

**Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt – Diabetes Zentrum  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke



**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG  
MULTIPOTENTER EPITHLIALER STAMMZELLEN  
AUS MURINEN HAARFOLLIKELN**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von

**Miriam Nath**

aus München

2011

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Jochen Seißler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Jürgen Schauber

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Diabetes mellitus	1
1.2	Transplantation beim Diabetes mellitus	5
1.3	Stammzellen	6
1.3.1	Embryonale Stammzellen	7
1.3.2	Adulte Stammzellen	8
1.3.3	Verschiedene Quellen für autologe Stammzellen	9
1.3.4	Hautstammzellen	10
1.4	Morphogenese des Pankreas	12
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
3.1	Reagenzien	16
3.2	Medien und Puffer	23
3.3	Geräte	23
3.4	Verbrauchsmaterial	24
3.5	Versuchstiere	26
3.6	Zellbiologische Methoden	26
3.6.1	Isolierung der Haarfollikelstammzellen aus Mäusen	26
3.6.2	Kulturbedingungen der Zellen	27
3.6.3	Beschichtung der Wellplatten und Zellkulturflaschen	27
3.6.3.1	Poly-L-Arginin und Poly-L-Lysin	28
3.6.3.2	Fibronektin	28
3.6.3.3	Gelatine	28
3.6.3.4	Kollagen	28
3.6.3.5	Lysin-Laminin Doppelbeschichtung	29
3.6.3.6	Matrigel	29
3.6.4	Stimulation	29
3.6.4.1	Aktivin A und Aktivin B	29
3.6.4.2	Betacellulin	30
3.6.4.3	BMP 4	30
3.6.4.4	Cyclopamin	31
3.6.4.5	DAPT	31
3.6.4.6	DBZ	31
3.6.4.7	db-cAMP	31
3.6.4.8	EGF	32
3.6.4.9	Exendin 4	32
3.6.4.10	FGF	32
3.6.4.11	GLP1	33
3.6.4.12	IGF	33
3.6.4.13	(-)-Indolactam V	33
3.6.4.14	LY-294,002 Hydrochlorid	34
3.6.4.15	Natriumbutyrat	34
3.6.4.16	Nicotinamid	34
3.6.4.17	Nodal	35
3.6.4.18	Noggin	35
3.6.4.19	Pikolinsäure	35
3.6.4.20	Retinsäure (cis und all-trans)	36
3.6.5	Differenzierung in einen anderen Zelltyp	37
3.6.5.1	Differenzierung in Adipozyten	37
3.6.5.2	Differenzierung in Sebozyten	38
3.6.5.3	Differenzierung in Chondrozyten	39
3.6.5.4	Differenzierung in Osteoblasten	39
3.6.5.5	Differenzierung in Muskelzellen	40

3.6.5.6	Differenzierung in Neuronen .....	41
<b>3.7</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>42</b>
3.7.1	Isolierung der RNA aus den Zellen .....	42
3.7.2	Reverse Transkription der mRNA (cDNA Synthese) .....	43
3.7.3	Quantitative Real Time-PCR .....	44
3.7.4	Reverse-Transkription Polymerase-Kettenreaktion .....	47
<b>3.8</b>	<b>Immunologische Methoden .....</b>	<b>49</b>
3.8.1	FACS-Analyse (Durchflusszytometrie) .....	49
3.8.2	Immunhistologische Färbungen an Gefrierschnitten und mit kultivierten Zellen .....	51
3.8.2.1	Gefrierschnitte.....	51
3.8.2.2	Immunhistologische Färbungen .....	52
<b>3.9</b>	<b>Analyse des Genexpressionsprofils mit dem Illumina Beadarray .....</b>	<b>54</b>
3.9.1	Kulturbedingungen der analysierten Typ 1 Zellen .....	54
3.9.2	Illumina Beadarray .....	55
3.9.3	Statistische Analyse .....	56
3.9.4	Gen Ontologie .....	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Isolation und Expansion der Stammzellen.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der Zellen.....</b>	<b>62</b>
4.2.1	Verdopplungszeit .....	62
4.2.2	Zellmorphologie .....	63
4.2.3	Zellverhalten in Kultur .....	64
4.2.4	Analyse der Gen- und Proteinexpression durch RT-PCR und FACS .....	65
4.2.4.1	Marker von Haarfollikelstammzellen .....	66
4.2.4.2	Embryonale und stammzellassoziierte Marker anderer Gewebetypen .....	68
4.2.4.3	Cytokeratine .....	69
4.2.4.4	Epitheliale, mesodermale und mesenchymale Marker.....	70
4.2.4.5	Endodermale Marker .....	73
4.2.4.6	Endokrine Progenitormarker und endokrine Marker .....	74
4.2.4.7	Zusammenfassender Vergleich mit bereits identifizierten Stammzellen der Haut und ihren Anhangsgebilden.....	74
<b>4.3</b>	<b>Analyse der Multipotenz .....</b>	<b>76</b>
4.3.1	Differenzierung in Adipozyten .....	77
4.3.2	Differenzierung in Sebozyten .....	78
4.3.3	Differenzierung in Chondrozyten .....	79
4.3.4	Differenzierung in Osteoblasten .....	80
4.3.5	Differenzierung in Muskelzellen .....	81
4.3.6	Differenzierung in Neuronen .....	82
<b>4.4</b>	<b>Analyse des endokrinen Differenzierungspotentials.....</b>	<b>86</b>
4.4.1	Brachyury Expression .....	87
4.4.2	Hepatocyte Nuclear Faktor (HNF) Expression .....	88
4.4.3	Isl1 Expression .....	89
4.4.4	MafA und MafB Expression .....	91
4.4.5	Ngn3 Expression .....	92
4.4.6	Pdx1 Expression .....	92
4.4.7	Proinsulin Expression .....	93
<b>4.5</b>	<b>Analyse der Genexpression mittels Illumina Beadarray .....</b>	<b>96</b>
4.5.1	Genexpression der M1 Zelllinie unter basalen Bedingungen .....	96
4.5.2	Vergleich der Genexpression der M1 Zellen in Abhängigkeit von den Kulturbedingung und Vergleich mit der Pankreas-progenitorzelllinie mJ .....	98
4.5.2.1	Vergleich der NE stimulierten M1 Zellen mit den in HG Medium kultivierten Zellen 99	
4.5.2.2	Vergleich der in HG Medium kultivierten Zellen mit den in M1 B27 Medium kultivierten Zellen .....	105
4.5.3	Analyse ausgewählter Markergene .....	106
4.5.3.1	Regulation der Markergene innerhalb der M1 Zellen .....	109
4.5.3.2	Subanalyse der Markergene .....	112

<b>5</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>114</b>
5.1	Isolierung der Stammzellen.....	114
5.2	Charakterisierung der isolierten Stammzellen .....	115
5.3	Genexpressionsprofil der Typ 1 Zellen .....	120
5.4	Multipotenz der isolierten Stammzellen.....	122
<b>6</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b> .....	<b>125</b>
<b>7</b>	<b><i>Anhang</i></b> .....	<b>126</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	126
7.2	Tabellenverzeichnis .....	129
7.3	Abkürzungsverzeichnis .....	130
7.4	Primersequenzen und Amplifikationsbedingungen der RT-PCR .....	135
7.5	Bibliosphere Analyse der biologischen Prozesse mit den 87 zwischen M1 NE und M1 HG signifikant unterschiedlich regulierten Genen .....	138
7.6	Bibliosphereanalyse der molekularen Funktionen der 87 zwischen M1 NE und M1 HG signifikant unterschiedlich regulierten Gene.....	139
7.7	Bibliosphereanalyse der biologischen Prozesse mit den 313 zwischen M1 HG und M1 B27 signifikant unterschiedlich regulierten Genen .....	140
7.8	Bibliosphereanalyse der molekularen Funktionen der 313 zwischen M1 HG und M1 B27 signifikant unterschiedlich regulierten Gene.....	144
7.9	Mit Zelldifferenzierung assoziierte Gene der 313 zwischen M1 HG und M1 B27 signifikant unterschiedlich regulierten Gene.....	145
7.10	187 aus den 384 ausgewählten Markergenen sind zwischen mJ und M1 HG signifikant unterschiedlich reguliert .....	146
7.11	Markergene der Prioritätsstufe 1 .....	150
7.12	Markergene der Prioritätsstufe 2.....	152
7.13	Regulierte Gene innerhalb der ausgewählten Markergene der Priorität 1 und 2 .....	154
<b>8</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>159</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine Störung des Stoffwechsels, die durch chronische Hyperglykämie charakterisiert ist und durch eine gestörte Sekretion von Insulin und/oder durch eine verminderte Insulinwirkung auf die Zielgewebe (Insulinresistenz) verursacht wird. Nach den Kriterien der DDG und ADA wird anhand der Pathogenese zwischen vier verschiedenen Krankheitstypen unterschieden (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes 2003, Brückel und Kerner 2005):

- Typ 1 Diabetes mellitus, Zerstörung der Insulin produzierenden  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas durch einen Autoimmunprozess
- Typ 2 Diabetes mellitus, Kombination von Insulinresistenz und einer Insulinsekretionsstörung
- Andere spezifische Diabetestypen, die z.B. auf einen genetischen Defekt, eine Erkrankung des exokrinen Pankreas, Endokrinopathien, oder Medikamente zurückzuführen sind
- Gestationsdiabetes (erstmal während der Schwangerschaft aufgetretene oder diagnostizierte Störung des Glukosestoffwechsels)

Der Typ 1 und der Typ 2 Diabetes sind die häufigsten Diabetesformen. Beim Typ 2 Diabetes führt ein komplexes Zusammenspiel von genetischen Faktoren (polygene Ursachen), Umweltfaktoren und Lebensgewohnheiten (vor allem Adipositas und mangelnde körperliche Bewegung) zur Entwicklung einer Insulinresistenz und einer  $\beta$ -Zelldysfunktion (Kahn 2000, Boden 2001).

Der Typ 1 Diabetes entsteht durch eine chronische gegen die Insulin produzierenden  $\beta$ -Zellen gerichtete Autoimmunreaktion, die zur kompletten Zerstörung der  $\beta$ -Zellen führt (Seißler und Scherbaum 2002). Die genauen immunologischen Mechanismen sind bis heute noch unklar. Gesichert ist ein sehr starker Einfluss von genetischen Merkmalen (vor allem HLA-Klasse II Moleküle) und Umweltfaktoren, die beide entscheidend sind für die Induktion der Autoimmunreaktion.

Autoantikörper und autoreaktive T-Zellen gegen Bestandteile der  $\beta$ -Zellen sind charakteristisch (Glutaminsäure Decarboxylase (GAD), Tyrosinphosphatase IA-2 und Insulin) (Seißler und Scherbaum 2006). In Tabelle 1 sind die differentialdiagnostischen Kriterien des Typ 1 und Typ 2 Diabetes zusammengefasst.

	Typ 1 Diabetes	Typ 2 Diabetes
Manifestationsalter	meist Kinder, Jugendliche, junge Erwachsene	meist mittleres bis höheres Erwachsenenalter
Körpergewicht	meist normalgewichtig	meist übergewichtig
Symptome	Polyurie/Polydipsie, Ketoseneigung	häufig initial keine/wenige Beschwerden, Gewichtsverlust, Müdigkeit
Auftreten	akut bis subakut	meist schleichend
Immunphänomene	Autoantikörper positiv	Autoantikörper negativ
Insulinsekretion	vermindert bis fehlend	bei Manifest. vorhanden
Insulinresistenz	fehlend oder gering	oft sehr ausgeprägt
Therapie	Insulintherapie notwendig	Diät alleine oder in Komb. mit oralen Antidiabetika

**Tabelle 1: Differentialdiagnostische Kriterien für Typ 1 und Typ 2 Diabetes bei Diagnosestellung**

In den letzten Jahrzehnten hat die Prävalenz des Typ 1 und besonders des Typ 2 Diabetes kontinuierlich zugenommen. Nach den Daten der WHO wird sich die Zahl der Typ 2 Diabetiker in den nächsten 20–30 Jahren in Deutschland und weltweit wahrscheinlich mehr als verdoppeln (Wild et al. 2004).

Die Hauptursachen liegen in den veränderten Lebensgewohnheiten, d.h. in der verminderten körperlichen Aktivität und der falschen Ernährung mit Steigerung der Nahrungsaufnahme von Lebensmitteln mit besonders ungünstiger Verteilung der Nahrungsinhaltsstoffe. Dies führt zur Entwicklung von Adipositas, metabolischem Syndrom und Insulinresistenz. Vor allem ältere Personen sind davon betroffen, aber auch immer mehr Kinder und Jugendliche entwickeln die Krankheit.

In Deutschland sind momentan mehr als 6 Millionen Menschen an einem Diabetes mellitus erkrankt.

Neue epidemiologische Studien lassen annehmen, dass die Zahl der unentdeckten Personen mit gestörter Glukosetoleranz und manifestem Typ 2 Diabetes sehr hoch ist. In der Region Augsburg wurde bei den über 55-jährigen Menschen eine Diabetesprävalenz von 16% beschrieben. Bei weiteren 24% war ein abnormer Nüchternblutzucker oder eine pathologische Glukosetoleranz nachweisbar, so dass insgesamt bei über 40% eine Störung des Glukosestoffwechsels nachweisbar war (Rathmann et al. 2000).

Die Behandlung des Diabetes mellitus hat zum Ziel, die Lebensqualität wiederherzustellen bzw. zu erhalten, Akutkomplikationen zu vermeiden und Entwicklung von Diabetes-assoziierten Folgekrankheiten zu verhindern (Häring et al. 2003, Brückel und Kerner 2005, American Diabetes Association 2007). Es wird eine möglichst normnahe Einstellung des Nüchtern- und präprandialen Blutzuckers, aber auch der postprandialen Blutzuckerwerte, angestrebt. Die Bedeutung einer möglichst guten Blutzuckereinstellung wurde in zahlreichen Populationsstudien nachgewiesen. Sie zeigen alle übereinstimmend eine signifikante Assoziation zwischen erhöhten Blutzucker bzw. HbA<sub>1c</sub>-Werten und der Entstehung von Mikro- und Makroangiopathien auf, welche in erster Linie für die hohe Morbidität und Mortalität von Diabetikern verantwortlich sind (DCCT Research Group 1993, UKPD Study Group 1998, Stratton et al. 2000, Decode Study Group 2001).

Jeder zweite Diabetiker verstirbt an einem Myokardinfarkt, mehr als 50% aller Patienten, die eine Dialysepflichtigkeit entwickeln, leiden an einem Diabetes mellitus und mehr als 30.000 Amputationen pro Jahr sind in Deutschland auf einen Diabetes mellitus zurückzuführen (Liebl et al. 2002). Für die Mikroangiopathien (Retinopathie und Nephropathie) spielen die Güte der Blutzuckereinstellung und die Diabetesdauer die wichtigste Rolle (DCCT Research Group 1993, Nathan et al. 2005). Bei den makrovaskulären Angiopathien (Apoplex, Myokardinfarkt, periphere arterielle Verschlusskrankheit) sind auch die weiteren Komponenten des metabolischen Syndroms – arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, Adipositas und Insulinresistenz – von sehr großer Bedeutung als zusätzliche Hochrisikofaktoren für eine Artherosklerose (Marx 2003).

Die Ernährungstherapie mit einer vollwertigen, ballaststoffreichen, kohlenhydratreichen (45-60%) und fettarmen Kost (<35%, davon einfach ungesättigte Fettsäuren 10-20%) ist die Grundlage für die Behandlung aller Diabetesformen (Toeller 2005).

Aufgrund der kompletten Destruktion der Insulin produzierenden  $\beta$ -Zellen besteht beim Typ 1 Diabetes ein absoluter Insulinmangel. Die einzig sinnvolle Therapie ist deshalb die Injektion von Insulin, mit der die normale Insulinsekretion möglichst gut nachgeahmt wird (Dreyer et al. 2003). Typ 2 Diabetiker werden zunächst mit nicht-pharmakologischen Maßnahmen (Schulung, Lebensstiländerung) behandelt. Falls dies nicht ausreichend ist, erfolgt im zweiten Schritt eine Einstellung mit einer Mono- oder Kombinationstherapie mit oralen Antidiabetika (Metformin, Sulfonylharnstoffe, Glinide, alpha-Glukosidase-Hemmer, Glitazone) (Häring et al. 2003). Etwa 10% der Patienten entwickeln pro Jahr einen relativen oder absoluten Insulinmangel (Sekundärversagen) (Turner et al. 1999), so dass diese Typ 2 Diabetiker auch auf eine Insulintherapie eingestellt werden müssen.

Obwohl sich durch die Einführung moderner Therapiekonzepte die Diabetestherapie in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert hat, kann die normnahe Blutzuckereinstellung nur bei einem Teil der Patienten erreicht werden.

Die Gründe für eine unbefriedigende Stoffwechseleinstellung sind vielfältig und reichen von der mangelnden Mitarbeit des Patienten (Verständnisschwierigkeiten, fehlende Compliance) bis hin zu einem extrem labilen Stoffwechselverhalten, das auch mit einer intensivierten Therapie nur unzureichend zu behandeln ist. Eine langfristige Normalisierung des Zuckerstoffwechsels ist nach dem heutigen Kenntnisstand nur durch die Zufuhr von funktionell aktiven  $\beta$ -Zellen über eine Transplantation möglich. Weltweit werden deshalb große Anstrengungen unternommen neue Möglichkeiten der Betazellersatztherapie zu entwickeln.

## **1.2 Transplantation beim Diabetes mellitus**

Für die Wiederherstellung der physiologischen Insulinproduktion eines Patienten mit insulinpflichtigem Diabetes mellitus werden momentan zwei Ansätze in der Klinik angewendet:

1. Pankreastransplantation
2. Inselzelltransplantation

Durch die Transplantation des gesamten Pankreasorgans kann eine Normalisierung des Blutzuckers bei 85-87% der Patienten im ersten Jahr erreicht werden (Gruessner und Sutherland 2005). Im Langzeitverlauf liegt das Transplantatüberleben bei etwa 69% (5 Jahre) und 46% (10 Jahre) (Gruessner und Sutherland 2005). Bei einer Inselzelltransplantation ist der operative Eingriff nicht so groß, wie bei der Transplantation des Pankreas, da die Inseln in die Pfortader injiziert werden. Auch die Menge des körperfremden Gewebes ist geringer, wodurch das Komplikationsrisiko reduziert werden kann (Brendel et al. 2003). Durch die Einführung neuer Protokolle für die Immunsuppression (Edmonton-Protokoll) konnten in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt werden. Im ersten Jahr liegt die Insulinunabhängigkeit bei etwa 80%. Leider kommt es im weiteren Verlauf zu einer deutlichen Abnahme der Betazellfunktion, so dass nach 5 Jahren nur noch 10% der Patienten insulinunabhängig waren (Shapiro 2000, Ryan et al. 2005).

Nach erfolgreicher Transplantation sind die Patienten unabhängig von Insulin, Ernährungseinschränkungen und die Blutzuckerentgleisungen sind beseitigt. Beides geht mit einem deutlichen Gewinn an Lebensqualität einher. Der Nachteil ist die Notwendigkeit der immunsuppressiven Therapie, die mit teils schwerwiegenden Nebenwirkungen (Infektneigung, potentielle Tumorentstehung) verbunden ist. Aufgrund dessen muss die Indikation der Pankreas- und der Inselzelltransplantation streng gestellt werden. Meist werden nur Patienten behandelt, die aufgrund einer terminalen Niereninsuffizienz eine Nierentransplantation benötigen oder die durch ausgeprägte Hypoglykämiewahrnehmungsstörungen stark gefährdet sind. Außerdem besteht bei der Pankreas- und Inselzelltransplantation, wie bei allen anderen Transplantationen das Problem, dass die Anzahl der Organspender vergleichsweise gering ist.

Es wird deshalb dringend nach alternativen Behandlungsmethoden gesucht, mit denen einerseits der Mangel an Spenderorganen und andererseits der Einsatz von Immunsuppressiva (durch autologe Zellen) überwunden werden könnten. Eine besonders vielversprechende zukünftige Option für die Generierung von Spenderzellen ist die Verwendung von  $\beta$ -Zellen, die aus Stammzellen (SC) produziert wurden.

### **1.3 Stammzellen**

Eine Stammzelle zeichnet sich vor allem durch drei Eigenschaften aus:

- 1) Sie kann über lange Zeit identische Kopien von sich selbst herstellen (Selbsterneuerung)
- 2) Aus einer Zelle kann sich eine Zellpopulation entwickeln (Klonalität)
- 3) Die Stammzelle besitzt die Fähigkeit sich in einen oder mehrere verschiedene Zelltypen zu differenzieren (Multipotenz)

Normal durchlaufen Stammzellen den Zellzyklus nur langsam (slow cycling nature), was wichtig für den Erhalt des proliferativen Potentials sein könnte und auch die Rate von DNA-Schäden gering hält.

### **1.3.1 Embryonale Stammzellen**

Embryonale Stammzellen (ESC) werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen. Sie besitzen noch pluripotente Eigenschaften, d.h. aus diesen Zellen können sich noch alle der über 200 verschiedenen Zelltypen des Körpers entwickeln. Gene wie Oct-4 oder Nanog werden von diesen Zellen noch exprimiert. Obwohl es bereits über 10 Jahre her ist, dass die ersten humanen ESCs isoliert werden konnten (Thomson et al. 1998), gibt es immer noch viele ungelöste Probleme hinsichtlich genetischer Stabilität, Dedifferenzierung und Beherrschbarkeit der Tumorigenität. Sowohl mit murinen wie auch mit humanen ESCs ist es gelungen, Zelltypen der drei Keimblätter in vitro und in vivo herzustellen. Verwendet werden Cocktails verschiedener Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, um eine gerichtete Differenzierung in definierte Zelltypen zu erreichen. Ein Beispiel ist die Verwendung von Retinsäure. Abhängig von der eingesetzten Konzentration führt die Gabe von Retinsäure bei Embryoid bodies (EBs) zur Differenzierung in die neuronale oder in die myogene Richtung wie z.B. Kardiomyozyten, Neuronen, Gliazellen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Schwannzellen (Kanno et al. 2004, Grivennikov 2008). Außer zu Neuronen konnten ESCs auch zu anderen ektodermalen Zellen, wie epidermalen Keratinozyten differenziert werden (Aberdam et al. 2007). Aber auch hämatopoetische Zellen, Leberzellen und Insulin produzierende Zellen (Lumelsky et al. 2001, Kuai et al. 2003, Jensen 2004, Moore et al. 2006, Chen et al. 2009) sind aus ESCs generiert worden.

Nach einer anfangs sehr geringen Ausbeute differenzierter  $\beta$ -Zellen ist über Gentransfer die Anzahl der  $\beta$ -Zellen erhöht worden und im Tierversuch konnten nach Transplantation der differenzierten  $\beta$ -Zellen die Blutglukosespiegel diabetischer Mäuse wieder normalisiert werden (Blyszczuk et al. 2003).

Der klinische Einsatz von ESC ist, unabhängig vom ethischen Konflikt, jedoch noch kritisch, da es im Tiermodell häufig zur Entwicklung von Tumoren kam (Erdo et al. 2003).

### 1.3.2 Adulte Stammzellen

Postnatal sind im Organismus adulte Stammzellen und Progenitorzellen vorhanden, die lebenslang dafür sorgen, dass die Zelllinien, die das Gewebe ihres Ursprungsortes beinhaltet wieder erneuert werden können (van der Kooy und Weiss 2000). Ursprünglich ging man davon aus, dass diese Stammzellen nur in Zellen ihres Ursprungsortes differenzieren können: Inzwischen konnte gezeigt werden, dass sie auch in der Lage sind in Zellen anderer Gewebe zu differenzieren, auch wenn diese aus anderen Keimblättern stammen (Joshi et al. 2002). Sie werden daher als multipotent bezeichnet. Dass dies durch Zellkernfusion in vivo zurückzuführen ist, ist eher unwahrscheinlich (Clarke et al. 2000).

Es existiert die Theorie, welche die Plastizität von adultem somatischem Gewebe erklären würde. Sie besagt, dass ein Teil der pluripotenten SC der inneren Zellmasse des Embryos nicht ausdifferenziert, sondern im adulten Gewebe erhalten bleibt (Weissmann 2000). Adulte SC haben im Tiermodell bereits die Funktion von verletztem Gewebe wieder verbessern können (Orlic et al. 2003).

In den jeweiligen Geweben residieren die adulten Stammzellen in Nischen, in denen über die einzigartige Umgebung die Selbsterneuerung begünstigt wird und in der die Zellen nicht ausdifferenzieren (Watt et al. 2000). Diese undifferenzierten SC können sich symmetrisch oder asymmetrisch teilen. Bei der asymmetrischen Teilung werden verschiedene Tochterzellen gebildet. Tochterzellen mit dem SC-Phänotyp und andere, die eine begrenzte Zahl an Teilungen durchlaufen können und dann terminal differenzieren, so genannte transit-amplifying cells (TAC) (Greco et al. 2009). Erst durch den Einfluss externer Faktoren kommt es zur Migration der Zellen aus ihrer Nische und anschließend zur Differenzierung.

Da die  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse sich in begrenztem Maße regenerieren können, werden auch im Pankreas adulte SC vermutet. Allerdings existiert bisher noch kein spezifischer Marker, der den Nachweis bzw. die Isolierung erleichtern würde.

Es ist aber bereits gelungen sowohl aus duktalem Gewebe (Ramiya et al. 2000), als auch aus Langerhans-Inseln (Guz et al. 2001) Zelllinien zu generieren, die in der Zellkultur vermehrt werden konnten und nach der Differenzierung und anschließender Transplantation in diabetische Mäuse zu einer Normalisierung des Blutzuckers geführt haben.

Die Therapie mit adulten autologen Stammzellen hätte den prinzipiellen Vorteil der ethischen Unbedenklichkeit und des Umgehens der allogenen Abstoßungsreaktion, so dass keine immunsuppressive Therapie (Typ 2 Diabetes) oder nur eine Niedrigdosis-Therapie (Vermeidung der Reaktivierung der Autoimmunreaktion beim Typ 1 Diabetes) notwendig wäre.

