7,6)	10mM
KCl	60mM
EDTA	1mM
DTT	1mM

in ddH<sub>2</sub>O (Millipore)

Vor Gebrauch frisch 1mM PMSF und Protease-Inhibitor zugeben.

#### Lämmli-Probenpuffer (2x)

SDS	6%
Glycerin	20%
Bromphenolblau	0,004%
Tris-HCl	125mM
2-Mercaptoethanol	6%
in ddH <sub>2</sub> O (Millipore)	

## NE-Puffer

20mM Tris-Base (pH 8,0)	20mM
NaCl	420mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM
EDTA	0,2mM
Glycerol	25%

in ddH<sub>2</sub>O (Millipore)

Vor Gebrauch frisch 0,275% NP40 und Protease-Inhibitor zugeben.

## RIPA-Puffer

Tris-HCl (pH 7.5)	50mM
EDTA (pH7.5)	1mM
NaCl	150mM
DOC	0,5%
SDS	0,1%
Igepal	1%

in ddH<sub>2</sub>O (Millipore)

## SDS-PAGE Sammelgel (2 ml):

ddH <sub>2</sub> O	1,4 ml
30 % Acrylamidlösung	330µl
1M Tris-HCl (pH 6,8)	250µl
10%SDS	20µl
10% APS	20µl
TEMED	2µl

## SDS-Page Trenngel (12%, 5ml)

ddH <sub>2</sub> O	1,7 ml
30 % Acrylamidlösung	2,0ml
1M Tris-Base (pH 8,8)	1,3ml
10%SDS	50µl
10% APS	50µl
TEMED	2µl

## SDS-Laufpuffer

Tris-HCl	25mM
Glycine	19,2mM

in ddH<sub>2</sub>O (Millipore)

## Stripping-Puffer (Bio-Rad)

SDS	2%
Tris-HCl (pH 6,7)	62,5mM

in ddH<sub>2</sub>O (Millipore)

Vor Gebrauch 100mM 2-Mercaptoethanol zugeben.

## TBS-Puffer

Tris-HCl (pH 7,5)	10mM
NaCl	150mM
in ddH <sub>2</sub> O (Millipore)	

## TBS-T-Puffer

Tris-HCl (pH 7,5)	20mM
NaCl	150mM
Tween20	0,05%
in ddH <sub>2</sub> O (Millipore)	

## Western-Transfer-Puffer

Tris-HCl	25mM
Glycine	19,2mM
Methanol	10%
in ddH <sub>2</sub> O (Millipore)	

**9.8.2.3 RNA Isolierung und PCR**

## Agarosegele

PeqGold Universal Agarose	1%
Ethidiumbromid	10µg/ml
in TAE (pH 7,8)	

## DEPC-Wasser

DEPC	0,2%
in ddH <sub>2</sub> O (Millipore)	

Über Nacht geöffnet unter den Abzug stellen, am Folgetag autoklavieren.

## TAE (pH 7,8)

Tris-HCl	40mM
Natriumacetat	5mM
EDTA	1mM
in ddH <sub>2</sub> O	