### **1.3.3 Verschiedene Quellen für autologe Stammzellen**

Bisher wurden in mehr als 20 Organen des Körpers (z.B. Knochenmark, Muskel, Gehirn) und im Nabelschnurblut von Neugeborenen adulte Stammzellen gefunden. Darunter mesenchymale Stammzellen (MSC) und hämatopoetische Stammzellen (HSC) aus dem Knochenmark, neurale Stammzellen (NSC), endotheliale Vorläuferzellen (EPC) und Satelliten-Zellen (Stammzellen der Skelettmuskelfasern).

Es ist bereits gelungen SC in Zellen differenzieren zu lassen, die nicht in dem Ursprungsgewebe zu finden sind, aus dem sie stammen. So konnten SC aus dem Knochenmark zu Skelettmuskelzellen transdifferenziert werden (Ferrari et al. 1998, Narita et al. 2008) und Zellen aus dem Fettgewebe transdifferenzierten zu Neuronen (Ning et al. 2008). Ebenso sind Stammzellen aus dem Pankreas (Ramiya et al. 2000), aus nicht pankreatischen endodermalen Geweben wie Leber (Yang et al. 2002) und Intestinaltrakt (Yoshida et al. 2002), sowie Zellen aus dem Knochenmark (Tang et al. 2004) zu Insulin produzierenden Zellen transdifferenziert worden. Der Mechanismus der Transdifferenzierung ist dabei noch nicht ganz geklärt.

Es existiert eine Hypothese, dass Zellen aus Leber, Pankreas und Intestinaltrakt gemeinsame Vorläuferzellen besitzen, die bei Bedarf reprogrammiert oder dedifferenziert werden können (Zhang et al. 2005).

### 1.3.4 Hautstammzellen

Bei den meisten Stammzelltypen (Pankreas, Leber) besteht das Problem, dass ein invasiver Eingriff nötig ist, um autologe Zellen für die Therapie zu gewinnen. Optimal wären Zellen, die leicht bei jedem Patient zu erreichen sind. Dieses Kriterium erfüllen adulte Stammzellen der Haut.

Die Haut befindet sich in einer ständigen Homöostase von Proliferation, Differenzierung und Regeneration, daher ist es nicht überraschend, dass auch hier Nischen für Stammzellen zu finden sind. Neben Stammzellen in der interfollikulären Epidermis (Potten 1981), der Dermis (Toma et al. 2001, Fernandes et al. 2004, Medina et al. 2006) und dem subkutanen Fettgewebe (Kim et al. 2007), wurden auch in den Hautanhangsgebilden wie Talgdrüse (Ghazizadeh und Taichman 2001) und Haarfollikel (Reynolds und Jahoda 1991, Kobayashi et al. 1993, Lyle et al. 1998, Cotsarelis et al. 1990, Oshima et al. 2001, Liu et al. 2003, Trempus et al. 2003, Blanpain et al. 2004, Ito et al. 2004, Morris et al. 2004, Roh et al. 2004, Sieber-Blum et al. 2004, Tumber et al. 2004, Amoh et al. 2005, Selleri et al. 2005, Yano et al. 2005, Hu et al. 2006, Yu et al. 2006, Zhang et al. 2006) potentielle Stammzellen gefunden.



Die Isolation adulter Hautstammzellen wurde bereits für verschiedene Säugetierarten dokumentiert, wie Maus (Cotsarelis et al. 1990, Oshima et al. 2001, Toma et al. 2001, Liu et al. 2003, Blanpain et al. 2004, Fernandes et al. 2004, Ito et al. 2004, Morris et al. 2004, Sieber-Blum et al. 2004, Tumber et al. 2004, Amoh et al. 2005, Selleri et al. 2005, Yano et al. 2005, Medina et al. 2006, Osada et al. 2007), Ratte (Reynolds und Jahoda 1991, Kobayashi et al. 1993, Matsuzaki et al. 1996, Oshima et al. 2001, Fernandes et al. 2004, Claudinot S et al. 2005), Ziege (Yang et al. 2007) und Mensch (Lyle et al. 1998, Roh et al. 2004, Yu et al. 2006, Zhang et al. 2006, Kajahn et al. 2008).

Nachdem für viele dieser Zellen eine gezielte Differenzierung sowohl zu ektodermalen (Neuronen, Glia) (Fernandes et al. 2004, Amoh et al. 2005, Yu et al. 2006, Grinnell und Bickenbach 2007), als auch zu mesodermalen Zellen (Adipozyten, Chondrozyten, glatte Muskelzellen, Osteoblasten) berichtet wurde (Toma et al. 2001, Jahoda et al. 2003, Yu et al. 2006), war unsere Hypothese, dass die SC der Haut auch fähig sein könnten in endokrines Gewebe zu differenzieren.

## **1.4 Morphogenese des Pankreas**

Während der Gastrulation entstehen aus dem Epiblasten drei Keimblätter. Anders als die Haut, die aus dem ektodermalen Keimblatt entsteht, wird die Bauchspeicheldrüse aus dem endodermalen Keimblatt gebildet. Bei der Bildung des definitiven Endoderms (DE) spielen Gene wie Wnt/ $\beta$ -catenin, Nodal, Gata4/6, Foxa2, Sox17 eine wichtige Rolle (Grapin-Botton and Constan 2007). Wie auch bei anderen Organen werden die einzelnen Schritte bis zum fertigen Organ durch extrinsische und intrinsische Signale reguliert. In allen Einzelheiten sind die Signalwege, die daran beteiligt sind noch nicht verstanden. Man weiß jedoch, dass die Entstehung des Pankreas bei der Maus am Tag E8.5 (beim Menschen in Woche 5) beginnt. Zu diesem Zeitpunkt bilden sich eine dorsale und anschließend eine ventrale Pankreasknospe aus dem endodermalen Vorderdarm. Dieser Vorgang ist abhängig von Retinsäure (RA) und der Suppression der Proteine Shh und Ihh (D'Amour et al. 2006, Spence and Wells 2007), was durch FGF2 und Mitglieder der TGF $\beta$ -Familie, wie Aktivin $\beta$ B, verursacht wird (Kim and Melton 1998).

Die Zellen der Knospen bestehen in dieser Phase aus multipotenten Pdx1 positiven Zellen, aus denen die endokrinen, exokrinen und duktaalen Zellen des Pankreas entstehen (Gu et al. 2003). Über Mutationsexperimente wurde gezeigt, dass Pdx1 der Schlüsselfaktor für die Entwicklung der beiden Pankreasknospen ist (Jonsson et al. 1994). Die Vorläuferzellen exprimieren neben Pdx1 auch Hlxb9, HNF6, Nkx6.1, Nkx2.2, Ptf1a, cMyc, Sox9 und Carboxypeptidase A (Bhushan et al. 2001, Wilson et al. 2003, Seymour et al. 2007, Zhou et al. 2007).

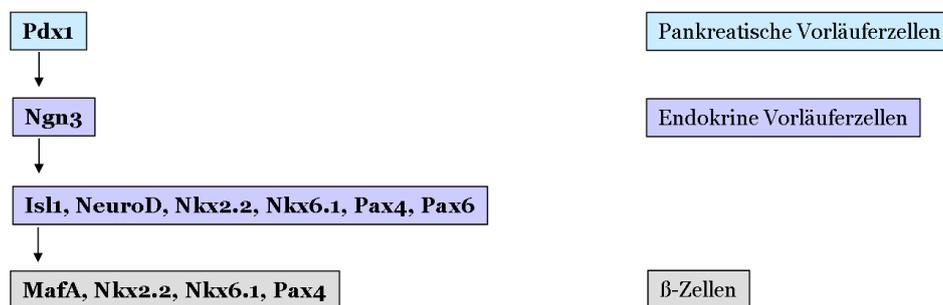
Wachstum, Differenzierung und die Bildung des verzweigten epithelialen Netzwerks des Pankreas könnten ohne epithel-mesenchymale Interaktionen nicht stattfinden (Golosow und Grobstein 1962). Hier spielen zwei Wachstumsfaktorfamilien, die FGFs und die EGFs, eine wichtige Rolle (Kato und Sekine 1999, Miettinen et al. 2000, Bhushan et al. 2001).

Auch in der adulten  $\beta$ -Zelle sind die FGF Signalwege wichtig für das postnatale Wachstum und die Expression des Glukosetransporters Glut2 (Hart et al. 2000). Am Tag E13 fusionieren die zwei Pankreasknospen. Zu diesem Zeitpunkt ist der Notch Signalweg aktiviert, um eine Proliferation der Progenitorzellen ohne vorzeitige Differenzierung zu ermöglichen. Anschließend entscheidet sich, ob sich eine Zelle in die endokrine ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - oder PP-Zellen) oder exokrine (Azinus- oder Duktulizellen) Richtung entwickelt. Ein wichtiger Prozess für diesen Schritt ist nun die Hemmung des Notch Signalwegs, um den Transkriptionsfaktor Ngn3 zu aktivieren. Ngn3 wird nur in den endokrinen Vorläuferzellen exprimiert und dann (wie auch Pdx1) wieder herunter reguliert (Wilson et al. 2003). Ngn3 selbst löst wiederum eine Kaskade von Transkriptionsfaktoren aus, die ebenfalls wichtig für die endokrine Entwicklung sind. Dazu gehören Nkx2.2, NeuroD, Nkx6.1, Pax4, Pax6 und Isl1. Die Expression von Hormonen kann man zu zwei Zeitpunkten feststellen. Die erste Anwesenheit endokriner Zellen wird als primäre Transition bezeichnet und wird etwa von Tag E8.5 bis E10.5 beobachtet. Die sogenannte sekundäre Transition tritt ab Tag E13.5 auf. Ab diesem Zeitpunkt sind alle fünf Hormon-exprimierenden Zellen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , and PP) und Amylase exprimierenden Azinuszellen nachweisbar (Rutter et al. 1968). Ab diesem Zeitpunkt ist die Expression von Nkx6.1 auf  $\beta$ -Zellen beschränkt, während Nkx2.2 von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und PP Zellen exprimiert wird (Jensen 2004).

Während der Embryonalentwicklung werden die neuroektodermale und die pankreatische Differenzierung zeitlich und räumlich teilweise von den gleichen Transkriptionsfaktoren reguliert.

So ist eine Expression von Isl1, NeuroD, Ngn3, Nkx2.2, Nkx6.1 und Pax6 auch in Neuronen zu finden (Sommer und Anderson 1996, Edlund 2002).

Da das Neurofilament Nestin übergangsweise nicht nur in der neuronalen, sondern auch in der pankreatischen und hepatischen Differenzierung exprimiert wird, werden Nestin positive Zellen auch als „multilineage“ Vorläuferzellen des Pankreas betrachtet (Zulewski et al. 2001).



**Abbildung 2: Wichtige Transkriptionsfaktoren der  $\beta$ -Zelldifferenzierung**

## 2 Fragestellung

In der Diabetologie wird, wie in vielen anderen Bereichen der Medizin, die sich mit regenerativen Therapieansätzen beschäftigen, intensiv nach neuen, alternativen Spenderquellen für die Gewinnung von adulten Stammzellen gesucht, aus denen sich durch geeignete Propagierung Insulin produzierende Zellen (IPCs) herstellen lassen. Obwohl die Haut (ektodermal) aus einem anderen Keimblatt, als die Bauchspeicheldrüse (endodermal) stammt, bestehen einige Gemeinsamkeiten (Kajahn et al. 2008). Diese werden bestätigt, durch die Tatsache, dass neuronale (ektodermale) Stammzellen erfolgreich zu IPCs (Hori et al. 2005) und pankreatische Vorläuferzellen zu neuronartigen Zellen differenziert werden konnten (Choi et al. 2004).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines reproduzierbaren, effektiven Protokolls für die Isolierung und Expansion der murinen Haarfollikelstammzellen, die Bestimmung ihrer Charakteristika durch die Analyse der Expression zellspezifischer Marker mittels FACS Analyse, RT-PCR und Genarray. Anschließend wurde die Multipotenz der Haarfollikelstammzellen unter spezifischen Differenzierungsbedingungen getestet, um eine Aussage über die Plastizität treffen zu können. Im letzten Teil der Arbeit wurden verschiedene Stimulationsexperimente mit Substanzen durchgeführt, die bei der endokrinen Differenzierung und der Entwicklung von  $\beta$ -Zellen eine wichtige Rolle spielen.

Mit diesen Experimenten sollten die ersten Daten generiert werden, um die Frage zu klären, inwieweit Stammzellen aus dem Haarfollikel prinzipiell geeignet sein könnten, um in Zukunft als Spenderquelle zu Herstellung von Insulin produzierenden  $\beta$ -Zellen zu dienen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Reagenzien

<b>Substanz</b>	<b>Lieferant</b>
AB-Diluent	Dako (Hamburg)
db-cAMP	Sigma (Taufkirchen)
Agarose	Sigma (Taufkirchen)
Aktivin A	R&D Systems (Minneapolis)
Aktivin B	R&D Systems (Minneapolis)
Albumin aus Rinderserum	Serva (Heidelberg)
Alcian Blue 8GX	Sigma (Taufkirchen)
5 $\alpha$ -Androstan-17 $\beta$ -ol-3-one	Sigma (Taufkirchen)
Antigen Unmasking Solution	Linaris (Wertheim)
Ascorbic acid	Sigma (Taufkirchen)
B27-Supplement	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
rhBDNF	R&D Systems (Minneapolis)
Betacellulin	R&D Systems (Minneapolis)
Betaglycerophosphat	Sigma (Taufkirchen)
Blasticidin	Sigma (Taufkirchen)
BMP4	R&D Systems (Minneapolis)
Chick embryo extract	US Biological (Swampscott)
Cutasept F	BODE Chemie (Hamburg)
Cyclopamin	Sigma (Taufkirchen)
DAB Chromogen	Dako (Hamburg)
DAPT	Sigma (Taufkirchen)
DBZ (Dibenzazepin)	Merck (Darmstadt)
Dexamethason	Sigma (Taufkirchen)
Dibutylryl cyclic-AMP sodium salt	Sigma (Taufkirchen)
Dispase	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
DMSO (Dimethylsulphoxide)	Sigma (Taufkirchen)

<b>Substanz</b>	<b>Lieferant</b>
DNA Ladder (100bp)	Promega (Mannheim)
EDTA	Sigma (Taufkirchen)
rhEGF	Strathman Biotech GmbH (Hannover)
Eosin	Sigma (Taufkirchen)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Exendin 4	Sigma (Taufkirchen)
rmbFGF	R&D Systems (Minneapolis)
rhFGF10	R&D Systems (Minneapolis)
rhFGF4	Sigma (Taufkirchen)
Fibronektin (aus Rattenplasma)	Sigma (Taufkirchen)
FKS	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Forene	Abbott (Baar)
Formaldehyd (36,5%)	Sigma (Taufkirchen)
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche (Mannheim)
G418-BC (selektives Antibiotikum)	Biochrom (Berlin)
Gelatine 2%	Sigma (Taufkirchen)
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck (Darmstadt)
GLP1	Sigma (Taufkirchen)
GLP1 1-37	Bachem (Weil am Rhein)
Goat Serum	Sigma (Taufkirchen)
Hämatoxylin QS	Sigma (Taufkirchen)
Heparin	Pfizer (Berlin)
Hydrocortison	Sigma (Taufkirchen)
rhIGF1	R&D Systems (Minneapolis)
rhIGF2	R&D Systems (Minneapolis)
rmIL-3	R&D Systems (Minneapolis)
Indomethacin	Sigma (Taufkirchen)
(-)-Indolactam V	Alexis Biochemicals (Lörrach)
Insulin	Sigma (Taufkirchen)

<b>Substanz</b>	<b>Lieferant</b>
Isobutyl-Methylxanthin	Sigma (Taufkirchen)
Isofluran	Abbott (Wiesbaden)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
ITS (Insulin-Transferrin-Selenium)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Kaisers Glyceringelatine	Merck (Darmstadt)
Ketanest (=Ketamin)	Pfizer (Berlin)
Kollagen	BD Biosciences (Heidelberg)
Laminin	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin 200mM (100x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Lipofectamine 2000	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Loading Dye	Promega (Mannheim)
LY-294,002 hydrochloride	Sigma (Taufkirchen)
Matrigel	BD Biosciences (Heidelberg)
rhM-CSF	R&D Systems (Minneapolis)
MEM (non-essential Amino Acids)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol	Sigma (Taufkirchen)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Mitomycin C	Sigma (Taufkirchen)
N-2 Supplement	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumbutyrat	Sigma (Taufkirchen)
Natriumthiosulfat	Sigma (Taufkirchen)
rmNGF	R&D Systems (Minneapolis)
Nicotinamid	Sigma (Taufkirchen)
rmNodal	R&D Systems (Minneapolis)
rmNoggin	R&D Systems (Minneapolis)
NT-3	Peprtech (Hamburg)
dNTP-Mix (je 5mM)	Qiagen (Hilden)
Oil Red O	Sigma (Taufkirchen)
Perhydrol 30%	Linaris (Wertheim)
Penicillin/Streptomycin (20x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Peroxide Solution	KPL (Gaithersburg)
Pikolinsäure	Sigma (Taufkirchen)

---

<b>Substanz</b>	<b>Lieferant</b>
Poly-D-Lysin hydrobromide	Sigma (Taufkirchen)
Poly-L-Arginin	Sigma (Taufkirchen)
Poly-L-Lysin	Sigma (Taufkirchen)
Pyrogallol	Sigma (Taufkirchen)
Retinsäure (all-trans)	Sigma (Taufkirchen)
Retinsäure (cis)	Sigma (Taufkirchen)
RNase-Inhibitor (30U/ $\mu$ l)	Eppendorf (Hamburg)
Rompun (=Xylazin)	Bayer (Berlin)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Saponin	Fluka (Taufkirchen)
Silbernitrat	Sigma (Taufkirchen)
Streptavidin	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Streptozocin	Sigma (Taufkirchen)
Sucrose	Sigma (Taufkirchen)
hTGF $\beta$ 1	Peprtech (London)
Tissue Embedding Medium GSV1	SLEE Medical GmbH (Mainz)
TMB	Linaris (Wertheim)
TransFast™ Transfection Reagent	Promega (Mannheim)
Troglitazone	Biozol (Eching)
Trypsin-EDTA (10x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Tween	Sigma (Taufkirchen)
Vectashield Hard Set Mounting Medium with DAPI	Linaris (Wertheim)
Versene (100x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Wnt3a	R&D Systems (Minneapolis)
WY-14643	Sigma (Taufkirchen)

**Kits**


---

Fast Red Substrate System	Dako (Hamburg)
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega (Mannheim)
HotStarTaq Plus	Qiagen (Hilden)
LightCycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I	Roche (Mannheim)
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel (Düren)
Omniscript Reverse Transkription	Qiagen (Hilden)
Rneasy Plus Mini	Qiagen (Hilden)
Vectastain ABC Kit	Linaris (Wertheim)
Vector NovaRED (für Peroxidase)	Linaris (Wertheim)

**Vector**


---

pLenti6/V5-D-TOPO 6963 bp	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
---------------------------	------------------------------

**Primäre Antikörper (Quelle)**


---

BCRP1 (rat)	Abcam (Cambridge)
CD3 (rat)	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD9 (Tetraspanin) (rat)	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD16/CD32 (mouse)	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD16/CD32 (rat)	eBioscience (San Diego)
CD25-FITC (rat)	ImmunoTools (Friesoythe)
CD29 (β1-Integrin) (rat)	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD29-FITC (β1-Integrin) (armenian hamster)	Biolegend (San Diego)
CD31-PE (PECAM-1) (rat)	eBioscience (San Diego)
CD34 (rat)	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD34-PE (rat)	eBioscience (San Diego)
CD44-FITC (rat)	ImmunoTools (Friesoythe)
CD45-PE (Ly-5) (rat)	ImmunoTools (Friesoythe)

### Primäre Antikörper (Quelle)

---

CD49f-PE ( $\alpha$ 6-Integrin) (rat)	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD56 (NCAM) (mouse)	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD56 (NCAM) (rabbit)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
CD56-PE (NCAM) (rabbit)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
CD62L-FITC (L-Selektin) (rat)	ImmunoTools (Friesoythe)
CD73-PE (Ecto-5-nucleotidase) (rat)	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD90.1-FITC (Thy-1) (mouse)	ImmunoTools (Friesoythe)
CD90.2-PE (Thy-1) (rat)	eBioscience (San Diego)
CD105 (Endoglin) (rat)	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD105-PE (Endoglin) (rat)	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD106-FITC (VCAM-1) (rat)	eBioscience (San Diego)
CD117-PE (c-kit) (rat)	ImmunoTools (Friesoythe)
CD117-FITC (c-kit) (rat)	ImmunoTools (Friesoythe)
CD133-FITC (Prominin 1) (rat)	eBioscience (San Diego)
CD138 (Syndecan) (rat)	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD138-PE (Syndecan) (mouse)	ImmunoTools (Friesoythe)
CD184-PE (CXCR4) (rat)	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD200-FITC (OX-2) (rat)	Serotec (Düsseldorf)
CK19 (mouse)	Dako (Hamburg)
CK20 (mouse)	Abcam (Cambridge)
CK20 (mouse)	Dako (Hamburg)
Desmin (mouse)	Sigma (Taufkirchen)
E-Cadherin (mouse)	BD Pharmingen (Heidelberg)
FLK1 (VEGFR-2) (rat)	eBioscience (San Diego)
Glukagon (mouse)	Sigma (Taufkirchen)
Insulin (guinea pig)	Dako (Hamburg)
Isl1 (goat)	eBioscience (San Diego)
MafA (rabbit)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
MafB (rabbit)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Map2 (mouse)	Chemicon (Temecula)
MHC II-FITC (mouse)	Acris (Herford)
Myelin-oligodendrocyte (mouse)	Chemicon (Temecula)

### **Primäre Antikörper (Quelle)**

---

Nestin (mouse)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Ngn3 (goat)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
PSA-NCAM (mouse)	Chemicon (Temecula)
Proinsulin (mouse)	HyTest (Turku)
Sca-1-PE (Ly-6A/E) (rat)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Somatostatin (mouse)	Sigma (Taufkirchen)
SSEA-1-PE (mouse)	Kamiya Biomedical Company (Seattle)
SSEA-4-PE (mouse)	Chemicon (Temecula)
TetR (rabbit)	MoBiTec (Goettingen)
$\beta$ III Tubulin (mouse)	Promega (Mannheim)

### **Sekundäre Antikörper und Isotypkontrollen (Spezifität)**

---

Cy-3 (guinea pig)	Abcam (Cambridge)
IgG-AP (goat)	Sigma (Taufkirchen)
IgG-FITC (goat)	KPL (Gaithersburg)
IgG-FITC (mouse)	Sigma (Taufkirchen)
IgG-FITC (mouse)	KPL (Gaithersburg)
IgG-FITC (rabbit)	Sigma (Taufkirchen)
IgG-PE (mouse)	BD Pharmingen (Heidelberg)
IgG <sub>1</sub> -FITC (mouse)	BD Pharmingen (Heidelberg)
IgG <sub>1</sub> -PE (mouse)	eBioscience (San Diego)
IgG <sub>1</sub> -FITC (rat)	eBioscience (San Diego)
IgG <sub>1</sub> -PE (rat)	eBioscience (San Diego)
IgG <sub>2a</sub> -FITC (rat)	BD Pharmingen (Heidelberg)
IgG <sub>2a</sub> -PE (rat)	BD Pharmingen (Heidelberg)
IgG <sub>2b</sub> -PE (rat)	eBioscience (San Diego)

### 3.2 Medien und Puffer

Advanced DMEM/F12 (1:1)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
DMEM No Glucose 1x	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
DMEM D6429 (high glucose)	Sigma (Taufkirchen)
DMEM D6046 (low glucose)	Sigma (Taufkirchen)
EDGS	Tebu-bio (Offenbach)
EpiLife	Tebu-bio (Offenbach)
ES-Cult Basal Medium-A	StemCell Technologies Inc (Vancouver)
HCGS	Tebu-bio (Offenbach)
HepatoZYME-SFM	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Iscove´s Modified DM I3390	Sigma (Taufkirchen)
Knockout DMEM	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Knockout serum replacer	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Minimum essential Medium Eagle M8042 Alpha Modification	Sigma (Taufkirchen)
OPTI-MEM	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
PBS	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
RPMI 1640	Biochrom AG (Berlin)
START V Medium	Biochrom AG (Berlin)
TAE-Puffer	50 x Stammlösung: 121 g Tris-Base 28,5 ml Eisessig 50ml 0.5M EDTA (pH8.0) (auf 0,5 l Wasser) Gebrauchslösung: 40 ml auf 2 l auffüllen

### 3.3 Geräte

Analysenwaage Kern 770	Kern & Sohn (Karlsruhe)
BD FACS Calibur	BDBiosciences (Heidelberg)
BIOFUGE fresco	Heraeus (Hanau)
BioPhotometer 6131	Eppendorf (Hamburg)
Brutschrank Heracell	Heraeus (Hanau)
Brutschrank APT.LINE CB	Binder (Tuttlingen)

Elektrophoresekammer	MWG Biotech (Ebersberg)
Geldokumentationssystem	Intas (Göttingen)
IKAMAG Magnetrührer	IKA (Staufen)
Kamera Leica DFC 340 FX mit Leica Application Suite	Leica (Wetzlar)
Kryostat MNT	SLEE Medical GmbH (Mainz)
Light Cycler mit Software Version 3.5	Roche (Mannheim)
Mikroskop Leica DM 2500	Leica (Wetzlar)
Mini-Zentrifuge Spectrafuge	NeoLab (Heidelberg)
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann (Eberstadt)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Schüttelgerät Polymax 1040	Heidolph (Schwabach)
Sterilbank Hera Safe	Heraeus (Hanau)
Thermocycler: GeneAmp PCR System 9700	PE Applied Biosystems (Weiterstadt)
Vortex-Schüttler	VWR International (Darmstadt)
Wasserbad WNB 7-45	Memmert (Schwabach)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)

### 3.4 Verbrauchsmaterial

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Blutzucker-Teststreifen "Free Style"	Abbott Diabetes Care (Wiesbaden)
Blutlanzetten SOLOFIX	B. Braun Avitum AG (Melsungen)
Culture Slides (4 Well)	BD / Falcon (Heidelberg)
Deckgläser	Menzel (Braunschweig)
FACS-Zentrifugenröhrchen	BD / Falcon (Heidelberg)
Kanülen	B. Braun Avitum AG (Melsungen)
Küvetten	Brand (Wertheim)
LightCycler Cappillaries	Roche (Mannheim)
Mikrotiterplatten (6/12/24 Well)	Corning (München)

---

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Mikrotiterplatten (6 Well, Ultra low attachment)	Greiner Bio-One (Solingen-Wald)
Mikrotiterplatten (96 Well)	Greiner Bio-One (Solingen-Wald)
Objektträger SuperFrost Plus	Menzel (Braunschweig)
PCR-Tubes (0,2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Brand (Wertheim)
Serologische Pipetten	BD / Falcon (Heidelberg)
Spritzen	BD / Falcon (Heidelberg)
Spritzenvorsatzfilter	Millipore (Billerica)
1,5 ml Tubes	Eppendorf (Hamburg)
15/50 ml Tubes	Corning (München)
UV-Küvetten mikro	Omnilab (Bremen)
Zellkulturflaschen	Corning (München)
Zellschaber (cell scraper)	Sarstedt (Nümbrecht)

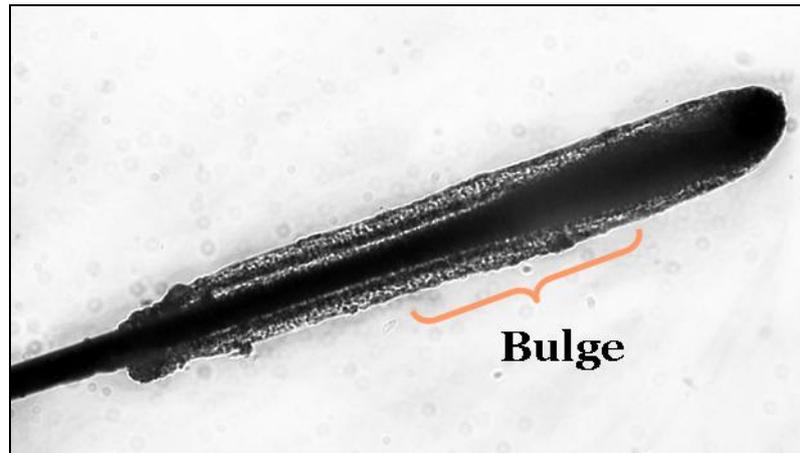
### **3.5 Versuchstiere**

Es wurden männliche 6-21 Wochen alte C57BL/6JRccHsd „black 6“ bzw. Balb/c Mäuse für die Gewinnung der Zellen verwendet. Die Tiere wurden von Harlan-Winkelmann bezogen. Sie wurden entsprechend des Tierschutzgesetzes gehalten. Der Versuch ist von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

### **3.6 Zellbiologische Methoden**

#### **3.6.1 Isolierung der Haarfollikelstammzellen aus Mäusen**

Die Mäuse wurden in einer Glasglocke mit Isofluran (Forene®) narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Anfangs sind die Mäuse noch mit Cutasept F besprüht worden. Da die Zellausbeute aber eventuell durch diese Prozedur reduziert werden könnte, ist das Desinfektionsmittel nach kurzer Zeit weggelassen worden. Mit einer sterilen Schere wurde ein Teil des dorsalen Fells (versuchsweise auch vom Bauch und Barthaarfollikeln aus dem Bereich der Schnauze) abgetrennt. Die Fellproben kamen dann über Nacht in eine Dispaselösung (4mg/ml in DMEM HG) zum Verdau. Danach wurden die Haare zusammen mit den Haarfollikeln aus der Haut gezupft und zwischen zwei und zwanzig Minuten in 0,05% Trypsin verdaut. Anschließend wurde mit 2ml FKS inaktiviert, die Zellsuspension mit PBS gewaschen und in 24-Well-Platten ausgesät.



**Abbildung 3: Gezupftes Anagenbarthaar mit Lage der Bulgeregion, direkt nach Dispaseverdau in PBS**

### **3.6.2 Kulturbedingungen der Zellen**

Die isolierten Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlendioxid zunächst in 24-Well-Platten gehalten und bei Zunahme der Zellzahl in 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (mit 5ml Medium) umgesetzt.

Um herauszufinden in welchem Medium das Wachstum am Besten ist, wurden die Zellen parallel in verschiedenen Medien kultiviert. Um zu sehen, ob ein niedrigerer Sauerstoffgehalt das Wachstum verbessert, wurden in einem Versuch Zellen bei einem Sauerstoffgehalt von 3% statt 21% kultiviert. Das Medium wurde zweimal die Woche gewechselt.

### **3.6.3 Beschichtung der Wellplatten und Zellkulturflaschen**

Neben der Verwendung unterschiedlicher Medien wurden auch verschiedene Beschichtungen der Zellkulturflaschen getestet, um herauszufinden, ob sich die Zellen mit einer Beschichtung besser kultivieren lassen. Verwendung fanden dazu Faktoren, die die Anheftung der Zellen unterstützen können. Einige dieser Beschichtungen wurden später auch bei den Stimulationsansätzen eingesetzt.

### **3.6.3.1 Poly-L-Arginin und Poly-L-Lysin**

Poly-L-Arginin bzw. Poly-L-Lysin wurden in Wasser gelöst, so dass sich eine Konzentration von 0,1mg/ml ergab. Die Lösung wurde auf die Platten bzw. auf die Kulturflaschen gegeben und für 6 Std. bei 37°C inkubiert. Nachdem die Lösung abgenommen war, wurde 2x mit PBS und 1x mit Medium gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen auf die beschichteten Platten gegeben.

### **3.6.3.2 Fibronectin**

Auf die Wellplatten wurde die Fibronectinlösung in einer Konzentration von 10µg/ml (in PBS) gegeben. Die Platten wurden für drei Stunden bei 37°C in den Brutschrank gestellt und danach einmal mit PBS und einmal mit DMEM HG gewaschen.

### **3.6.3.3 Gelatine**

Für die Beschichtung mit Gelatine wurde die 2%ige Gelatinelösung in PBS aufgelöst (10mg/ml) und für 3 Std. bei 37°C auf die Platten gegeben. Anschließend wurde 2x mit PBS und einmal mit Medium gewaschen und die Zellen mit Medium auf die Platten gegeben.

### **3.6.3.4 Kollagen**

Die Kollagenlösung (3,76mg/ml) wurde 1:5 mit sterilem PBS verdünnt. In einer Menge von 40µl/cm wurde die Lösung mit dem Cell Scraper auf die Platten bzw. auf die Kulturflaschen gegeben und unter der Sterilbank über Nacht zum Trocknen stehen gelassen.

### **3.6.3.5 Lysin-Laminin Doppelbeschichtung**

Poly-D-Lysin bzw. Laminin wurden mit destilliertem Wasser in eine Lösung mit der Konzentration 15 µg/ml gebracht. Zuerst wurde die Lysinlösung auf die Wells (etwa 1ml für 9,6cm<sup>2</sup>) gegeben und für 4 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit sterilem Wasser gewaschen und dann über Nacht bei 4°C mit Laminin beschichtet (1ml pro Well). Bevor die Zellen auf die Platten gegeben wurden, wurde 2x mit H<sub>2</sub>O und einmal mit Medium waschen.

### **3.6.3.6 Matrigel**

Das Matrigel wurde 1:1000 in DMEM HG verdünnt (0,1%). Auf eine 25cm<sup>2</sup> Kulturflasche wurde 5ml der Lösung geben und 1,5h bei RT inkubiert. Danach wurde einmal mit DMEM gewaschen und die Zellen hinzugegeben.

## **3.6.4 Stimulation**

Es wurden Stimulationsexperimente durchgeführt, in denen der Einfluss von metabolischen und hormonellen Faktoren (einzeln, oder kombiniert) auf die Expression untersucht werden sollte. Nach der Stimulation wurden die Zellen von der Flasche genommen und die RNA für die PCR-Analyse in cDNA umgeschrieben und weiter analysiert.

### **3.6.4.1 Aktivin A und Aktivin B**

Aktivin A (bA/bA) und B (bB/bB) gehören zur TGFβ Familie. Aktivin B hat in ESCs nach einer 15tägigen Exposition zu einer Hochregulation von Pdx1 geführt. Marker für das frühe pankreatische Endoderm, wie HNF3β und GATA4, aber auch Shh wurden ebenfalls stärker exprimiert. Eine Induktion der Ngn3 Expression wurde ebenfalls beschrieben (Kim und Hebrok 2001). NeuroD wurde dagegen gehemmt.

Diese Effekte waren bei Aktivin B stärker als bei Aktivin A (D'Amour et al. 2005, Frandsen et al. 2007). Auch in der Haut (vor allem in der verwundeten Haut) wird Aktivin A exprimiert. Es wurde beobachtet, dass die Follikelinduktion in der Haut nicht beginnt, solange BMP2, BMP4 und Aktivin A nicht von ihren jeweiligen Antagonisten Noggin oder Follistatin ausreichend gehemmt werden (Schmidt-Ullrich und Paus 2005).

#### **3.6.4.2 Betacellulin**

Betacellulin ist einer von sieben Wachstumsfaktoren, die an den EGFR (ErbB1) binden können. In der Haut ist die Expression auf die suprabasalen Keratinozyten beschränkt. Bei einer Behandlung mit Retinsäure wurde die Betacellulin Expression in humaner Haut deutlich reduziert. Eine Überexpression verzögert die murine Haarfollikel Entwicklung und den Zyklus (Schneider et al. 2008). Da es – wie Aktivin A und GLP1 – die Expression von Pax4 anregen kann, wird es auch als  $\beta$ -Zell Mitogen benutzt (Brun et al. 2008).

#### **3.6.4.3 BMP 4**

Wie die Aktivine sind auch die „Bone morphogenetic proteins“ (BMPs) Mitglieder der TGF $\beta$  Familie. BMP4 ist in der Lage den undifferenzierten Zustand von ESCs unabhängig von LIF zu erhalten. Es wurde auch schon erfolgreich für eine Dedifferenzierung epidermaler Keratinozyten verwendet. Damit konnte die Expression des embryonalen Markers Oct4 und seinen Zielgenen Sox2 und Nanog herbeigeführt werden (Grinnell und Bickenbach 2007). Im Haarfollikel ist zuerst eine Hemmung des mesenchymalen BMP nötig um die SC zu aktivieren, weil es die Selbsterneuerung unterstützt. Für die weitere Differenzierung der aktivierten SC in die verschiedenen Haarfollikelzelllinien muss hingegen eine Aktivierung von BMP erfolgen (Fuchs 2008).

#### **3.6.4.4 Cyclopamin**

Das Steroidalkaloid Cyclopamin ist ein potenter Inhibitor des Hedgehog-Signalweges. Diese Hemmung ist essentiell für die Ausbildung der Pankreasknospen aus dem endodermalen Vorderdarm. In vitro ist Cyclopamin erfolgreich für die Differenzierung humaner ESCs in Zellen des definitiven Endoderms verwendet worden (D'Amour et al. 2005).

#### **3.6.4.5 DAPT**

DAPT ist ein Inhibitor der  $\gamma$ -Sekretase, des Enzyms, das den intrazellulären Teil des Notchrezeptors abspaltet, und damit die Translokation und die Expression der Zielgene aktivieren kann. Nach  $\gamma$ -Sekretasehemmung wurde eine Steigerung der Ngn3 Expression beschrieben (D'Amour et al. 2006).

#### **3.6.4.6 DBZ**

Dichlorobenzamilhydrochlorid (DBZ) ist wie DAPT ein  $\gamma$ -Sekretaseinhibitor. Bei der Exposition von intestinalem Epithel mit DBZ wurde eine Differenzierung zu Becherzellen herbeigeführt (Ootani et al. 2009).

#### **3.6.4.7 db-cAMP**

N<sup>6</sup>,2'-O-Dibutyryladenosine 3',5'-cyclic monophosphat (db-cAMP) ist ein Analogon von cAMP. Da es aber hydrophober ist, kann es leichter die Zellmembran passieren. In der  $\beta$ -Zelle bewirkt ein erhöhter cAMP Spiegel eine Depolarisation, die zur Insulinausschüttung führt. In einer Arbeit, die aus Hautstammzellen Insulin positive Zellen herstellen konnte, zeigten sowohl Retinsäure wie auch db-cAMP einen positiven Effekt (Guo et al. 2009).

#### **3.6.4.8 EGF**

Der Epidermal Growth Factor (EGF) spielt bei der Einleitung der Mitose eine Rolle und ist an Differenzierungsprozessen beteiligt. Bei der Pankreasorganogenese wird er vom Mesenchym sezerniert und stimuliert die Proliferation der Vorläuferzellen. Aus diesem Grund wird EGF in Protokollen der  $\beta$ -Zelldifferenzierung verwendet (Edlund 2002, Jiang et al. 2007, Fuchs 2008, Tateishi et al. 2008). Im Haarfollikel kommt es bei einer Überexpression von EGF zu einem Entwicklungsstillstand. Bei einem Defekt im EGF Rezeptor ist die Wachstumsphase (Anagen) verlängert (Murillas et al. 1995).

#### **3.6.4.9 Exendin 4**

Exendin 4 ist ein langwirksamer GLP1-Agonist. Es bindet mit der gleichen Affinität an den Rezeptor, wird im Gegensatz zu GLP1 aber nicht durch die Dipeptidylpeptidase 4 abgebaut. (Göke et al. 1993, Greig et al. 1999). Wegen seines insulinotropen Effekts wird es erfolgreich in der Diabetestherapie eingesetzt. Auch in vitro stimuliert Exendin 4 die Differenzierung und Proliferation von  $\beta$ -Zellen und hemmt die Apoptose (Tang et al. 2004, Bai et al. 2005, D'Amour et al. 2005, Lock und Tzanakakis 2007, Wu et al. 2007).

#### **3.6.4.10 FGF**

Mitglieder der FGF Familie spielen eine Rolle bei epithel-mesenchymalen Interaktionen in der Entwicklung des Pankreas. bFGF (auch FGF2 genannt) ist wichtig für die Herunterregulierung von Shh bei der Entwicklung der beiden pankreatischen Ausstülpungen in der frühen Pankreasorganogenese. FGF10 induziert die Proliferation pankreatischer Vorläuferzellen und hemmt deren Differenzierung (Lumelsky et al. 2001, Edlund 2002, Miralles et al. 2006, Jiang et al. 2007). In der Haut weisen Mäuse ohne funktionierenden FGF Rezeptor2-IIIb eine reduzierte Anzahl an Haarfollikeln auf (Schlake 2005).

#### **3.6.4.11 GLP1**

Glucagon-like Peptid 1 (GLP1) ist ein Inkretin, das von den L-Zellen des Intestinaltraktes produziert wird. In vivo stimuliert es die Produktion von Insulin in der Bauchspeicheldrüse, verzögert die Entleerung des Mageninhaltes in den Darm, senkt den Glukagonspiegel und hemmt Appetit und Durst. GLP1 steigert die Neogenese und Differenzierung von Inselzellen. In vitro und in vivo stimuliert GLP1 die Pdx1 und Pax4 Expression (Stoffers et al. 2000, Bai et al.2005, Lock und Tzanakakis 2007, Brun et al. 2008).

#### **3.6.4.12 IGF**

Der Insulin-like growth factor (IGF) aktiviert den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Signalweg. In der Haut wird IGF im Bereich der dermalen Papille (DP) gebildet. Sowohl IGF1 als auch IGF2 wurden in Protokollen zur terminalen Differenzierung in Insulin produzierende Zellen verwendet (Paus und Cotsarelis 1999, D'Amour et al. 2005, Tateishi et al. 2008, Guo et al 2009).

#### **3.6.4.13 (-)-Indolactam V**

Indolactam V, ein Indolalkaloid, aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche in Signaltransduktionswegen bei Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Tumorentstehung involviert ist (Nishizuka 1992). In einem Drug-Screeningprogramm von 5000 Substanzen, in dem die Zahl von aus ESCs generierten Pdx1 exprimierender Zellen untersucht worden ist, wurde (-)-Indolactam V (ILV) als potentester Differenzierungsfaktor beschrieben. Da auch Retinsäure (RA) an die PKC $\alpha$  bindet, wird durch ILV möglicherweise der Effekt von RA bei Beginn der Pankreasorganogenese nachgeahmt (Chen et al. 2009).

#### **3.6.4.14 LY-294,002 Hydrochlorid**

LY-294,002 ist ein Inhibitor des PI3K Signalwegs, welcher wichtig für den Erhalt der Selbsterneuerung ist. Es ist bekannt, dass für die Differenzierung von Stammzellen eine niedrige Konzentration von Serum (FKS) (enthält IGF) oder Serumersatz (SR) (enthält Insulin) günstig ist. Insulin und IGF sind Agonisten des PI3K Signalwegs. Bei der Differenzierung von ESCs in endodermale Zellen konnte durch die Kombination von Aktivin A oder Nodal mit dem PI3K Inhibitor LY-294,002 die Differenzierung gesteigert werden (McLean et al. 2007).

Andererseits wurde auch berichtet, dass LY-294,002 die Glukose induzierte Pax4 Expression hemmt, was für eine pankreatische Differenzierung kontraproduktiv wäre (Brun et al. 2008).

#### **3.6.4.15 Natriumbutyrat**

Natriumbutyrat ist eine kurzkettige Fettsäure, die im Kolon durch den bakteriellen Abbau von Ballaststoffen, entsteht. Natriumbutyrat ist ein Histondeacetylaseinhibitor, der in verschiedenen Krebszellen zu Wachstumsstop und Apoptose führt (Medina et al. 1997). Im Bereich der pankreatischen Differenzierung bewirkt Natriumbutyrat eine Induktion des Mesendoderms bzw. des definitiven Endoderms mit einer Hochregulation von Pdx1, p48, Isl1 und Nkx6.1 (Goicoa et al. 2007). In Kombination mit Aktivin A wurde mit Natriumbutyrat eine Differenzierung von ESCs in DE Zellen erreicht, die Sox17, HNF3 $\beta$ , HNF4 $\alpha$ , CK18, CK19 und GATA4 exprimierten. Der Effekt von Natriumbutyrat alleine war weniger ausgeprägt (Jiang et al. 2007).

#### **3.6.4.16 Nicotinamid**

Nicotinamid ist Bestandteil der Koenzyme, NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup>, die reversibel Wasserstoff übertragen, wodurch es große biochemische Bedeutung in vielen biologischen Prozessen, wie Nährstoffmetabolismus, Signaltransduktion und Erhalt der Genomintegrität besitzt. In vitro erhöhte Nicotinamid die Differenzierung

humaner fetaler Pankreaszellen in Insulin, Glukagon und Somatostatin exprimierende Zellen und schützte diese vor Desensibilisierung bei Langzeitglukosestimulation. Bei der Differenzierung von EBs war nach Gabe von Nicotinamid die Anzahl von Insulin positiven Zellen erhöht. Diese Effekte wurden unter anderem der Inhibition der Poly (ADP) Ribose Polymerase zugeschrieben. Die genauen Wirkmechanismen von Nicotinamid sind hinsichtlich der Betazellentwicklung aber noch nicht bekannt (Lumelsky et al. 2001, Tang et al. 2004, Jiang et al. 2007, Lock und Tzanakakis 2007).

#### **3.6.4.17 Nodal**

Wie die Aktivine und BMBs gehört Nodal auch zur TGF $\beta$  Familie und ist essentiell für die Entstehung des Endoderms in der Embryogenese. In verschiedenen Protokollen wurde Nodal für die Generierung von  $\beta$ -Zellen eingesetzt (Chen et al. 2009).

#### **3.6.4.18 Noggin**

Noggin ist ein BMP-Inhibitor. In der Haut wirkt er als wichtiger primärer dermaler Reiz und wird von Zellen im Bereich der dermalen Papille gebildet. Noggin wurde als wichtiger Faktor für die Haarschaftbildung und die Haarfollikelinduktion beschrieben (Botchkarev und Paus 2003, Schmidt-Ullrich und Paus 2005, Blanpain und Fuchs 2006). Bei Differenzierungsexperimenten mit humanen ESCs wurde Noggin eingesetzt, um die Ausbeute an Pdx1 und Insulin exprimierenden Zellen zu erhöhen (Jiang et al. 2007).

#### **3.6.4.19 Pikolinsäure**

Pikolinsäure ist, wie Nicotinamid, ein L-Tryptophanmetabolit. Aus diesem Zusammenhang erhofften wir uns auch eine induktive Wirkung auf die endokrine Differenzierung.

#### **3.6.4.20 Retinsäure (cis und all-trans)**

Retinsäure (RA) übt *in vivo* eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von Ektoderm und Mesoderm aus. *In vitro* wurde die all-trans-RA ausgiebig in Protokollen für neuronale Differenzierung verwendet, da es über den Wnt Antagonist Dkk-1, unter anderem, die Expression des neuronalen Markers Nestin induzierte. Zusätzlich bewirkt RA in EBs die Bildung von Zellen mit Markern des frühen Endoderms (Shh, Nestin, Isl1, Nkx2.2, Pax6, in einigen Studien auch Pdx1). Bei SKPs wurde mit RA Pax4 und Pax6 stimuliert. Im adulten Pankreas hat es insulinotrope Effekte (Tulachan et al. 2003, D'Amour et al. 2005, McKiernan et al. 2007).

#### **3.6.4.21 Wnt3a**

Auch der Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweg spielt bei der Bildung des definitiven Endoderms eine wichtige Rolle. Der Wnt Signalweg wird am effektivsten über einen GSK3 $\beta$  Inhibitor oder Wnt3a aktiviert. Bei ständiger Aktivierung bewirkt er bei murinen und humanen ESCs eine reversible mesendodermale Differenzierung in Brachyury, GATA2, GATA4, HNF3 $\beta$ , Nkx2.2 und Sox17 positive Zellen (D'Amour et al. 2005, Bakre et al. 2007, Grapin-Botton and Constam 2007, Lock und Tzanakakis 2007). In der Wulstregion des Telogen (Ruhephase) Haarfollikels besteht kaum Wnt Aktivität, da Gene, die für Wnt Inhibitoren kodieren, hoch reguliert und Gene, die Wnt stimulieren (Wnt3, Wnt3a) runter reguliert, sind. Eine Aktivierung des Wnt Signalwegs ist in der Haut von Mäusen unabdingbar für die Bildung der Haarplakode und des HFs. Die Differenzierung von Talgdrüsenzellen wird durch Wnt3a gehemmt (Schmidt-Ullrich und Paus 2005, Blanpain und Fuchs 2006, Fuchs 2008).

### 3.6.5 Differenzierung in einen anderen Zelltyp

Der beste Beweis für die Multipotenz von Zellen ist die Differenzierung der Zellen in verschiedene Zelltypen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Differenzierungspotential der isolierten Haarfollikelzellen in Adipozyten, Chondrozyten, Hepatozyten, Muskelzellen, Neuronen, Osteoblasten und Sebozyten untersucht. Hierfür wurden Zellen in einer Zahl von 20.000/Well auf 6-Well-Platten, oder 10.000/Well auf Culture Slides in das normale Wachstumsmedium ausgesät. Nach zwei Tagen wurde das Medium abgenommen, die Wells mit PBS gewaschen und das Differenzierungsmedium auf die Zellen gegeben. Das Medium wurde zweimal/Woche gewechselt.

#### 3.6.5.1 Differenzierung in Adipozyten

Für die Differenzierung in Adipozyten wurden die Zellen für 14 Tage mit dem Differenzierungsmedium kultiviert.

DMEM HG (4,5g/l Glukose)	
FKS	10%
IBMX	0,1mg/ml
Indomethacin	200µM
Dexamethason	10 <sup>-6</sup> M
Insulin	10µg/ml
P/S	1%

**Tabelle 2: Medienzusammensetzung für die Differenzierung in Adipozyten**

Zum Nachweis der Differenzierung wurde die Oil Red O Färbung durchgeführt. Oil Red O ist ein Farbstoff, der im Lipidanteil von Geweben abgelagert wird. In der Vitalfärbung mit Oil Red O erscheinen neutrale Fette rot. Somit lassen sich eine zunehmende Anzahl, wie auch die Vergrößerung der im Zytoplasma eingelagerten Fettröpfchen über die Kulturdauer erkennen.

Die Färbung wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Medium absaugen und Zellen je 1x für 5min in kaltem PBS und anschließend 10% Formalin waschen
- In 10% Formalin für 60min bei RT inkubieren
- Formalin abnehmen, 60% Isopropanol (in Aqua dest.) zugeben, nach kurzem Schwenken wieder abnehmen und warten bis es vollständig verdampft ist
- Mit Oil Red O Lösung (2,1g/ml in Aqua dest.) für 2h bei RT inkubieren
- Nach dreimaligem Waschen mit Aqua dest. im Lichtmikroskop nach rot gefärbten Fetttröpfchen suchen und fotografisch dokumentieren

### 3.6.5.2 Differenzierung in Sebozyten

Für die Differenzierung in Sebozyten wurden die Zellen für 12 Tage in ein Medium gegeben das von Roh et al. 2008 beschrieben worden war. Die anschließende Analyse erfolgte mit RT-PCR zum Nachweis von Calponin und Smooth Muscle Aktin. Da Sebozyten für den Transport fettlöslicher Antioxidantien an die Hautoberfläche und als UV Schutz Sebum produzieren (Zouboulis et al 2008), ist auch eine optische Beurteilung der Bildung von Fetttröpfchen möglich.

DMEM/F12 (1:1)	
FKS	6%
Insulin	10nM
Troglitazone	1µM
WY14643	100µM
Dihydroxytestosteron	10nM
P/S	1%

**Tabelle 3: Medienzusammensetzung für die Differenzierung in Sebozyten**

### 3.6.5.3 Differenzierung in Chondrozyten

Für die Differenzierung in Chondrozyten wurden die Zellen für 21 Tage mit dem Differenzierungsmedium kultiviert.

<b>α-MEM</b>	
FKS	1%
Insulin	6,25 µg/ml
Ascorbic acid	50nM
hTGFbeta1	10ng/ml
P/S	1%

**Tabelle 4: Medienzusammensetzung für die Differenzierung in Chondrozyten**

Der histologische Nachweis von sauren Proteoglykanen in Chondrozyten erfolgte mit der Alcianblau-Färbung.

- Medium absaugen und Zellen in 3,7% Formalin (in PBS) für 15min bei RT fixieren
- 3x mit PBS waschen
- Für 30min mit 1% Alcianblau (in 0,1M HCl) bei RT inkubieren
- In 0,1M HCl waschen
- Zugabe von PBS und Kontrolle am Mikroskop

### 3.6.5.4 Differenzierung in Osteoblasten

Für die Differenzierung in Osteoblasten wurden die Zellen für 21 Tage mit dem Differenzierungsmedium kultiviert.

<b>DMEM LG (1g/l Glukose)</b>	
FKS	10%
Dexamethason	10 <sup>-7</sup> M
Ascorbic acid	0,3mM
Betaglycerophosphat	10mM
P/S	1%

**Tabelle 5: Medienzusammensetzung für die Differenzierung in Osteoblasten**

Zum Nachweis der Differenzierung wurde die von-Kossa-Färbung durchgeführt. Mit dieser Methode können Kalziumablagerungen bzw. Kalziumsalze gefärbt werden. Dazu wird Silbernitrat verwendet, denn das Kalzium in den Zellen kann gegen Silberionen ausgetauscht werden. Diese Ionen werden durch Inkubation unter UV-Licht zu metallischem Silber reduziert und sind dann als schwarze oder braune Färbung zu erkennen.

Die Färbung wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Medium absaugen und Zellen 1x in kaltem PBS waschen
- In 10% Formalin für 25min bei RT inkubieren
- 3x mit destilliertem Wasser waschen, um sämtliche Salze zu entfernen, da sonst das Silbernitrat ausfällt
- 5% Silbernitrat (in Aqua dest.) zugeben und für 20min unter UV-Licht inkubieren
- 1x mit destilliertem Wasser waschen
- 1% Pyrogallol zugeben und für 5min bei RT inkubieren
- Pyrogallol absaugen, 5% Natriumthiosulfat zugeben und 5min bei RT inkubieren
- 3x mit destilliertem Wasser waschen

### **3.6.5.5 Differenzierung in Muskelzellen**

Für die Differenzierung in Muskelzellen wurden die Wells mit 0,1% Matrigel beschichtet. Das Medium wurde nach einem Protokoll von Yu et al. 2006 zusammengestellt und für 14 Tage auf die Zellen gegeben.

Als Nachweis für die Differenzierung erfolgte immunhistologisch mittels Desminfärbung und durch eine RT-PCR zum Nachweis von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin und Calponin durchgeführt.

Knockout DMEM/F12	
FKS	10%
Non ess amino acids	1%
TGF $\beta$ 1	10ng/ml
P/S	1%

**Tabelle 6: Medienzusammensetzung für die Differenzierung in Muskelzellen**

### 3.6.5.6 Differenzierung in Neuronen

Bei der Differenzierung zu Neuronen wurden die Wells vorher mit Lysin und Laminin doppelbeschichtet. Die Zellen wurden zuerst über Nacht auf Platten gegeben, auf denen sie nicht adhären können. Dies sollte zu einer Bildung von Zellclustern (Spheres) führen, was der „hanging drops“ Methode nachempfunden ist. Die Methode der zellulären Aggregation ist bei ESCs ein allgemein anerkanntes Konzept, das als Differenzierungsstimulus eingesetzt werden kann (Keller 1995). Am nächsten Tag kamen die Zellen für den Rest der Ansatzdauer auf die beschichteten 6-Well-Platten. Das Medium wurde der Arbeit von Hunt et al. 2008 entnommen und für 10-21 Tage auf die Zellen gegeben. Anschließend sind die Zellen mittels RT-PCR und Immunfluoreszenz untersucht worden.

DMEM HG/F12 (3:1)	
FKS	1%
bFGF	40ng/ml
NGF	10ng/ml
BDNF	10ng/ml
NT3	10ng/ml
RA	6ng/ml
P/S	1%

**Tabelle 7: Medienzusammensetzung für die Differenzierung in Neuronen**

## 3.7 Molekularbiologische Methoden

### 3.7.1 Isolierung der RNA aus den Zellen

Für die Charakterisierung der Zellen mittels RT-PCR wurde die RNA isoliert, sobald eine 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche konfluent mit Zellen bewachsen war. Die Extraktion erfolgte anfangs mit dem Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen), später wurde wegen der besseren Reinheit der RNA auf den NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel) umgestellt.

Nach Abnehmen des Mediums sind die Zellen für wenige Minuten mit 5ml einer 0,05%igen Trypsinlösung behandelt worden, um die Zell-Zell Kontakte und die Bindung an den Boden der Zellkulturflasche zu lösen.

Um das Trypsin zu inaktivieren, wurden die Zellen anschließend zu 3ml des abgenommenen Mediums gegeben. Nach Zentrifugation bei 850rpm für 8min wurden die Zellen einmal in 5ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet im Lysepuffer resuspendiert, wobei die Zellen lysiert und die Rnasen inaktiviert werden. Bei den Stimulationsexperimenten wurde, nachdem das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen wurden, der Lysepuffer direkt auf die Zellen gegeben. Die weiteren Schritte wurden gemäß den mitgelieferten Protokollen durchgeführt. Am Ende wurde die RNA (Gesamt-RNA) in Rnase-freiem Wasser eluiert.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) mit einem Photometer (Eppendorf) bestimmt. Die RNA wurde dazu 1:13 in Rnase-freiem Wasser verdünnt und die OD bei 260nm und bei 280nm nach Kalibrierung des Photometers mit Rnase-freiem Wasser gemessen.

Die Messung der OD bei 260nm erlaubt mittels des Lambert-Beer-Gesetzes ( $OD = \text{Konzentration} \times \text{Schichtdicke der Kuvette} \times \text{Extinktionsfaktor}$ ) die Berechnung der RNA-Konzentration nach der Formel:  $\text{RNA-Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnung}$ . Das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  (Nukleinsäuren/Protein) ermöglicht eine Beurteilung der Reinheit der isolierten RNA. Die Reinheit der verwendeten RNA lag immer im Optimalbereich zwischen 1,8 und 2,1.

### 3.7.2 Reverse Transkription der mRNA (cDNA Synthese)

Die Synthese einzelsträngiger cDNA, die als Template für die PCR verwendet werden kann, erfolgt durch reverse Transkription (RT) der isolierten RNA. Die RT ist eine enzymatisch katalysierte Reaktion unter Verwendung einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei die mRNA als Matrize für die Synthese des komplementären DNA-Stranges dient. Die cDNA-Synthese wird durch Bindung eines Primers an die mRNA initiiert. Für die cDNA-Synthese mit RNA wurde das Omniscript RT Kit (Qiagen) verwendet.

Da mit dem verwendeten Protokoll nur eine RNA-Menge im Bereich von 50ng bis 2µg umgeschrieben werden kann, legte die Konzentration der Ausgangs-RNA die eingesetzte Menge fest. War die Konzentration hoch wurde ein Ansatz mit 2µg hergestellt, war die Konzentration des Ausgangsmaterials gering, ist die maximal einsetzbare Menge verwendet worden.

Für die Reaktion wurde ein Master Mix mit insgesamt 20µl/Probe angesetzt:

---

10x RT Puffer	2,0µl
dNTP-Mix (je 5 mM)	2,0µl
Oligo-(dt)-Primer (10 µM)	2,0µl
Rnase Inhibitor (30 Units/µl)	0,33µl
Omniscript RT	1,0µl
Rnase-freies Wasser	variabel
Template-RNA	variabel

---

**Tabelle 8: Master Mix der Reversen Transkription**

Während des gesamten Vorgangs sind alle Reaktionsgefäße und Reagenzien auf Eis gehalten worden. Dieser Reaktionsansatz wurde im Thermocycler 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

### 3.7.3 Quantitative Real Time-PCR

Für die Stimulationsexperimente ist es wichtig die basalen (nicht stimulierten) Zellen mit den stimulierten vergleichen zu können. Um beurteilen zu können, ob die untersuchten Gene hoch- oder herunter reguliert wurden, wurde vor der RT-PCR eine quantitative Real Time PCR durchgeführt werden. Diese beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (s.u.), allerdings wird zusätzlich eine Fluoreszenzmessung durchgeführt und damit eine Quantifizierung ermöglicht.

Zu diesem Zweck wurde das Light Cycler System von Roche verwendet. Das LightCycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I Kit arbeitet mit dem Farbstoff Sybr Green I, der nur fluoresziert, wenn er an Doppelstrang DNA gebunden ist.

Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der cDNA zu und wird nach jedem Zyklus erfasst. Am Ende des Laufs wird die Quantifizierung anhand der exponentiellen Phase vorgenommen. Dazu wird eine Standardkurve herangezogen, die durch Proben mit definierter Kopienzahl erstellt wird.

Zum Nachweis der Spezifität wurde, im Rahmen der quantitativen PCR, immer auch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

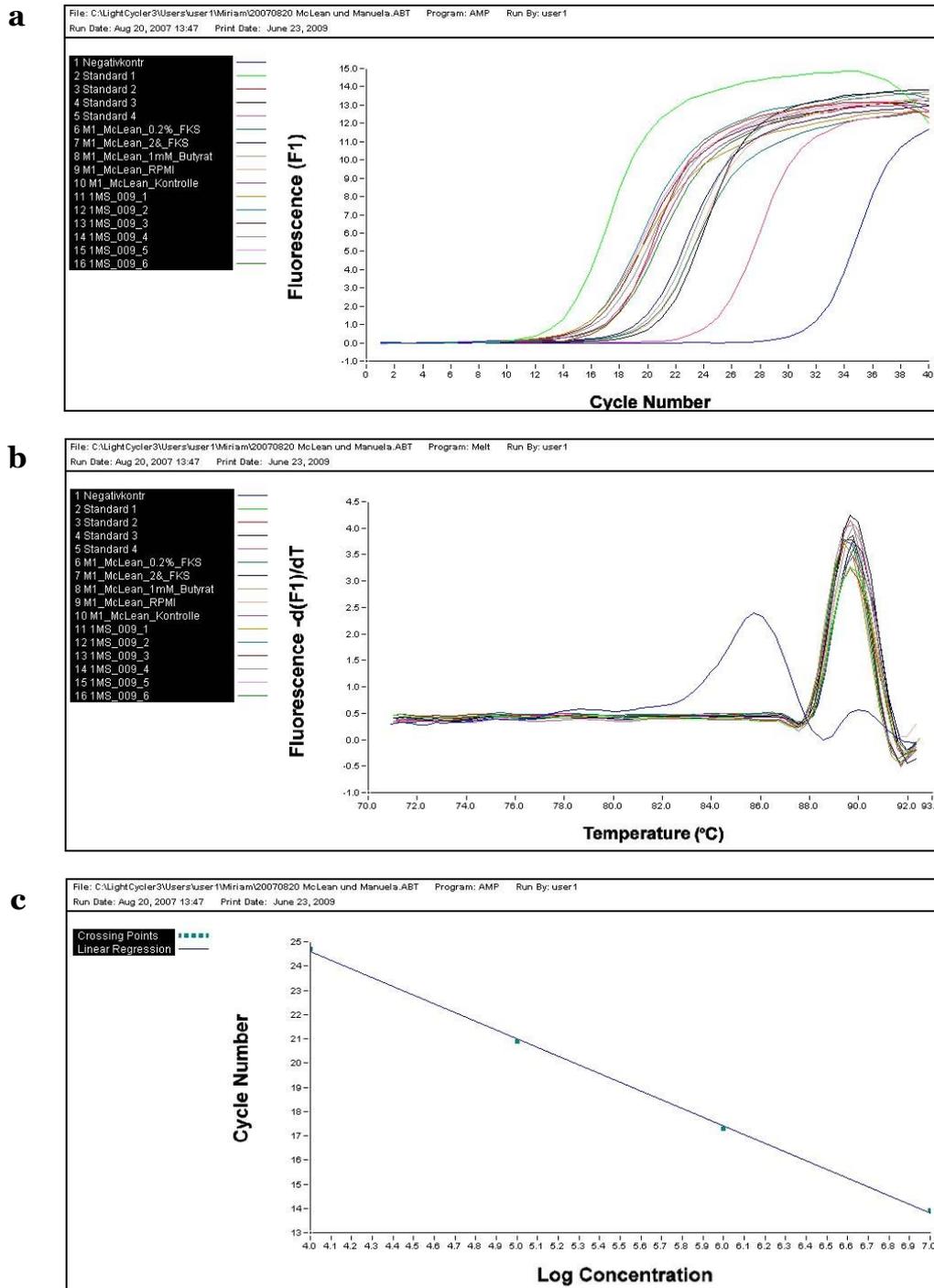


Abbildung 4: Typische Light Cycler PCR auf  $\beta$ -Aktin. (a) Zunahme der Kopienzahl mit den Zyklen, (b) Schmelzkurve (die abweichende blaue Kurve ist die der Negativkontrolle) und (c) Standardkurve eines Light Cycler Laufs

Da jedes PCR Produkt eine charakteristische Schmelztemperatur besitzt, die sowohl von seiner Länge, als auch von der Stärke der Bindung der Basenpaare abhängig ist, ist es möglich zwischen verschiedenen PCR Produkten zu unterscheiden und die Amplifikation falscher Produkte auszuschließen.

In dieser Arbeit wurde die Normierung der Proben mit dem House keeping Gen  $\beta$ -Aktin vorgenommen.

Wasser	7 $\mu$ l
Forward Primer Aktin	2 $\mu$ l
Reverse Primer Aktin	2 $\mu$ l
Sybr Green I	4 $\mu$ l

Wasser	3 $\mu$ l
Template-DNA	2 $\mu$ l

**Tabelle 9: Master Mix der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion für jede Probe**

Beim Pipettieren des Mastermixes und der Proben wurden die Kapillaren und Tubes stets gekühlt gehalten. Um einen Fluoreszenzverlust des Farbstoffes Sybr Green I zu verhindern, wurde nur in Räumen ohne künstliches Licht pipettiert. Wasser und Probe wurden immer zuerst in die Kapillaren pipettiert und dann der Mastermix erstellt. Davon wurden dann je 15 $\mu$ l in alle Kapillaren gegeben. Die erste Kapillare diente als Negativkontrolle und enthielt nur Mastermix und 5 $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Die Herstellung der Standards erfolgte über eine absteigende Verdünnungsreihe aus einem Standard mit 10<sup>8</sup> Kopien. Die Kapillaren 2-5 enthielten 5 $\mu$ l der so entstandenen vier Standards mit 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup> und 10<sup>4</sup> Kopien  $\beta$ -Aktin. Vor der Positionierung der Kapillaren im Light Cycler wurden die Kapillaren mit den dafür vorgesehenen Deckeln verschlossen und für 5 Sekunden bei 3000 rpm zentrifugiert.

Das Temperaturprofil für die Quantifizierung gestaltete sich wie folgt:

- 1) Initiale Denaturierung der DNA: 2min bei 95°C
- 2) Denaturierung der DNA: 10s bei 95°C
- 3) Annealing der Primer: 2s 68°C
- 4) Extension: 25s 72°C
- 5) Schmelzkurve: 5min auf 100°C erhitzen
- 6) Kühlen: 30s 40°C

Die Schritte 2-4 wurden vor Schritt 5 und 6 in 40 Zyklen wiederholt.

### 3.7.4 Reverse-Transkription Polymerase-Kettenreaktion

Die RT-PCR stellt eine *in vitro* Methode für die enzymkatalysierte Synthese definierter DNA-Abschnitte dar. In mehreren Amplifizierungsrunden, die aus Denaturierung der Matrizen-DNA, Anlagerung der spezifischen Primer (Annealing) und Verlängerung der Primer entlang der Matrizen-DNA durch eine hitzestabile Taq-DNA-Polymerase (Elongation) bestehen, erfolgt eine Anreicherung spezifischer, definierter DNA-Fragmente (Mullis und Faloona 1987).

Für die PCR wurde anfangs das HotStarTaq Plus Kit (Qiagen) und später, aufgrund besserer Ergebnisse, nur noch das GoTaq® Flexi DNA Polymerase Kit (Promega) verwendet. Dabei wurde für jede PCR ein Master Mix mit insgesamt 25µl/Probe hergestellt (er enthält alle Komponenten außer der Template-cDNA):

5x Green GoTaq® Flexi Buffer	5µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1/1,5/2/2,5/3µl (primerspezifisch)
dNTP-Mix (je 10mM)	0,5µl
5'-Primer (50pM)	0,25µl
3'-Primer (50pM)	0,25µl
GoTaq® DNA Polymerase (5u/µl)	0,125µl
Nuklease freies Wasser	variabel

**Tabelle 10: Master Mix der Polymerase-Kettenreaktion (Promega)**

Die zugegebene Menge an  $MgCl_2$  richtete sich nach den verwendeten Primern. Für jede Probe wurde zusätzlich eine Negativkontrolle hergestellt.

Das Template der Negativkontrolle ist bei der Reversen Transkription ohne Enzym (RT) hergestellt worden, sollte also keine cDNA enthalten.

Die Menge an Template richtete sich nach dem vorher im Light Cycler ermittelten  $\beta$ -Aktiningehalt, so dass sich die Banden des Gels später besser vergleichen ließen. Die variable Zugabe von Wasser ergab am Ende ein Reaktionsvolumen von 25  $\mu$ l zuzüglich der cDNA für jede Probe.

Die cDNA wurde im Thermocycler nach folgendem Temperaturprofil amplifiziert:

- 1) Aktivierung der DNA Polymerase: 2min bei 95°C
- 2) Denaturierung der DNA: 30s bei 95°C
- 3) Annealing der Primer: 30s 50-68°C (primerspezifisch)
- 4) Extension: 1min 72°C
- 5) Abschließende Extension: 5min 72°C

Die Schritte 2-4 wurden zyklisch wiederholt: 24 Wiederholungen bei  $\beta$ -Aktin und 35 bei den restlichen Primern (Primersequenzen und Annealing-Temperaturen sowie Zyklenzahl der RT-PCR: siehe Anhang 7.4).

Die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch auf einem 2%igen Agarosegel, versetzt mit 1  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid, aufgetrennt. Je 20  $\mu$ l der PCR-Probe wurden auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung der Fragmentlänge der amplifizierten DNA wurde außerdem ein Molekulargewichtsmarker (100bp DNA Ladder, Promega) auf dem Gel mitgeführt. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt (constant voltage) für 30min in einem Gelsystem von MWG Biotech. Die durch Fluoreszenz unter UV-Licht detektierten Banden der amplifizierten DNA wurden mit einem Geldokumentations-System (Intas) photographisch dokumentiert.

## **3.8 Immunologische Methoden**

### **3.8.1 FACS-Analyse (Durchflusszytometrie)**

FACS steht für “fluorescence activated cell sorting” und beschreibt eine Methode, mit der die Zellmorphologie und die Proteinexpression von Zellen untersucht werden kann. Im Gerät befindet sich ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit, in die die Zellen in Form einer Zellsuspension eingebracht werden. Durch die höhere Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit werden die Zellen einzeln am Laserlicht vorbeigeführt. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle wird das Licht in verschiedene Richtungen gestreut. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) sagt etwas über die Größe der Zelle aus (kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal) und das Seitwärtsstreulicht (SSC) beschreibt die Granularität. Die Ergebnisse der Streulichtmessungen werden in einem „Dot-Plot“ Diagramm dargestellt, auf dessen X-Achse das FSC und Y-Achse das SSC aufgetragen ist.

Antigene auf der Oberfläche (oder innerhalb) der Zellen können mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (AK) nachgewiesen werden. Das Laserlicht bewirkt eine Excitation der Fluoreszenzfarbstoffe, die wiederum Fluoreszenzlicht emittieren. Die emittierten Fluoreszenzen können durch verschiedene Photozellen detektiert werden. Pro Zelle können mehrere verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig gemessen werden. In dieser Arbeit wurden nur die Farbstoffe FITC und PE verwendet.

Die Färbung wurde folgendermaßen durchgeführt:

- 1µl des jeweiligen Antikörpers wurde in 100µl einer PBS-Lösung (mit 1% FKS) verdünnt (Ausnahme: BCRP1, hier wurden 10µl des AK zu 90µl gegeben)
- Die von der Zellkulturflasche abgenommenen Zellen wurden gezählt und das Pellet anschließend in einer PBS-Lösung (mit 1% FKS) aufgenommen, die Menge an PBS wurde so gewählt, dass die Zahl der Zellen in 100µl zwischen 200.000 und 500.000 lag
- Um unspezifische F<sub>c</sub> Bindungsstellen zu blockieren, wurde vor der Färbung für 10min eine 1%ige Lösung F<sub>c</sub>-Block (CD16/CD32) im Verhältnis 1:1 zu den Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte im Kühlschrank
- Zu je 200µl der Zelllösung wurden 100µl des jeweiligen AK bzw. des Isotyps gegeben und für 30min im Kühlschrank inkubiert
- Anschließend wurden die Proben für 5min bei 1500rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen
- Bei der Verwendung von sekundären AKs wurden 100µl der AK-Lösung (sekundärer AK) zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für 30min bei 4°C. Anschließend wurde wieder bei 1500rpm für 5min zentrifugiert und der Überstand abgenommen
- Das Pellet wurde in 250µl PBS-Lösung (mit 1% FKS) aufgenommen
- Zu der Suspension der gefärbten Zellen wurden 250µl Formalin (4%) gegeben und es folgte eine Inkubation für 20min bei Raumtemperatur in Dunkelheit
- Das Formalin wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS-Lösung (mit 1% FKS) entfernt
- Am Ende wurde das Pellet in 250µl PBS-Lösung (mit 1% FKS) aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt

Da einige Moleküle (wie z.B. CD9, CD34, CD73, CD133, CD200 und BCRP1) eine Trypsinschnittstelle besitzen, wurden die Zellen für die FACS Färbung nicht mit Trypsin/EDTA sondern mit Versene von der Zellkulturflasche genommen.

Die FACS-Analyse erfolgte mit dem FACS Calibur Gerät der Firma BDBiosciences (Heidelberg). Die erfassten Rohdaten wurden per Computer mit der Software WinMDI Version 2.9 ausgewertet.

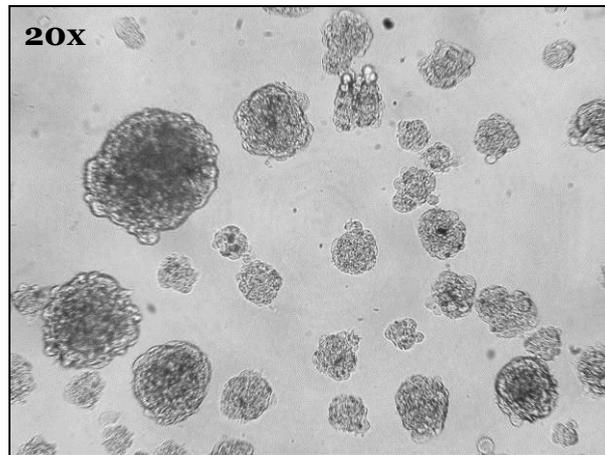
### **3.8.2 Immunhistologische Färbungen an Gefrierschnitten und mit kultivierten Zellen**

Eine Beurteilung der Genexpression auf Proteinebene ist durch immunhistologische Färbungen möglich. Die Bilder, auf denen mehrere Farben gleichzeitig zu sehen sind wurden aus einem Overlay der einzelnen Bilder mit der Software Leica Application Suite erstellt.

#### **3.8.2.1 Gefrierschnitte**

Die basalen (unstimulierten) Zellen wurden einen Tag auf ultra low attachment Well-Platten gegeben, damit sie Spheroide bilden können (Abbildung 5). Anschließend wurde das Medium durch Zentrifugation abgenommen. Die weiteren Schritte verliefen wie folgt:

- Fixierung in 4% Paraformaldehyd über Nacht
- 4h Inkubation in 10% Sucrose
- 4h Inkubation in 20% Sucrose
- Einbetten in Tissue Embedding Medium und schockgefrieren in flüssigem Stickstoff
- Lagerung bei -80°C bis zum Schneiden
- Mit dem Mikrotom anfertigen von Schnitten mit 6-10µm Dicke



**Abbildung 5: Spheroide der Typ 1 Zellen, nach einem Tag Kultur auf ultra low attachment Platten**

### **3.8.2.2 Immunhistologische Färbungen**

Mit der Immunhistologie erfolgt der Nachweis von Proteinen (Antigenen). Hierfür setzt man Antikörper ein, die spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichtet sind und dadurch an dessen Struktur haften. Bei der sogenannten indirekten Methode erfolgt der Nachweis mit einem zweiten AK, dem Sekundärantikörper. Dieser bindet an den ersten und ist selbst mit einem Marker versehen. In dieser Arbeit wurde entweder Biotin oder ein fluoreszierender Farbstoff verwendet. Bei der Färbung mit einem fluoreszenzmarkierten AK ist die Färbung nach diesem Schritt beendet und das Präparat kann unter dem Mikroskop beurteilt werden.

Bei Verwendung eines Biotin gekoppelten Zweitantikörpers (ABC-Methode) folgte als weiterer Schritt eine Inkubation mit dem so genannten Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC). Aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin erfolgt eine starke Bindung. Der Nachweis wird dadurch geführt, dass ein Substrat der Peroxidase auf den Schnitt/die Zellen gebracht wird und sich hierdurch die mit Antikörper markierten Zellstrukturen anfärben. Für die Immunhistologie wurden entweder Gefrierschnitte oder mit Zellen bewachsene Culture Slides verwendet. Das Protokoll für die Färbung gestaltet sich folgendermaßen:

<b>Fluoreszenz</b>	<b>ABC Methode</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fixierte Schnitte auftauen und trocknen</li> <li>• Culture Slides: Zellüberstand abnehmen und Zellen 15 Minuten im Kühlschrank mit 4% Formaldehyd (in PBS) fixieren. Fixierte Zellen mit 1% Saponin für 10min permeabilisieren</li> <li>• 3x in PBS (0,1% Tween) waschen</li> <li>• 3% Ziegen Serum (in PBS) für 30min bei RT auf die Schnitte/Zellen geben</li> <li>• 1.AK in PBS mit 3% Serum für 2h oder über Nacht auf die Schnitte/Zellen geben</li> <li>• 3x in PBS (0,1% Tween) waschen</li> <li>• 2.AK in PBS mit 3% Serum für 1h bei RT im dunkeln auf die Schnitte/Zellen</li> <li>• 3x in PBS (0,1% Tween) waschen</li> <li>• In Vectashield Mounting Medium mit DAPI eindeckeln</li> <li>• kalt und dunkel lagern</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3x in PBS (0,1% Tween) waschen</li> <li>• 5min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubieren</li> <li>• 3x in PBS (0,1% Tween) waschen</li> <li>• 1 Tropfen horse blocking serum in PBS für 20min auf die Schnitte/Zellen geben</li> <li>• 3x in PBS (0,1% Tween) waschen</li> <li>• 1.AK in AB-Diluent verdünnen und für 2h auf Schnitte /Zellen geben</li> <li>• 3x in PBS (0,1% Tween) waschen</li> <li>• biotinylierter AK für 10min auf Schnitte/Zellen geben</li> <li>• 3x in PBS (0,1% Tween) waschen</li> <li>• ABC-Reagenz für 5min auf Schnitte/Zellen geben (Reagenz A und Reagenz B)</li> <li>• 3x in PBS (0,1% Tween) waschen</li> <li>• NovaRed nach Anleitung zusammensetzen und für 5-15min auf Gewebe/Zellen geben</li> <li>• In H<sub>2</sub>O waschen</li> <li>• In Gelatine eindeckeln</li> </ul>

**Tabelle 11: Ablauf der immunhistologischen Färbung mit der Fluoreszenzmethode (links) oder der ABC Methode (rechts)**

### 3.9 Analyse des Genexpressionsprofils mit dem Illumina Beadarray

Die Array Analyse wurde in wissenschaftlicher Kooperation mit dem Helmholtz Zentrum München (Dr. Martin Irmeler) durchgeführt. Ziel der Analyse war es, das globale Genexpressionsprofil der isolierten Stammzellen zu untersuchen und gleichzeitig Informationen zum veränderten Genexpressionsprofil unter Differenzierungsbedingungen zu gewinnen.

#### 3.9.1 Kulturbedingungen der analysierten Typ 1 Zellen

Für die Array Analyse wurden frühe Passagen (10 und 12) der HFSCs verwendet. Es wurden drei verschiedene Kulturbedingungen verglichen.

1. Zellen, die ohne weitere Faktoren in HG Medium kultiviert wurden (21d Wachstum)
2. Zellen, die nach der Isolation immer in Medium mit B27 und bFGF gezüchtet wurden (4 Tage Wachstum)
3. Zellen, die nach 4 Tagen Wachstum für 7 Tage mit 10mM Nicotinamid und für weitere 7 Tage mit 10nM Exendin 4 stimuliert wurden (18 Tage Wachstum)

Für alle drei Kulturbedingungen wurden je zwei Replikate analysiert, die unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden.

No	Probe	Art	Zustand	RNA $\mu\text{g}$	RIN
1	M1p10 HG.1	Haarfollikelstammzellen	undifferenziert	1	9,4
2	M1p10 HG.2	Haarfollikelstammzellen	undifferenziert	1	8,9
3	M1p12 B27.1	Haarfollikelstammzellen	differenzierte Langzeitkultur	1,5	7,8
4	M1p12 B27.2	Haarfollikelstammzellen	differenzierte Langzeitkultur	1,5	9,5
5	M1p10 NE.1	Haarfollikelstammzellen	gezielte Stimulation	0,5	9,3
6	M1p10 NE.2	Haarfollikelstammzellen	gezielte Stimulation	0,5	nd

**Tabelle 12: Proben der Haarfollikelstammzellen für die Gen-Array Analyse**

Für eine erweiterte Analyse wurden die HFSC Zellen mit mJ Zellen, einer murinen Zelllinie, die aus einem Pankreasgang isoliert worden ist, verglichen. Auch von diesen Zellen wurden zur Kontrolle drei Replikate analysiert.

No	Probe	Art	Zustand	RNA $\mu\text{g}$	RIN
1	mJp51.1	Pankreasprogenitorzellen	undifferenziert	1,5	9
2	mJp52.1	Pankreasprogenitorzellen	undifferenziert	1,5	8,8
3	mJp52.2	Pankreasprogenitorzellen	undifferenziert	1,5	8,9

**Tabelle 13: Vergleichszellen mJ für die Gen-Array Analyse**

### 3.9.2 Illumina Beadarray

Die Arraytechnik basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren. Dabei lagern sich zwei komplementäre Nukleinsäure-Einzelstränge zusammen. Microarraychips bestehen aus einem Trägermaterial, auf das biologische Sondenmoleküle aufgebracht sind. In dieser Arbeit wurde ein Illumina MouseWG-6 v2.0 Array mit 45.281 -50mer langen- Sonden verwendet.

Die RNA wurde nach der Isolation (s.o.) mit dem Agilent Bioanalyser auf ihre Qualität untersucht und nur die RNA mit hoher Qualität: RIN (RNA integrity number) >8 für die Array Analyse verwendet. Mit der konzentrationsunabhängigen RIN Zahl wird die Integrität nicht über das Verhältnis der ribosomalen Banden bestimmt, sondern über die ganze elektrophoretische Spur der RNA Probe, wobei auch die An- oder Abwesenheit von Abbauprodukten Beachtung findet.

150ng der jeweiligen Gesamt-RNA wurde mit dem Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion) amplifiziert. Hiervon wurde 1,5 $\mu\text{g}$  auf dem Arraychip hybridisiert. Die Färbung und das Scanning wurde dem Illumina Protokoll entsprechend durchgeführt.

### **3.9.3 Statistische Analyse**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 3.0. Es wurde der ungepaarte t-Test nach Student durchgeführt. Unterschiede mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) von  $< 0,05$  wurden als signifikant gewertet.

Die statistische Analyse der Array-Daten wurde von Herrn Dr. Martin Irmeler durchgeführt. Für die Korrektur des unspezifischen Hintergrunds wurde die Illumina Beadstudio Software 3.0.19.0 verwendet und die restlichen negativen Expressionswerte über einen Offset (17) korrigiert. Über CARMAweb (Rainer et al. 2006) wurde das Bioconductor Softwarepaket für die Normalisierung mit dem Quantilenverfahren verwendet. Für die statistische Analyse kam der moderated Limma Test und die Benjamini-Hochberg Korrektur für multiples Testen zur Anwendung. Probesets mit einer "False Discovery Rate" (FDR)  $< 10\%$  wurden als signifikant betrachtet. Für die Darstellung in Form von Heatmaps wurde ebenfalls CARMAweb verwendet.

### **3.9.4 Gen Ontologie**

Nach dem Scannen des Chips und der statistischen Analyse bleibt eine enorm große Menge an Daten, die es auszuwerten gilt. Hierfür wurde das Bibliosphere Genomatix Software Tool und das PANTHER Classification System (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) verwendet. Mit diesen Programmen sind Aussagen zu biologischen Prozessen, molekularen Funktionen, zellulären Komponenten und Signalwegen möglich.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Isolation und Expansion der Stammzellen

Von mehreren Arbeitsgruppen sind bereits Methoden publiziert worden, um Stammzellen aus dem Haarfollikel der Maus oder des Menschen zu isolieren. Die meisten Protokolle haben primär einen Verdau mit Dispase und/oder Trypsin eingesetzt. Da in den vorangehenden Publikationen entweder keine, oder stark variierende Zeit- und Konzentrationsangaben vorlagen, musste zunächst die optimale Zeitdauer ermittelt werden. Ebenfalls sehr unterschiedlich sind die publizierten Medien für die Kultivierung der Haarfollikelstammzellen. Hier mussten deshalb ebenfalls Experimente zur Etablierung der besten Kulturbedingungen durchgeführt werden.

Für die primäre Gewinnung der Haarfollikel wurde das entnommene Fell bzw. der entnommene Teil der Schnauze (Barthaare) für einen Zeitraum von minimal 5 und maximal 28 Stunden in einer Dispaselösung verdaut. Die beste Zellausbeute ergab sich bei einer Zeit zwischen 22 und 28 Stunden. Nach dem Dispaseverdau wurden die Haare mit einer Pinzette aus dem Fell gezupft und anschließend für 2, 4, oder 8min mit Trypsin behandelt.



**Abbildung 6: Gezupftes Fellhaar, wenige Tage nach Dispaseverdau in Medium mit B27**

Anschließend wurde jeweils für die gleiche Zeit mit Versenelösung inkubiert, um die Zellen der Wurzelscheiden vom Haarschaft zu lösen. Für die untersuchten Zeiten konnte kein Unterschied in der Zellausbeute beobachtet werden. Um die Zellen nicht unnötig zu belasten, wurde im weiteren Verlauf eine Dauer von je 4min festgelegt. Zum Vergleich sind auch alternative Isolationsversuche durchgeführt worden.

Bei zehn Versuchen sind Haare gezupft und mit Trypsin behandelt worden, ohne sie vorher in Dispase zu verdauen. Bei drei weiteren Versuchen sind die Haare gezupft, von Hand gekürzt und ohne jegliche Verwendung von Enzymen direkt auf die Platten gegeben worden. Diese Arten der Isolation ergaben immer eine geringe Zellausbeute und wurden daher nicht mehr durchgeführt.

Bei vier Versuchen wurde nur der Dispaseverdau durchgeführt, die Haare gezupft und ohne Verwendung von Trypsin auf die Platten gegeben. Mit dieser Methode wurden auch die Zellen isoliert, die in dieser Arbeit am umfassendsten untersucht worden sind (Bezeichnung M1 Zellen). Es dauerte bis zu acht Wochen, bis die Zellen von einer 24-Well-Platte auf eine kleine Flasche umgesetzt werden konnten. Weitere drei Wochen vergingen, bis die Zellzahl ausreichte, um sie von einer kleinen Flasche auf eine große umzusetzen zu können.

Bei der Verwendung von Trypsin zusammen mit Dispase war dieser Zeitraum wesentlich kürzer und stellt deshalb die effektivere Form der Isolation dar.

In einem weiteren Versuch wurden Barthaarfollikel mit dem Skalpell aus der Schnauze isoliert, für 20min in Dispase verdaut, 2x mit PBS gewaschen und in Medium gegeben. Innerhalb von 19 Tagen sind so viele Zellen vom Follikel ausgewachsen, dass sie auf eine große Flasche gesetzt werden konnten. Diese Zellen besaßen allerdings eine geringere Plastizität, sie konnten in keinen anderen Zelltyp differenzieren und wurden somit nicht weiter untersucht. Insgesamt wurden in 30 Ansätzen Primärkulturen gewonnen.

Um die optimalen Zellkulturbedingungen zu etablieren, wurden sowohl in der Literatur vorbeschriebene Medien wie auch neue, selbst adaptierte Medien ausgetestet. Die nach der Isolierung erhaltenen Zellen wurden auf 24-Well-Platten ausgesät und in den in Tabelle 15 aufgeführten Medien kultiviert. Danach wurde das Zellwachstum zweimal pro Woche unter dem Stereomikroskop beurteilt.

1. **ITS-Medium** (modifiziert aus Zhang et al. 2006)

Medium	90%
FKS	10%
ITS (100x)	1x
EGF	10ng/ml
Insulin	5µg/ml
P/S	1%

2. **Hydrocortison-Medium** (modifiziert aus Zhang et al. 2006)

Medium	90%
FKS	10%
Hydrocortison	0,5 - 2ml/L
EGF	10ng/ml
Insulin	5µg/ml
P/S	1%

3. **B27-Medium** (modifiziert aus Amoh et al. 2005)

Medium	90%
FKS	10%
FGF	20ng/ml
B27 (50x)	2,5x
P/S	1%

4. **hESC-Medium** (modifiziert aus Yu et al. 2006)

Medium	80%
k.o. serum replacer	20%
β-Mercaptoethanol	0,1mmol/L
EGF	10ng/ml
MEM: Non ess. AS (100x)	1x
FGF	4ng/ml
P/S	1%

5. **F12-Medium**, (aus Fernandes et al. 2004)

Medium	90%
FKS	10%
EGF	20ng/ml
FGF	40ng/ml
P/S	1%

6. **EpiLife HCGS**

EpiLife	99%
HCGS	10µl/ml
P/S	1%

7. **EpiLife EDGS**

EpiLife	99%
EDGS	10µl/ml
P/S	1%

**8. DMEM-Knock-out-Medium**

DMEM knock-out	80%
k.o. Serum Replacer	20%
B27 (50x)	2,5x
ITS (100x)	1x
EGF	10ng/ml
FGF	10ng/ml
P/S	1%

**9. HepatoZYME-Medium**

HepatoZYME	100%
L-Glutamin	1%
EGF	10ng/ml
ITS (100x)	1x
Hydrocortison	0,5 - 2ml/L
P/S	1%

**10. START V-Medium**

START V	100%
P/S	1%

**11. eNCSC-Medium (aus Hu et al. 2006)**

$\alpha$ -modified MEM	75%
PBS	10%
FKS	10%
Tag 11 Chick Embryo Extract	5%
P/S	1%

**Tabelle 14: Zusammensetzung der Zellkulturmedien**

Ein Grundmedium, das sehr häufig für die Kultur von HFSC beschrieben ist, ist „Nutrient Mixture F12“. Die Medien 1-5 wurden daher in drei verschiedenen Varianten getestet. Einmal mit DMEM (4500mg/L Glukose), einmal mit Advanced DMEM/F12 (1:1) und einmal in einer 2:1 Mischung dieser beiden Medien. Mit der letzteren Variante (Advanced DMEM/F12 3:1) wurde ein besonders gutes Zellwachstum beobachtet, so dass dieses als Grundmedium gewählt wurde. Die Kultur in Iscove's Modified DM (nur mit Medium 5 für 5 Wochen) hat keinen Erfolg erbracht. Das Medium 6 hat zwar eine Primärkultur der Zellen ermöglicht, da die Zellausbeute aber etwas geringer ausfiel, wurden die Kulturen eingestellt.

Die Medien 7-12 ergaben teilweise ein geringes, teilweise kein Zellwachstum, so dass die Kultur damit nach 3 bis 6 Wochen wieder eingestellt wurde.

Die primär verwendeten Medien waren somit die Medien 1-5. Nach weiteren Versuchen stellte sich heraus, dass mit allen fünf Medien die gleichen Zelltypen angezchtet werden können. In den Medien 1, 2 und 4 war das Zellwachstum im Vergleich zu Medium 3 und 5 etwas schlechter, so dass auch diese drei Medien nicht weiter verwendet worden sind. Ein weiterer Versuch bestand darin die Medien 1-5 mit dem Überstand aus einer Kultur von 3T3-Fibroblasten (20%) zu supplementieren. Auch diese Variation führte zu keinem verbesserten Zellwachstum. Außer der Variation von unterschiedlichen Medien wurden auch verschiedene Beschichtungen der Zellkulturplatten bzw. Zellkulturflaschen überprüft. Für die Beschichtung mit 3T3 Fibroblasten, Poly-L-Arginin, Fibronectin und Kollagen konnte sehr schnell die Aussage getroffen werden, dass das Zellwachstum deutlich schlechter war, als ohne Vorbeschichtung. Bei der Beschichtung mit Gelatine und Poly-L-Lysin war ein schönes Zellwachstum zu beobachten. Da daraus aber kein besseres Wachstum der Zellen hervorging, war der Material- und Zeitaufwand nicht gerechtfertigt.

Aufgrund dieser Befunde wurden die Haarfollikelzellen in Advanced DMEM/F12 3:1 mit 10% FKS, B27 Supplement, FGF (20 ng/ml) und Penicillin/Streptomycin kultiviert und expandiert.

## 4.2 Charakterisierung der Zellen

### 4.2.1 Verdopplungszeit

Um zu untersuchen, wie lange die Haarfollikelzellen kultiviert werden können, ohne dass sie sich merklich verändern wurden sie bis zu Passage 113 untersucht. Die Zellen verdoppeln sich innerhalb von 24h (von  $2 \times 10^4$  auf  $4 \times 10^4$ ). Dies passt zu den Beobachtungen bei koloniebildenden Rattenkeratinozyten der Wulstregion (Kobayashi et al. 1993). Etwa ab Passage 90 begannen die Zellen deutlich schneller und auch dreidimensional zu wachsen. Dies ist in der Wachstumskurve in Abb. 7 dargestellt.

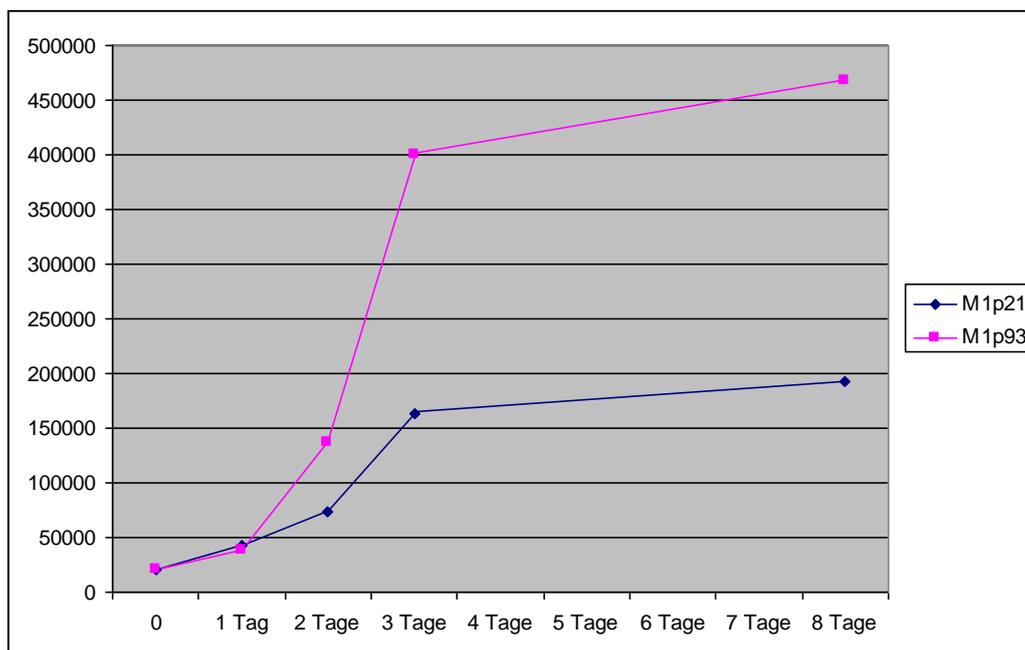
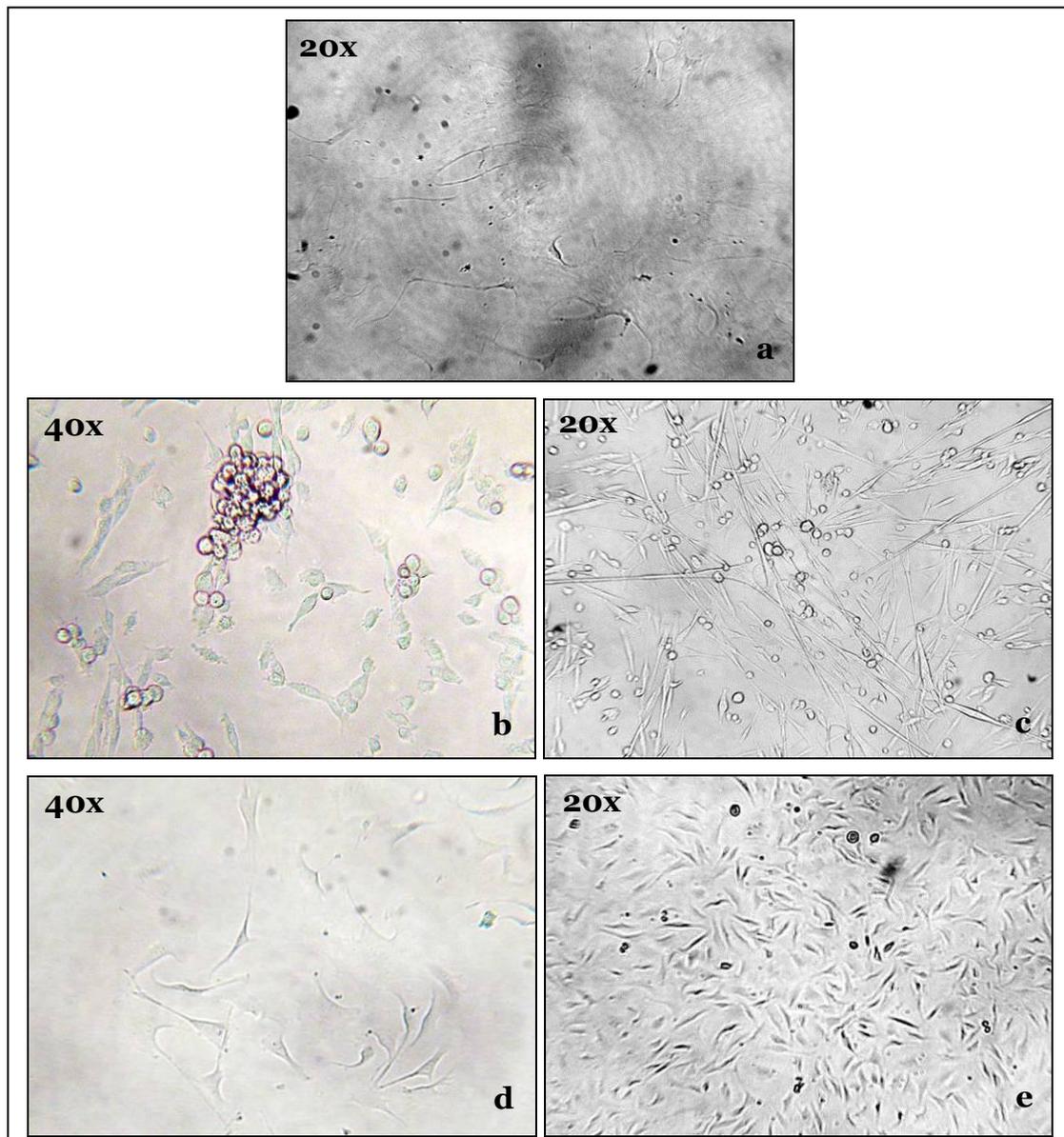


Abbildung 7: Vergleich der Wachstumskurven von Passage 21 und Passage 93 der Zelllinie M1

### 4.2.2 Zellmorphologie

In der Primärkultur der aus den Haarfollikeln auswachsenden Zellen wurden drei verschiedene Zelltypen beobachtet (siehe Abb. 8).



**Abbildung 8: Zelltypen mit verschiedener Morphologie in der Primärkultur.**

**(a) Typ 1 Morphologie der M1 Population mit großen, sehr flachen Zellen. (b-c) Typ 2 Morphologie mit kugeligen und später spindelförmigen Zellen. (d-e) Typ 3 Morphologie kleiner Zellen mit multiplen Zellfortsätzen**

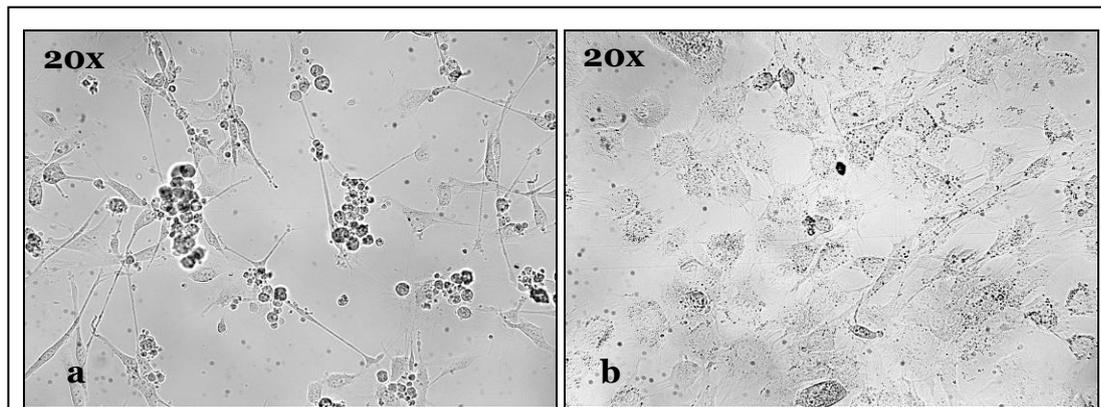
1. Die als Typ 1 bezeichneten Zellen sind große Zellen, die unabhängig voneinander aus Follikeln von C57BL/6 und Balb/c Mäusen isoliert und sehr gut expandiert werden konnten. Für die weitere Zellcharakterisierung wurde eine typische Zelllinie (Bezeichnung M1) ausgewählt. Die M1 Zellen wurden aus dem Haarfollikel einer Balb/c Maus entnommen und mit dem Medium 3 (DMEM/F12 3:1) kultiviert.
2. Die Typ 2 Zellen wuchsen zunächst in Suspension mit runder Zellform, hafteten sich aber nach der Subkultivierung am Boden der Zellkulturplatte an und wuchsen im Weiteren als spindelförmige Zellen mit langen Ausläufern. Auch diese Zellen konnten aus beiden Mäusestämmen isoliert werden.
3. Die Typ 3 Zellen sind deutlich kleiner als die Typ 1 und Typ 2 Zellen und zeigen häufig mehrere Ausläufer

#### **4.2.3 Zellverhalten in Kultur**

Die eben dargestellten Zelltypen traten in fast allen Primärkulturen gemeinsam auf. Nach einer Zeit, von wenigen Passagen wurden die Kulturen jedoch immer homogener, was verschiedene Gründe haben kann. Zum einen kann es sein, dass vordifferenzierte Zellen mit der Zeit absterben und nur teilungsfähige Progenitorzellen in der Langzeitkultur überleben. Zum anderen kann es sein, dass ursprünglich verschiedene Stammzelltypen vertreten waren, aber durch die Mediumzusammensetzung nur ein bestimmter Zelltyp überleben konnte. Es ist wahrscheinlich, dass beide Hypothesen zutreffen.

Nach der Isolierung in DMEM/F12 3:1 (Mediumzusammensetzung 3) wurde ein Versuch unternommen auszutesten, ob die isolierte Zelllinie M1 auch in normalem DMEM high Glucose Medium mit 5% FKS überleben kann (im Folgenden als M1 HG bezeichnet). Es zeigte sich, dass die M1 Zellen auch in diesem Medium sehr gut subkultiviert werden können.

Daraufhin wurden die M1 Zellen sowohl in dem ursprünglichen Medium DMEM/F12 3:1 (Mediumzusammensetzung 3) (im Folgenden als M1 B27 bezeichnet) als auch in DMEM high Glucose Medium mit 5% FKS kultiviert (M1 HG). Die Morphologie der Zellen in Abhängigkeit von der Mediumzusammensetzung ist in Abb. 9 dargestellt.



**Abbildung 9: (a) M1 Langzeitkultur in B27 Medium. (b) M1 Langzeitkultur in HG Medium**

#### **4.2.4 Analyse der Gen- und Proteinexpression durch RT-PCR und FACS**

Für die genauere Zellanalyse wurden charakteristische Marker für Stammzellen/Progenitorzellen und weitere Marker, die typisch für bestimmte Gewebe/Zelltypen sind auf RNA- (RT-PCR) und Proteinebene (FACS-Analyse) untersucht. In den folgenden Ergebnissen ist in der PCR immer eine Positivkontrolle zusammen mit der Zelllinie aufgetragen, wobei jede Probe mit (+) und ohne (-) Reverse Transkription (RT) untersucht wurde. Auf diese Weise kann eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden.

Stellvertretend für alle isolierten Zellen werden im Folgenden die PCR-Bilder nur von der M1 Zelllinie dargestellt und eventuelle Unterschiede in der Expression werden im Text ausgeführt. Bei den Zellen der M1 Population handelt es sich um frühe Passagen, die in DMEM/F12 3:1 (Mediumzusammensetzung 3) gehalten wurden.

In der FACS-Analyse wurde neben dem spezifischen Antikörper (Fläche unter der Kurve ist rot) immer ein Isotypantikörper (Fläche unter der Kurve farblos) als Negativkontrolle mit untersucht. Wenn nur eine rot unterlegte Kurve zu sehen ist, fallen spezifischer AK und Isotyp zusammen.

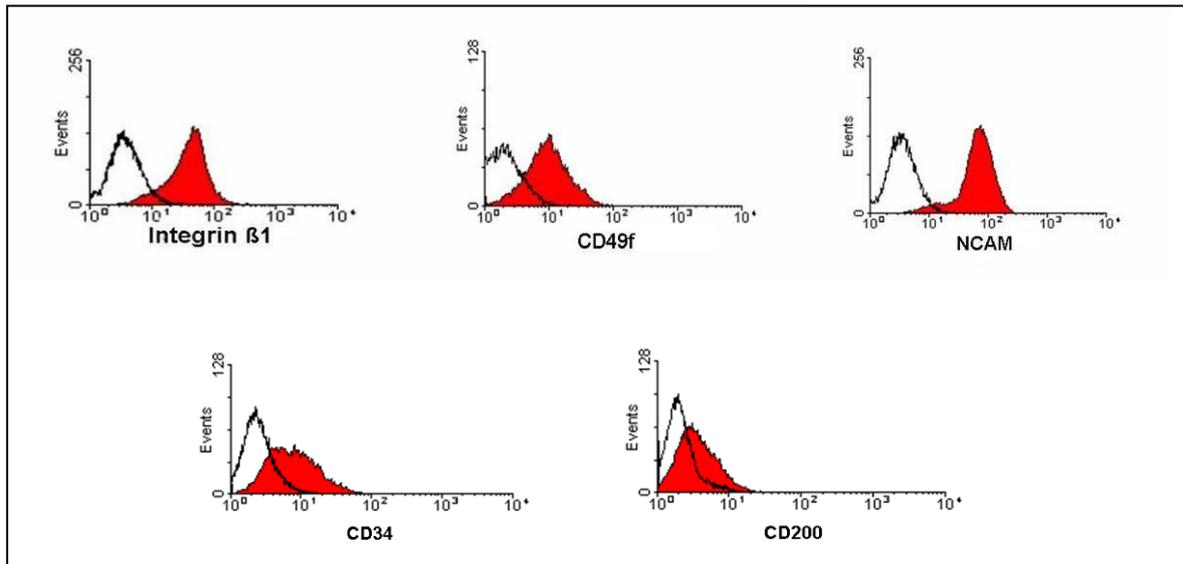
#### 4.2.4.1 Marker von Haarfollikelstammzellen

Nach der Expansion der Zellen wurden zunächst die Marker untersucht, die zuvor in verschiedenen Studien für die Stammzellregion der Haarfollikel beschrieben wurden. Getestet wurden deshalb Nestin, der Neurotrophinrezeptor p75 (p75<sup>NTR</sup>), Lhx2 und Sox9 mit RT-PCR sowie CD34, CD200, Integrin- $\beta$ 1 (CD29),  $\alpha$ 6-Integrin (CD49f) und NCAM (CD56) über FACS Analyse.

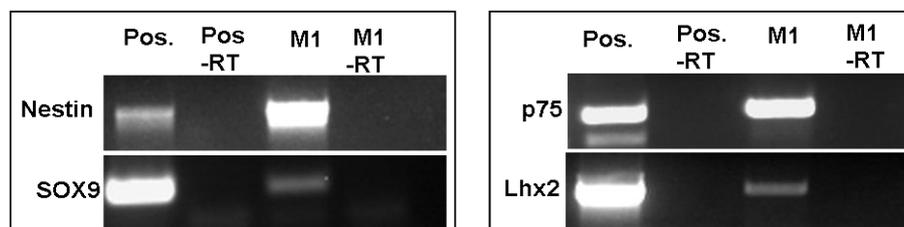
Die Intergrine  $\alpha$ 6 und  $\beta$ 1 sowie Nestin und Lhx2 waren in allen Zellen nachweisbar. Besonders stark war die Nestinexpression bei den Zellen vom Typ 2 und den Zellen aus dem Barthaarfollikel. NCAM war nur in den Typ 1 Zellen und den Barthaarfollikelzellen zu sehen. Bei Sox9 war die Expression in den Typ 1 Zellen schwach positiv, die Zellen vom Typ 2 und die aus dem Barthaarfollikel waren negativ. Alle Zellen waren stark positiv für p75<sup>NTR</sup>. Bei den HFSC Markern CD34 (nur bei Mäusen ein HFSC Marker) und CD200 konnte der Proteinnachweis für die M1 Zellen erbracht werden. Der Anteil der CD34 positiven Zellen erhöhte sich von 10,25% in der Passage 7 auf 28,10% in der Passage 63. Der Anteil der CD200 positiven Zellen war nur gering (Tabelle 15, Abbildung 10 und Abb. 11).

	<b>Integrin <math>\beta</math>1</b>	<b>CD49f</b>	<b>NCAM</b>	<b>CD34</b>	<b>CD200</b>
Typ 1 (%)	61,5	48,3	93,5	28,1	2,6
Typ 2 (%)	n.t.(PCR)	n.t. (PCR)	1,4	1,9	7,3
Typ 3 (%)	n.t. (PCR)	n.t. (PCR)	1,0	4,4	0,6

**Tabelle 15: Anteil der im FACS positiven Zellen (%) der drei isolierten Zelltypen bei Kultur in B27 Medium. n.t.: nicht getestet**



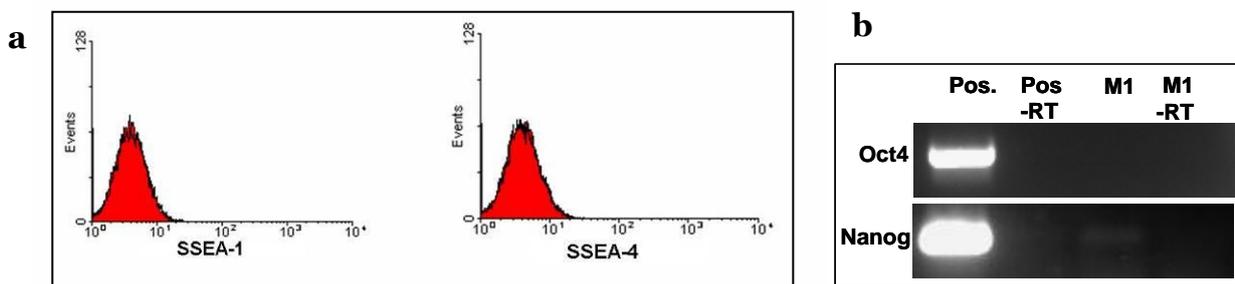
**Abbildung 10: FACS Ergebnisse der HFSC-Marker bei den in B27 Medium kultivierten M1 Zellen. Die Zellen sind für die Intergrine  $\alpha 6$  (CD49f) und  $\beta 1$ , sowie für NCAM stark positiv, die Stammzellmarker CD34 und CD200 werden nur schwach exprimiert**



**Abbildung 11: RT-PCR Ergebnisse für potentielle HFSC-Marker bei Kultivierung der Zelllinie M1 in B27 Medium. Die Zellen sind stark positiv für Nestin und P75 . Etwas schwächer werden Sox9 und Lhx2 exprimiert. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription**

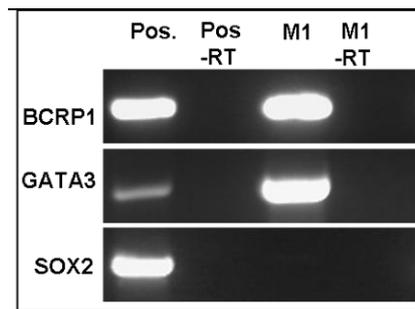
#### 4.2.4.2 Embryonale und stammzellassozierte Marker anderer Gewebetypen

In der Untersuchung der Expression typischer Marker von embryonalen Stammzellen war Nanog, Oct4, SSEA-1 und SSEA-4 in allen getesteten Zellen negativ (Abbildung 12).

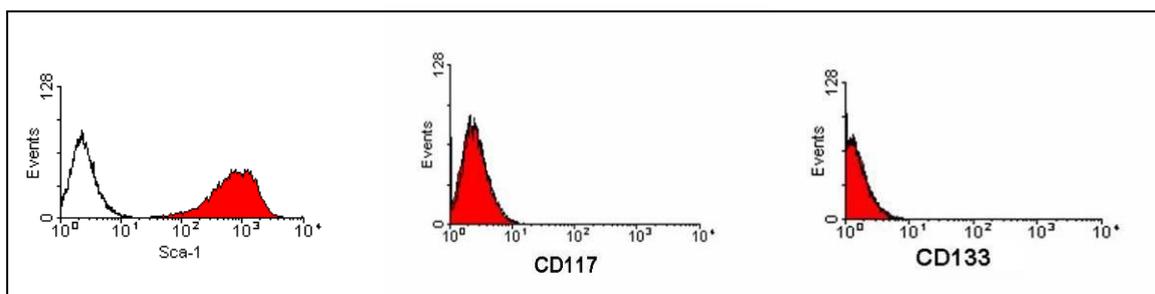


**Abbildung 12: Untersuchung embryonaler Marker in der M1 Zelllinie (B27 Medium). (a) In der FACS Analyse sind die M1 Zellen negativ für SSEA-1 und SSEA-4. (b) In der RT-PCR kein Nachweis von Oct4 oder Nanog. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription**

Zusätzlich wurden die in dieser Arbeit isolierten Zellen auf Marker untersucht, die in adulten Progenitorzellen/Stammzellen aus dem Knochenmark (CD117, CD133, Sca-1, GATA3), dem Pankreas (BCRP1, Sox2), neuronalen Zellen (Sox2) oder Muskelgewebe (BCRP1) exprimiert werden. Eine besonders starke Expression konnte bei allen Zelllinien für BCRP1, GATA3 und Sca-1 beobachtet werden. Die anderen Marker hämatopoetischer Stammzellen waren komplett negativ. Sox2 konnte in den Zellen vom Typ 3 und bei Ersatz von FKS durch 20% SR auch in den Typ 1 Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 13 und Abbildung 14).



**Abbildung 13:** Die in B27 Medium kultivierten M1 Zellen sind in der RT-PCR für die stammzellassoziierten Marker BCRP1 und GATA3 positiv und für Sox2 negativ. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription

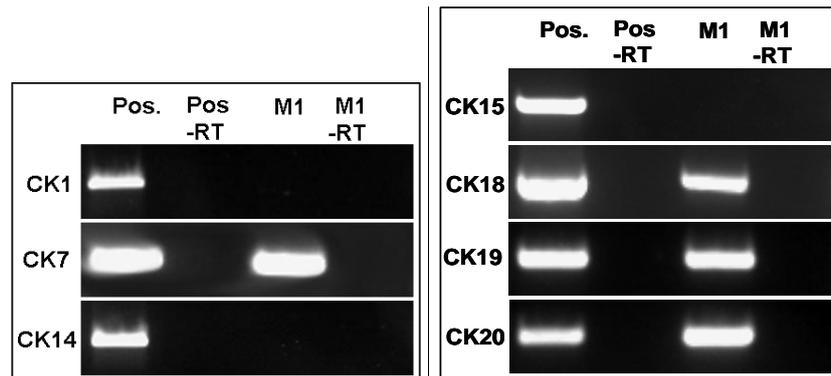


**Abbildung 14:** Die FACS Analyse stammzellassoziierter Marker zeigt die positive Expression von Sca-1 in den M1 Zellen (Kultivierung in B27 Medium)

#### 4.2.4.3 Cytokeratine

Die Testung auf verschiedene Cytokeratine (CK1, CK7, CK14, CK15, CK18, CK19, CK20) wurde durchgeführt, um Rückschlüsse über die Identität der Zellen zu erhalten, da jeder Epitheltyp ein spezifisches Expressionsmuster besitzt (Moll et al. 1982). Für CK1, CK14 und CK15 waren alle getesteten Zellen negativ. CK7 war in allen Zelllinien positiv. Bei CK18, CK19 und CK20 ist die Expression abhängig vom Zelltyp und den Kulturbedingungen.

CK 18 wird bei Zellen vom Typ 2 immer exprimiert, in den anderen Zelltypen nur, wenn FKS durch Serum Replacement ersetzt wird. CK19 wird von den Typ 1 und den Typ 2 Zellen aber nicht von den Typ 3 Zellen exprimiert. CK20 wird nur von Zellen vom Typ 1 produziert und hier besonders stark in Kultur mit SR (Abb. 15).



**Abbildung 15: RT-PCR Ergebnisse der Cytokeratinexpression der M1 Zelllinie bei Kultur in DMEM/F12 3:1 Medium mit FGF (20 ng/ml) und 10% SR. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription**

#### 4.2.4.4 Epitheliale, mesodermale und mesenchymale Marker

Für die weitere Charakterisierung der Stammzellen wurden einige epitheliale Marker wie E-Cadherin, CD105 (Endoglin), CD106 (VCAM-1), CD138 und FLK1 (VEGFR-2), Marker für endotheliale Vorläuferzellen: CD31 (PECAM-1), hämatopoetische Marker: CD9, CD25, CD44, CD45, CD62L (L-Selektin), CD73, CD90.2 und MHCII mit FACS und der mesenchymale Marker Vimentin mit RT-PCR untersucht.

Die M1 Zellen waren deutlich positiv für CD9, CD44, CD90.2, CD105 und CD106. Alle anderen Marker waren nicht nachweisbar.

Für CD90.2 waren nur die Typ 1 Zellen positiv. Bei CD 105 waren die Typ 1 und die Typ 3 Zellen positiv (Tabelle 16, Abbildung 16 und Abbildung 17).

	<b>Typ 1 (%)</b>	<b>Typ 2 (%)</b>	<b>Typ 3 (%)</b>
CD9	95,3	n.t.	n.t.
CD25	0,3	n.t.	n.t.
CD31	6,6	n.t.	n.t.
CD44	96,0	47,11	n.t.
CD45	0,9	1,5	0,8
CD62L	0,7	n.t.	n.t.
CD73	2,7	19,4	14,0
CD90.2	99,9	1,8	2,3
CD105	63,0	1,4	49,6
CD106	57,4	20,3	24,0
CD138	1,5	n.t.	n.t.
E-Cadherin	1,0	1,4	0,8
FLK-1	2,6	n.t.	n.t.
MHCII	0	n.t.	n.t.

**Tabelle 16: Bestimmung epithelialer und mesenchymaler Marker in der FACS Analyse.**

**% der im FACS positiven Typ 1, Typ 2 und Typ 3 Zellen bei Kultur in B27 Medium.**

**n.t.: nicht getestet**

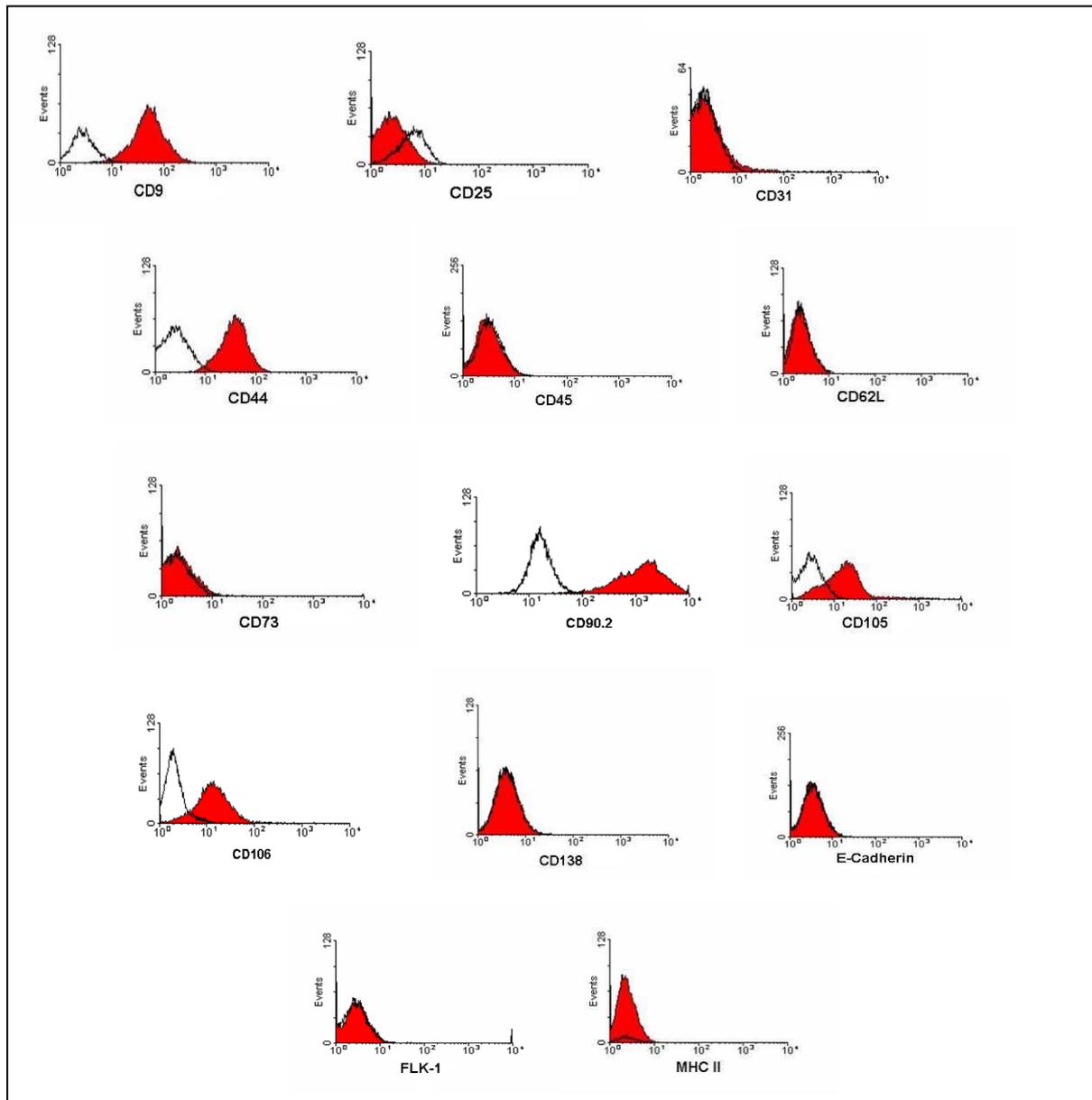


Abbildung 16: Die FACS Ergebnisse der Testung auf epitheliale und mesenchymale Oberflächenmoleküle für die M1 Zellen. Die M1 Zelllinie ist positiv für CD9, CD44, CD90.2, CD105 und CD106 (Kultivierung in B12 Medium)

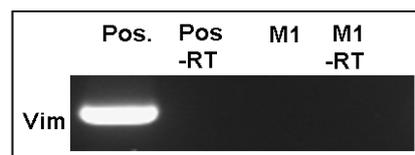
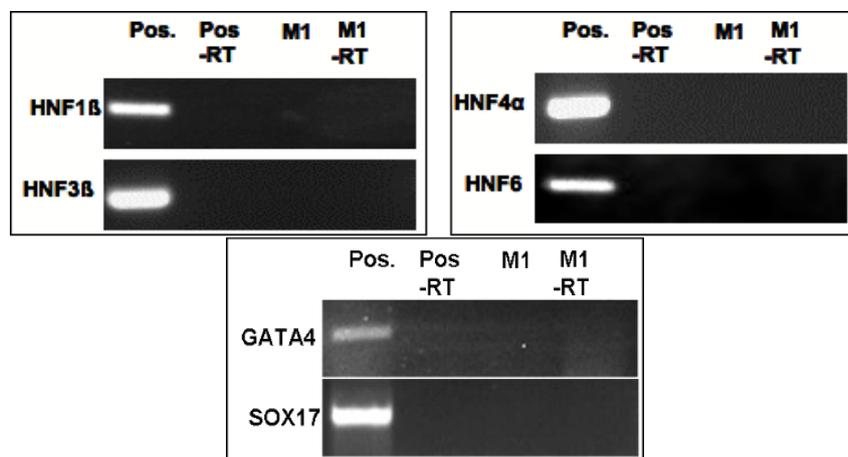


Abbildung 17: RT-PCR zum Nachweis von Vimentin in den M1 Zellen (Kultivierung in B27 Medium). Vimentin wird von den M1 Zellen nicht exprimiert. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription

#### 4.2.4.5 Endodermale Marker

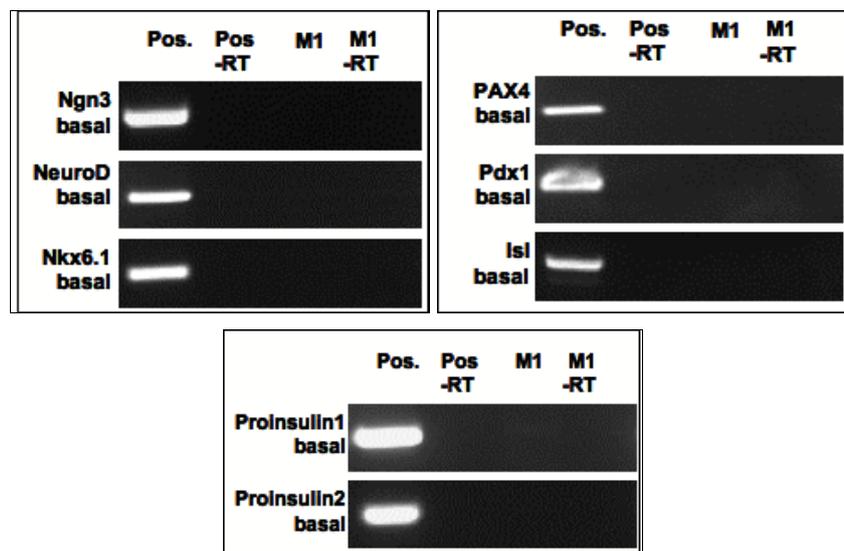
Da sich der Pankreas aus endodermalen Vorläuferzellen entwickelt und deren Marker während der Embryonalphase und teils auch noch im adulten Gewebe in Langerhans-Inseln exprimiert werden, wurden die endodermalen Transkriptionsfaktoren HNF1 $\beta$ , HNF3 $\beta$ , HNF4 $\alpha$ , HNF6 GATA4 und Sox17 untersucht. Diese Marker waren in allen Zelltypen komplett negativ (Abbildung 18).



**Abbildung 18: RT-PCR zum Nachweis von HNF1 $\beta$ , HNF3 $\beta$ , HNF4 $\alpha$ , HNF6, GATA4 und Sox17 in den M1 Zellen (Kultivierung in B27 Medium). Alle Marker sind in den M1 Zellen negativ. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription**

#### 4.2.4.6 Endokrine Progenitormarker und endokrine Marker

Unter Expansionsbedingungen ohne Vordifferenzierung wurde die Expression der proendokrinen Transkriptionsfaktoren Ngn3, NeuroD, Nkx6.1, Pax4, Pdx1, Isl1 und der Hormone Proinsulin I und Proinsulin II getestet. Es konnte für keinen dieser Marker eine Expression festgestellt werden (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** RT-PCR zum Nachweis von Ngn3, NeuroD, Nkx6.1, Pax4, Pdx1, Isl1, Proinsulin I und Proinsulin II in den M1 Zellen (Kultivierung in B27 Medium). Alle Marker sind in den M1 Zellen negativ. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription

#### 4.2.4.7 Zusammenfassender Vergleich mit bereits identifizierten Stammzellen der Haut und ihren Anhangsgebilden

Betrachtet man nun die Ergebnisse der RT-PCR und FACS Analysen und vergleicht diese mit den Expressionsdaten der bekannten Haarfollikel- bzw. Hautstammzellen, so wird deutlich, dass das Expressionsprofil der M1 Zellen mit keinem bereits veröffentlichten Profil komplett übereinstimmt (Tabelle 17).

Folglich scheinen die in der vorliegenden Arbeit isolierten Zellen eine neue Subpopulation zu repräsentieren.

	M1	LRC	BSC	mHFSC	hHFSC	CK15 negative BC	SKP	DEEP1	EPI-NCSC	SP	Merkel Zellen	DP	ORS	IRS	TAC	Basal schicht	Supra basal
BMP4												+					
BMP6			+														
BCRP1	++							-		+							
CD200	+	+	+		+												
CD31	-		-	-	-	-											
CD34	+	+	+	+	-	+			-	+			+			+	
CD45	-		+							-							
CD71			-							+					+		
CK1	-		-				-	-	-					+			+
CK10					-		-	-	-					+			+
CK14	-		+				-	-	-	+					+	+	
CK15	-	+	+	-	+	-	-	-	-				+		-		
CK16							-	-	-					+			
CK17							-	-	-					+			
CK18	++						-	+	-		+						
CK19	++		+		+		-	+	-	+	+		+		+		
CK20	++						-	-	-		+						
CK5*	-						-	-	-						+	+	
CK6			+				-	-	-				+				
CK7	++				+				-								
Dkk3*	+				+												
E-Cadherin	-							+		+							
FGF18			+														
FGF7*	++											+					
Fibronectin							+										
Follicle statin*	++				+												
GATA3	++													+			
IGF1*	+											+					
Lhx2	+		+														
Loricrin			-											+			
Nanog	-				+												
Nestin	++			+		+	+	-	+								
Oct4	-				+		+										
P75	++		+										+				
S100a4*	++		+												-		
S100a6		+	+					+					+		-		

	M1	LRC	BSC	mHFSC	hHFSC	CK15 negative BC	SKP	DEEP1	EPI-NCSC	SP	Merkel Zellen	DP	ORS	IRS	TAC	Basal schicht	Supra basal
Sca-1	++									+							
Sox9	+		+				+		+								
Vimentin	-		-				-	-									
Wnt5*	++								-								
$\alpha 6$ Integrin	++		high							+						+	
$\beta 1$ Integrin	++	+	+		+	5x höher als in TAC		+		+			+		+	+	+

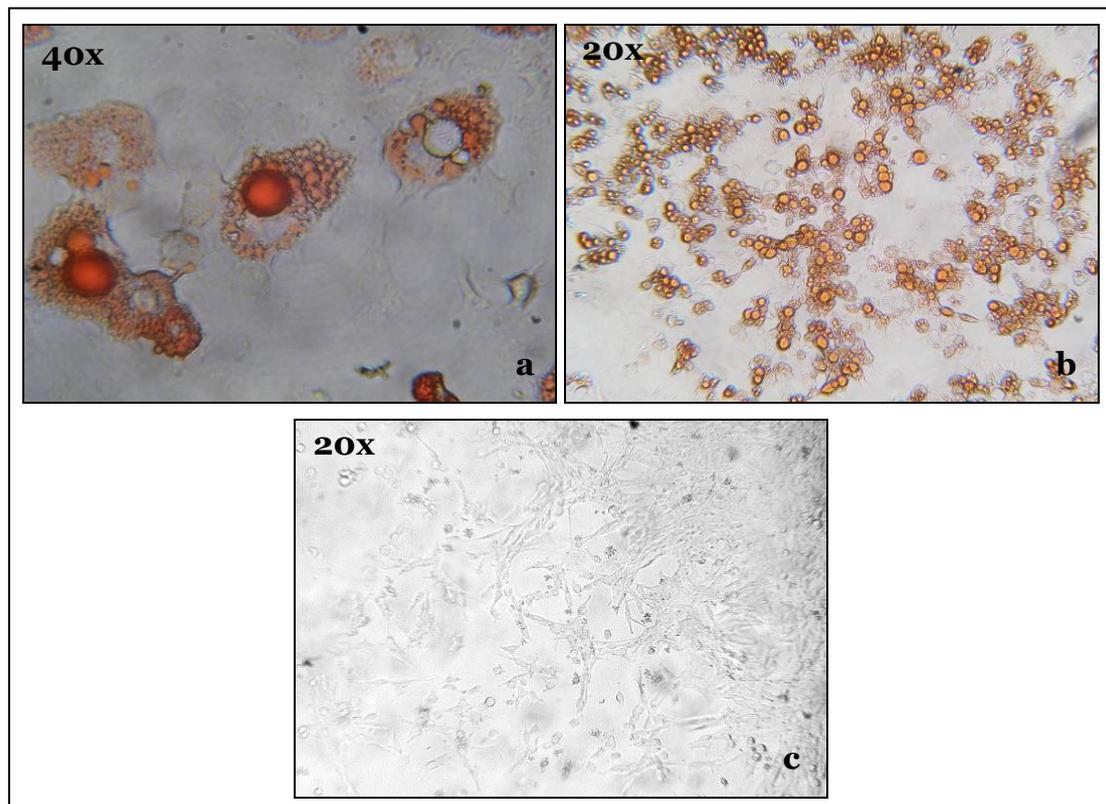
**Tabelle 17: Vergleich der in dieser Arbeit isolierten Typ 1 Zellen (M1) und den bekannten Stammzellen im Bereich des Haarfollikels. Die grau unterlegten Flächen stimmen mit den Typ1 Zellen überein. Die leeren Flächen bedeuten, dass die Expression für diese Gene bei der entsprechenden Zelllinie nicht beschrieben ist. SKP: skin derived precursor; DEEP1: dermis derived epithelial progenitor 1; ORS: outer root sheath; IRS: inner root sheath; LRC: label retaining cell; BSC: bulge stem cell; BC: bulge cell; hHFSC: human hair follicle stem cell; TAC: transit amplifying cell; EPI-NCSC: epidermal neural crest derived stem cell; SP: side population. Mit \* gekennzeichnete Gene werden erst weiter unten in den Ergebnissen erwähnt. Mit + gekennzeichnete Gene sind eher schwach exprimiert und mit ++ gekennzeichnete sind sehr stark exprimiert**

### 4.3 Analyse der Multipotenz

Um eine Aussage über die Plastizität der isolierten Zellen machen zu können wurde ihre Fähigkeit in einen anderen Zelltyp zu differenzieren getestet.

### 4.3.1 Differenzierung in Adipozyten

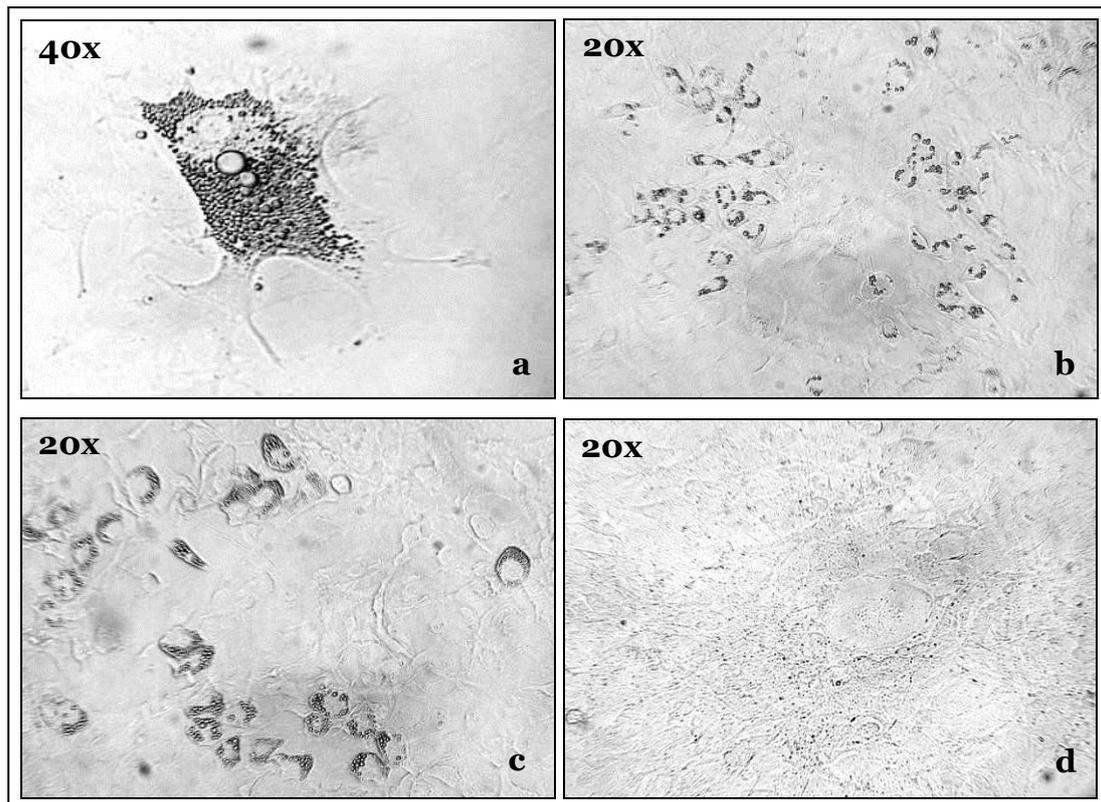
Die Oil Red O Färbung zeigte, dass fast alle Zellen vom Typ1 nach 14 Tagen Fett eingelagert haben und folglich zu Adipozyten transdifferenzieren konnten. Diese Fähigkeit war unabhängig vom Alter der Zellen, sie waren in frühen Passagen dazu fähig und behielten diese Eigenschaft bis zur ältesten getesteten Passage 105. Bei den Zellen vom Typ 2 und 3 war das nicht der Fall, diese Zellen waren zu keinem Zeitpunkt in der Lage in Adipozyten zu differenzieren und Fett einzulagern.



**Abbildung 20: (a-b) Positive Oil Red O Färbung der 14 Tage in Adipozytenmedium stimulierten M1 Zellen. (c) Negative Oil Red O Färbung der nicht stimulierten M1 Zellen**

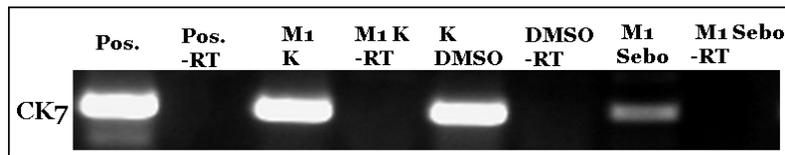
### 4.3.2 Differenzierung in Sebozyten

Für die Differenzierung in Sebozyten wurde das Medium verwendet, das die Arbeitsgruppe Zouboulis et al (2008) verwendete. Die Zellen vom Typ 1 haben eindeutig Zelleinschlüsse gebildet. Diese sind kleiner, als bei den Adipozyten und zeigen die Bildung von Sebum.



**Abbildung 21: (a-c) Sebumbildung in den für 12 Tage mit Sebozytenmedium stimulierten M1 Zellen. (d) Unstimulierte M1 Zellen als Kontrolle für 12 Tage in B27 Medium kultiviert**

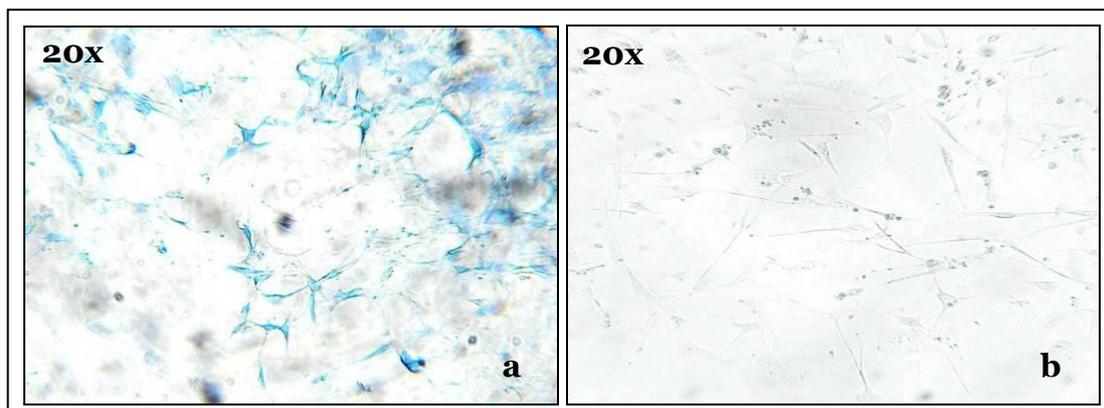
Da das Sebum aber schlecht von der Fetteinlagerung der Adipozyten zu unterscheiden ist, wurde zusätzlich eine RT-PCR auf CK7 durchgeführt. CK7 ist nur in weniger differenzierten Sebozyten Vorläufern in der Basalschicht der Talgdrüse zu finden (Lo Celso et al. 2008). Basal wird es von den Typ 1 Zellen exprimiert, wird aber im Laufe der Kultivierung in Sebozytenmedium herunter reguliert.



**Abbildung 22: CK7 Expression der M1 Zellen.** Die unstimulierte Kontrolle (K) exprimiert CK7 stärker, als die in Sebozytenmedium (M1 Sebo) kultivierten Zellen. Die Kontrolle der M1 Zellen, die die gleiche Konzentration an DMSO (K DMSO), wie das Sebozytenmedium enthielt, zeigte die gleiche Expressionsstärke wie die M1 Negativkontrolle. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription

#### 4.3.3 Differenzierung in Chondrozyten

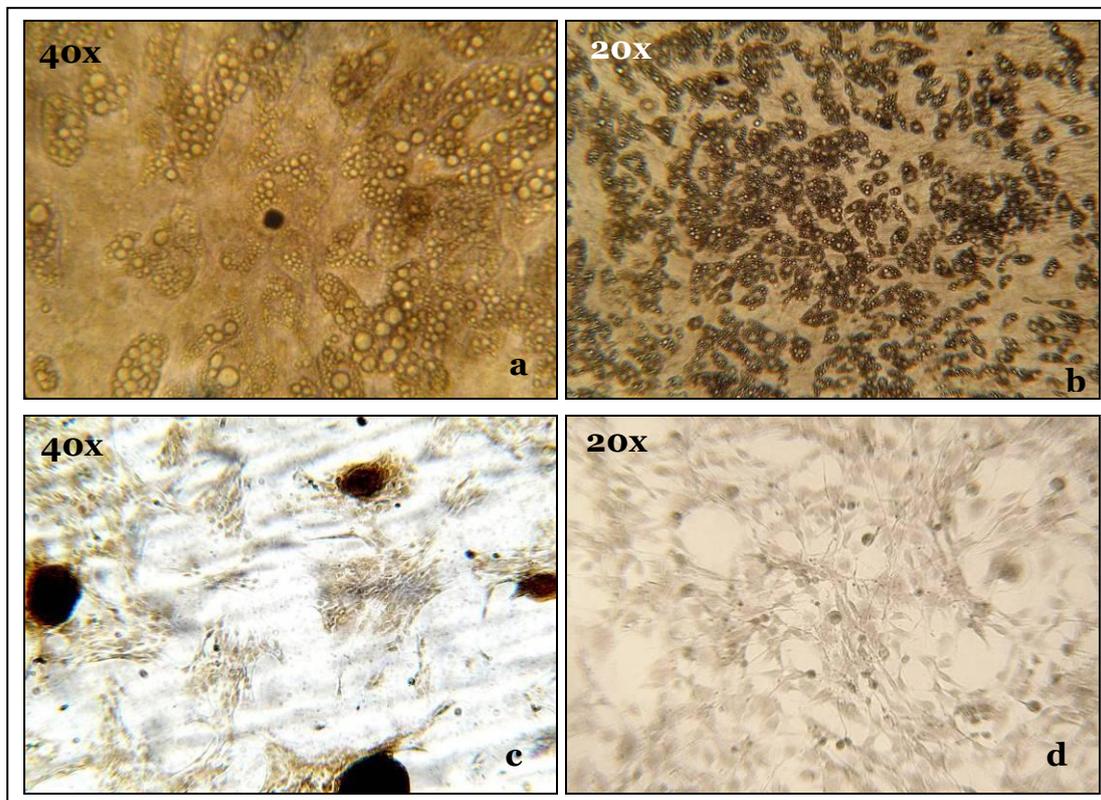
Bei der Inkubation der Zellen mit Chondrozytenmedium verhielt es sich ähnlich wie bei der Adipozytenstimulation. Nur die Zellen vom Typ 1 waren in der Alcianblaufärbung positiv, die anderen beiden Zelltypen zeigten keine Produktion einer proteoglykanreichen extrazellulären Matrix.



**Abbildung 23: (a) Positive Alcianblaufärbung, der für 21 Tage in Chondrozytenmedium kultivierten M1 Zellen. (b) Negative Kontrolle der M1 Zellen, die für 21 Tage in B27 Medium wuchsen**

#### 4.3.4 Differenzierung in Osteoblasten

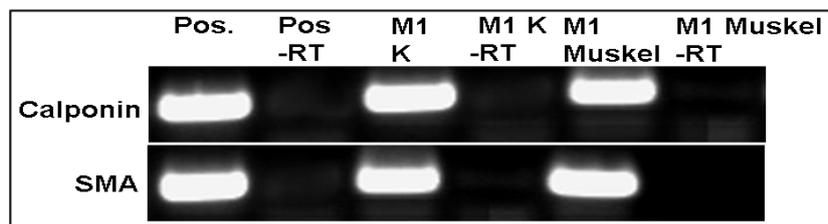
Die von-Kossa-Färbung des Osteoblastenansatzes führte bei den Zelltypen 2 und 3 zu keinem Nachweis von Kalziumablagerungen. Bei den Zellen vom Typ 1 fanden sich nur einzelne schwarze Foki, so dass allenfalls von einer partiellen Differenzierung auszugehen ist. Das Osteoblastenmedium führte bei längerer Stimulation (vier Wochen) zu einer ähnlich ausgeprägten Fetteinlagerung, wie das Adipozytenstimulationsmedium (Abbildung 24a,b).



**Abbildung 24:** (a-b) Färbung der Kalziumsalze in den M1 Zellen nach 28tägiger Stimulation in Osteoblastenmedium. Vergleich einer 28 Tage (a-b) und 21 Tage (c) langen Stimulation der M1 Zellen. (d) Negative von-Kossa-Färbung der M1 Population nach 28 Tagen in B27 Medium

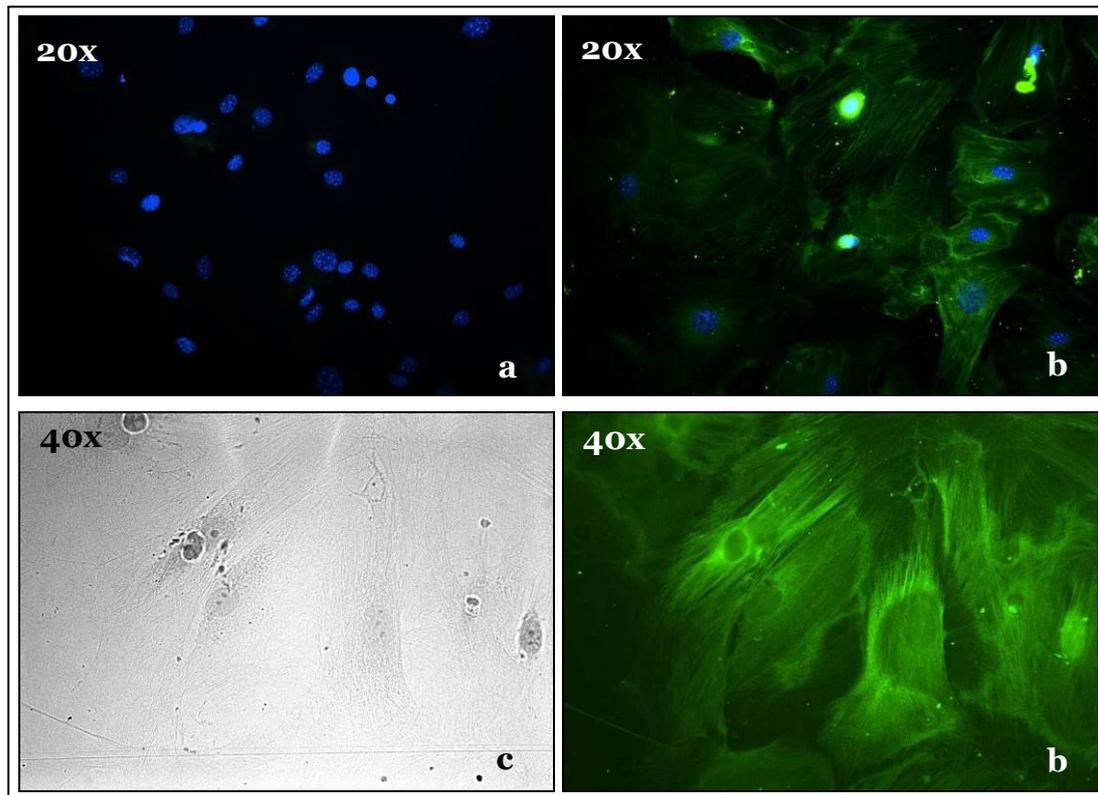
### 4.3.5 Differenzierung in Muskelzellen

Die erfolgreiche Differenzierung der HFSC Zellen in Muskelzellen wurde mit zwei Methoden getestet. Mit RT-PCR wurde die Expression der Gene Calponin und SMA untersucht. Es zeigte sich, dass die M1 Zellen schon basal positiv für beide Muskelproteine sind.



**Abbildung 25: RT-PCR der M1 Zellen auf Calponin und Smooth Muscle Aktin (SMA). Sowohl die Kontrolle (K) der M1 Zellen in B27 Medium, als auch die für 14 Tage mit Muskelzellmedium (Muskel) stimulierten Zellen sind positiv für beide Marker. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription**

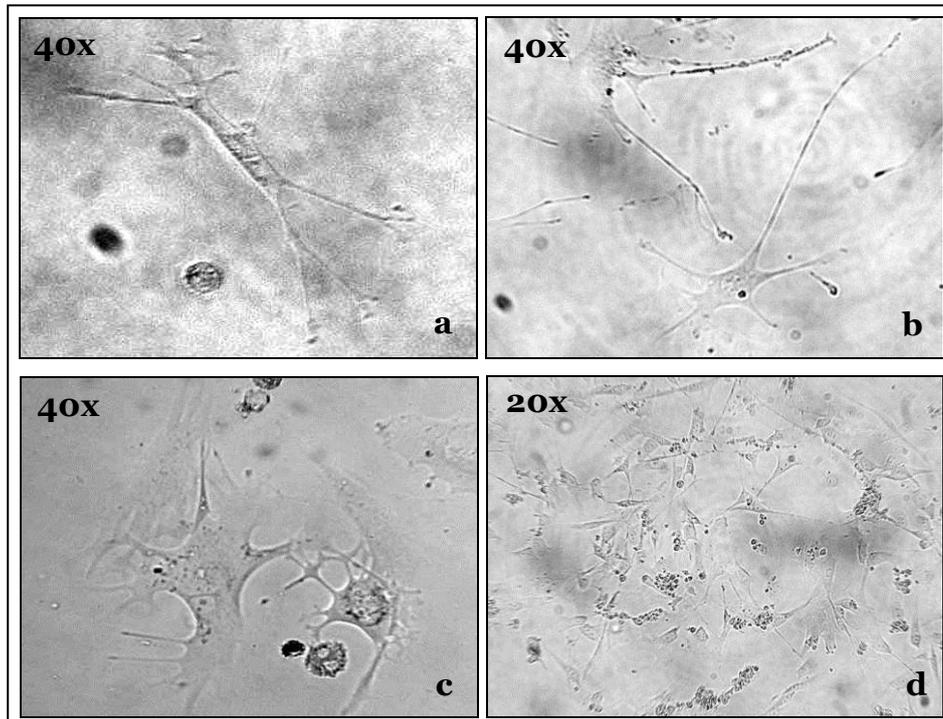
Da die Typ 1 Zellen beide Gene bereits ohne Stimulation exprimieren, wurde als Nachweis für die Differenzierung ein weiterer Marker benötigt. Mittels einer Immunfluoreszenzfärbung konnte das Protein Desmin in >90% der differenzierten M1 Zellen angefärbt werden. Bei den nicht stimulierten Zellen war die Färbung negativ. Nach Inkubation in Muskelzellmedium konnte nach 14 Tagen eine positive Desminexpression nachgewiesen werden. Bereits in der Phasenkontrastmikroskopie zeigt sich eine deutliche Änderung der Zellmorphologie mit breitem Zytoplasma (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Desminfärbung nach Inkubation der M1 Zellen in Muskelmedium (14 Tage). Färbung mit einem monoklonalen anti-Desminantikörper und FITC (grün). (a) Vergleich der Negativkontrolle mit den (b) für 14 Tage differenzierten M1 Zellen. (c) Ausdifferenzierte Zellen im Phasenkontrast- und (d) unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die DAPI gefärbten Zellkerne leuchten blau**

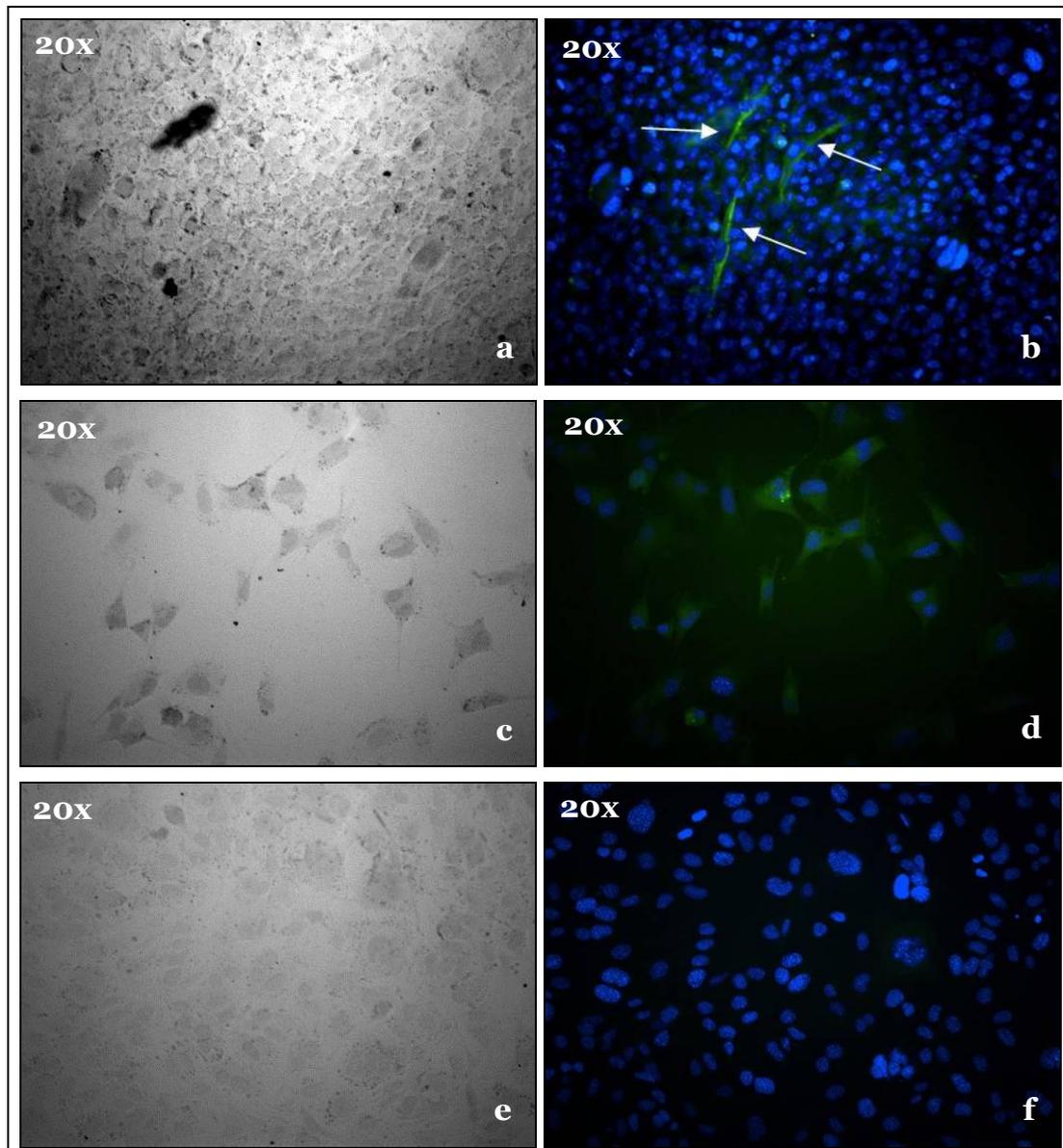
#### **4.3.6 Differenzierung in Neuronen**

Bei dem Differenzierungsansatz in Neuronen war bei einigen Zellen vom Typ 1 eine deutliche Veränderung der Morphologie zu beobachten. Einige Zellen (<10%) zeigten typische neuronartige Ausläufer (Abbildung 27).



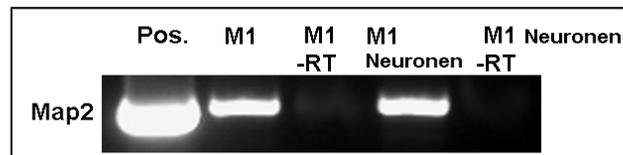
**Abbildung 27:** (a-c) Neuronenähnliche Morphologie der für 21 Tage in Neuronenmedium stimulierten M1 Zellen. (d) Nicht stimulierte M1 Zellen 21 Tage in B27 Medium

Um die Neuronendifferenzierung der M1 Zellpopulation zu bestätigen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung auf das Protein  $\beta$  III Tubulin durchgeführt. Die Färbung zeigte, dass einzelne Zellen  $\beta$  III Tubulin positiv werden und somit in der Lage waren in Neuronen zu differenzieren.



**Abbildung 28:  $\beta$  III Tubulin Färbung mit einem monoklonalen Antikörper und anti-Maus-FITC (grün). (a, c, e) Links die Phasenkontrastbilder und (b, d, f) daneben die zugehörigen Bilder desselben Ausschnitts unter dem Fluoreszenzmikroskop. (b+d) Positive Färbung der für 21 Tage in Neuronenmedium stimulierten M1 Zellen. (f) Negative  $\beta$  III Tubulin Färbung der 21 Tage in HG Medium gewachsenen M1 Zellen. Die DAPI gefärbten Zellkerne leuchten blau**

Die Testung der Expression des Microtubule-associated protein 2 (Map2) erbrachte, dass die M1 Zellen bereits basal in der RT-PCR positiv sind (Abbildung 29).

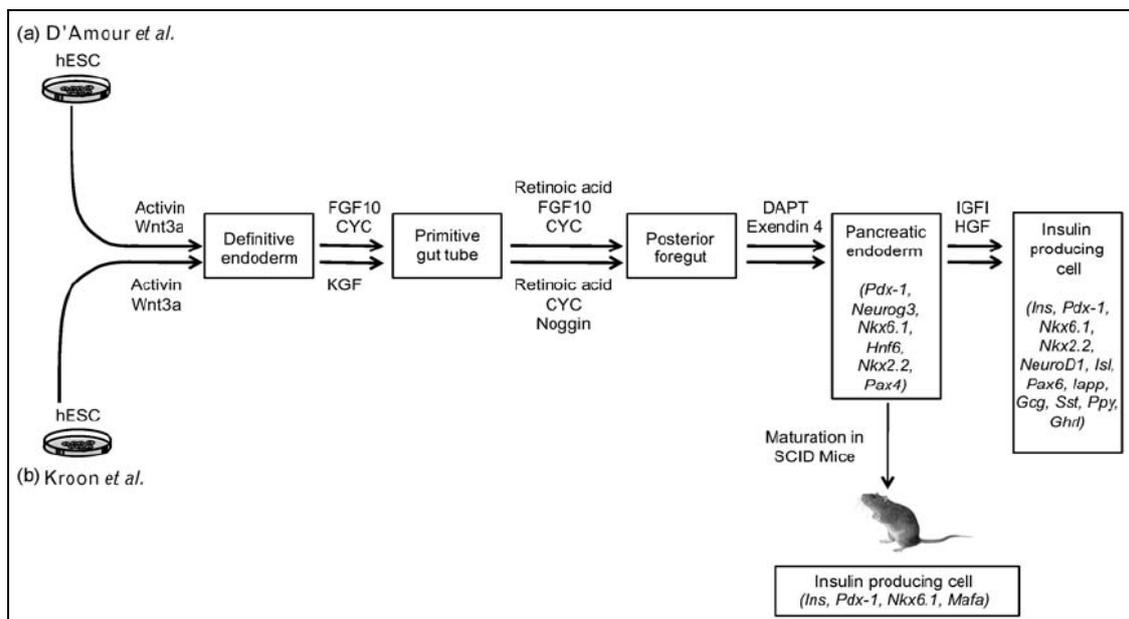


**Abbildung 29: RT-PCR der M1 Zellen auf Map2. Sowohl die für 21 Tage in Neuronenmedium kultivierten Zellen als auch die in B27 Medium kultivierten Zellen (M1) sind positiv für MAP2. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription**

#### 4.4 Analyse des endokrinen Differenzierungspotentials

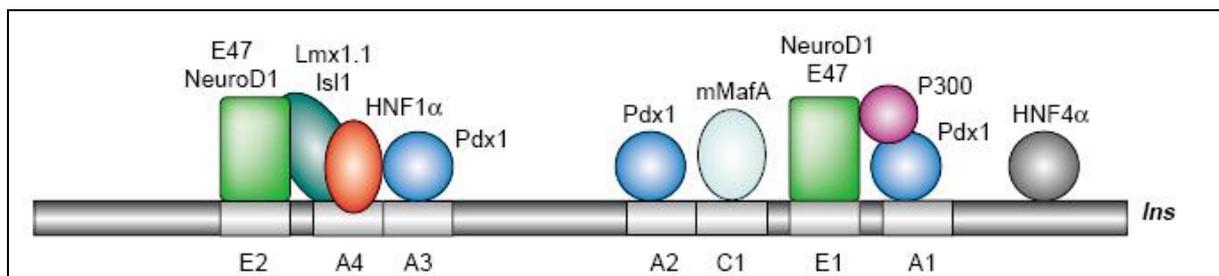
Da die Typ 2 und Typ 3 Zellen nicht in der Lage waren in einen anderen Zelltyp zu differenzieren, wurden die Versuche zur endokrinen Differenzierung nur noch mit den Zellen vom Typ 1 durchgeführt.

Wie im Materialteil beschrieben, gibt es verschiedene bekannte Stimuli mit denen eine  $\beta$ -Zelldifferenzierung erreicht werden kann. Diese können in verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlich langen Stimulationszeiträumen einzeln, oder in Kombinationen mit anderen Faktoren verwendet werden, um eine schrittweise Differenzierung in Insulin produzierende Zellen zu bewirken. Abbildung 30: zeigt wie in einigen Publikationen bestimmte Stimulationsfaktoren gezielt und in Relation zum entsprechenden Entwicklungsstadium bei embryonalen Stammzellen eingesetzt wurden (D'Amour et al. 2006, Kroon et al. 2008).



**Abbildung 30: Protokoll für die Differenzierung von embryonalen Stammzellen in  $\beta$ -Zellen (nach D'Amour et al. 2006 und Kroon et al. 2008). CYC: KAAD-Cyclopamine; DAPT:  $\gamma$ -Secretase Inhibitor; FGF10: Fibroblast Growth Factor 10; Gcg: Glukagon; Ghrl: Ghrelin; hESC: human embryonic stem cell; HGF: Hepatocyte Growth Factor; Iapp: Islet Amyloid Polypeptid; IGF-I: Insulin-like Growth Factor I; KGF: Keratinocyte Growth Factor; Ppy: Pancreatisches Polypeptid; SCID: Severe Combined Immunodeficiency; Sst: Somatostatin. (Abbildung aus Evans-Mollina et al. 2009)**

In 71 Stimulationsexperimenten mit den M1 Zellen wurden die im Abschnitt „Material und Methoden“ beschriebenen Faktoren verschieden kombiniert und anschließend die stimulierten Zellen auf die Expression von typischen Genen und Transkriptionsfaktoren analysiert. Abbildung 31 zeigt wichtige Transkriptionsfaktoren, die an den Insulinpromotor binden können und verdeutlicht, wie komplex die Aktivierung des Insulinpromotors ist.

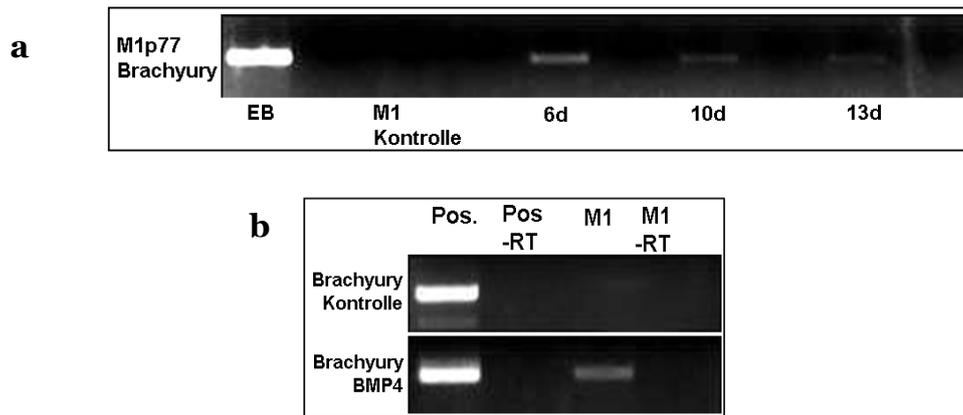


**Abbildung 31: Transkriptionsfaktorkomplexe, die den Insulinpromotor aktivieren.** HNF: Hepatocyte Nuclear Factor; Isl1: Islet-1; Lmx1.1: LIM Homeobox Factor 1.1; mMafA: Mammalian Homolog of Avian MafA; NeuroD1: Neurogenic Differentiation 1; Pdx1: Pancreatic and Duodenal Homeobox Factor 1 (Abbildung aus Chakrabarti und Mirmira 2003)

Meist wurden die Stimmulationsversuche mehrfach getestet, in Versuchen mit 10% FKS, ohne FKS und niedriger FKS Konzentration (0,2%, 1%, 2%, 5%) und/oder mit SR (5%, 10%, 20%). Nachfolgend werden nur die Experimente aufgeführt, in denen eine relevante Änderung wichtiger Markerproteine oder Transkriptionsfaktoren detektierbar war.

#### 4.4.1 Brachyury Expression

Brachyury ist ein Marker für das frühe Endoderm bzw. für das Mesendoderm (Bakre et al. 2007). Mit 100ng/ml Wnt3a konnte Brachyury nach 6 Tagen nachgewiesen werden. Bei längerer Inkubationszeit wurde die Expression wieder schwächer. Bei einer Stimulation mit 100ng/ml Bmp4 für 3 Tage konnte ebenfalls eine Brachyury Expression nachgewiesen werden.

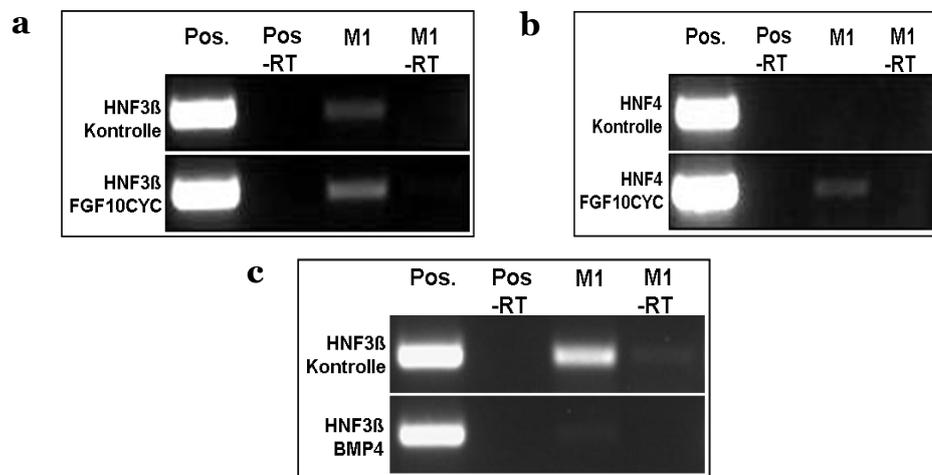


**Abbildung 32: RT-PCR Ergebnisse der Brachyuryexpression in M1 Zellen. (a) Die M1 Kontrollzellen ohne Stimulation waren zu jedem der 3 Zeitpunkte negativ. Nach 6 Tagen mit Wnt3a wird Brachyury hochreguliert und nach 10 und 13 Tagen wird die Expression wieder schwächer. (b) Die 3 tägige Stimulation mit Bmp4 resultierte ebenfalls in einer positiven Brachyuryexpression. Die in B27 Medium kultivierten Kontrollzellen zeigten keine Expression. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription**

#### 4.4.2 Hepatocyte Nuclear Faktor (HNF) Expression

Die HNF3 Transkriptionsfaktoren, haben mindestens zwei Bindungsstellen auf dem Ngn3 Genpromotor. Außerdem sind sie an der Regulation von Pdx1 beteiligt. HNF3 $\alpha$  und  $-\beta$  sind beide im fetalen und im adulten Pankreas zu finden, wobei HNF3 $\alpha$  in den Inseln aktiv ist und HNF3 $\beta$  in Inselzellen und in Azinuszellen (Lee et al. 2001, Murtaugh et al. 2007). Der Hepatocyte Nuclear Faktor HNF4 spielt eine wichtige Rolle beim Diabetestyp MODY1 (Bartoov-Shifman et al. 2002). Bei den Zellen vom Typ 1 wurde bei Langzeitkultur im B27 Medium ab der Passage 77 eine schwache basale Expression von HNF3 $\beta$  beobachtet. Diese Expression konnte durch 50 ng/ml FGF10 und 0,25 $\mu$ M Cyclopamin (erst 3 Tage FGF10, dann 3 Tage FGF10 und Cyclopamin) leicht verstärkt werden. Zusätzlich war es mit diesen Faktoren möglich in den Zellen eine schwache HNF4 Expression zu erzielen. Mit der Gabe von 100ng/ml BMP4 für 3 Tage kam es zur Suppression des basal exprimierten HNF3 $\beta$  bei den M1 Zellen.

Die RT-PCR Ergebnisse für HNF1 und HNF6 waren immer negativ.

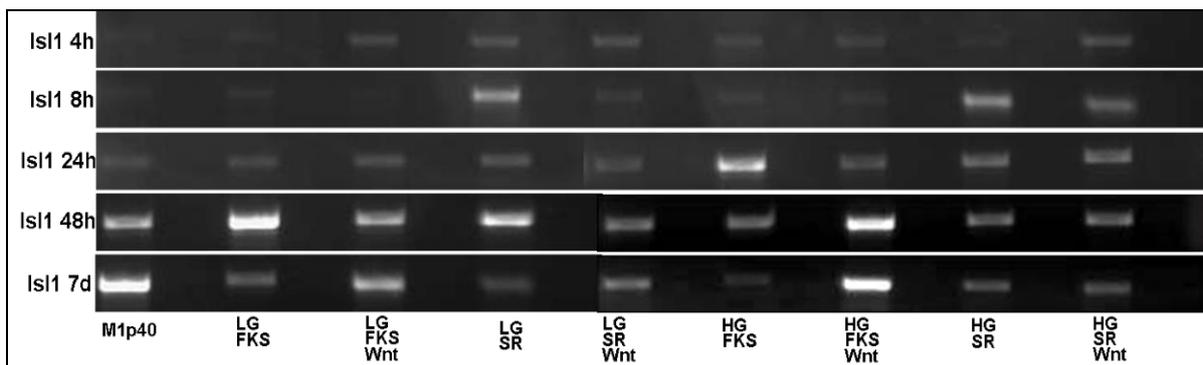


**Abbildung 33: RT-PCR Analyse der HNF Expression. (a) HNF3 $\beta$  Expression und (b) HNF4 Expression der M1 Zellen nach Stimulation mit FGF10 und Cyclopamin. (c) Ab Passage 77 exprimieren die M1 Zellen (Kontrolle) auch basal HNF3 $\beta$ . Nach der Zugabe von Bmp4 wurde die HNF3 $\beta$  Expression herunter reguliert. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription**

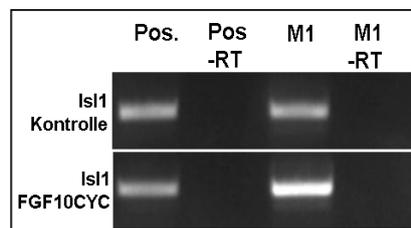
#### 4.4.3 Isl1 Expression

Der Transkriptionsfaktor Isl1 interagiert mit dem Insulinpromotor, ist beteiligt an der Glukagon- und Somatostatinexpression und ist wahrscheinlich essentiell für die dorsale Pankreasentwicklung. Auch bei der Neuronenentwicklung und in pluripotenten kardiovaskulären Progenitorzellen wurde Isl1 beschrieben (Lin et al. 2007, Sun et al. 2008). Da die RT-PCR Ergebnisse der Typ 1 Zellen unter basalen Bedingungen schwach positiv bis negativ waren, wurde die Isl1 Expression genauer untersucht. Die Zellen wurden entweder in hoher (4500mg/L), oder in niedriger (1000mg/L) Glukosekonzentration kultiviert. Außerdem wurde die Kultur mit 10% FKS mit der in 20% SR verglichen und der Einfluss von 100ng/ml Wnt3a getestet. Das resultierende Muster ist sehr heterogen. Direkt nach dem Splitten der Zellen ist die Isl1 Expression nur gering vorhanden und steigt dann bei den meisten Kulturbedingungen nach 24h an.

Es ist ein leichter Trend zu höherer Expression in HG Medium sichtbar. Bei der Kultur in HG Medium mit FKS und Wnt3a ist Isl1 am stärksten exprimiert (Abbildung 34). Durch die Zugabe von 50 ng/ml FGF10 und 0,25µM Cyclopamin (erst 3 Tage FGF10, dann 3 Tage FGF10 und Cyclopamin) ließ sich die Expression von Isl1 deutlich verstärken (Abbildung 35).



**Abbildung 34: RT-PCR Ergebnisse der Isl1 Expression der M1 Zelllinie. Die Zellen sind positiv für Isl1. Die Stärke der Expression hängt von den Kulturbedingungen ab. M1p40 ist zum Vergleich in B27 Medium kultiviert worden. HG: 4500mg/L Glukose; LG: 1000mg/L Glukose; FKS: fetales Kälberserum; SR: serum replacement; Wnt: Wnt3a. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription**

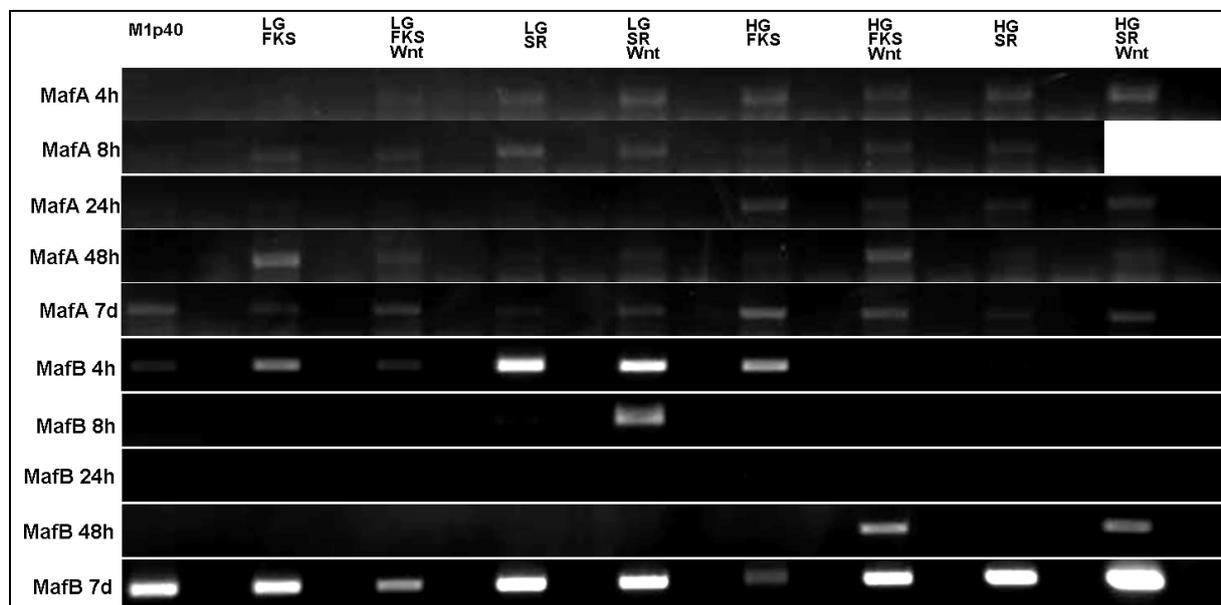


**Abbildung 35: RT-PCR Ergebnis der Isl1 Expression der M1 Zellen. Die Kultur mit FGF10 und Cyclopamin (CYC) bewirkt eine Hochregulation von Isl1. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription**

#### 4.4.4 MafA und MafB Expression

MafA und MafB sind Transkriptionsfaktoren, die pankreatische Gene beeinflussen. MafB reguliert die Expression von Insulin und Glukagon, während MafA ein spezifischer  $\beta$ -Zell Transkriptionsfaktor ist, der an regulatorische Elemente des Insulinpromotors bindet (Wang et al. 2007, Vanhooose et al. 2008). Erstaunlicherweise konnte eine starke Expression von MafB in den Typ1 Zellen nachgewiesen werden. MafA wird nur geringgradig exprimiert. Wie bei Isl1 scheint die Expression von der Kulturdauer und der Rate der Konfluenz entscheidend abhängig zu sein (Abbildung 36).

Die Expression von MafB ist nach dem Splitten, besonders in Medium mit niedriger Glukosekonzentration, höher als in der Proliferationsphase. Die stärkste Expression fand sich bei vollständiger Konfluenz nach 7-tägiger Kulturphase. Der Ersatz von FKS durch SR und die Zugabe von Wnt3a scheinen ebenfalls einen steigernden Einfluss zu haben. So ist die Expression bei 7 Tage Kulturdauer in HG Medium mit 20%SR und 100ng/ml Wnt3a am stärksten.

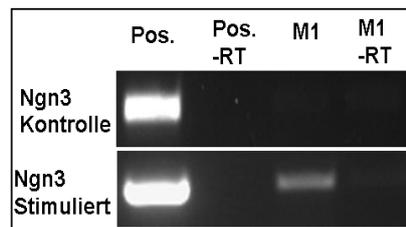


**Abbildung 36: RT-PCR Ergebnisse der MafA/B Expression der M1 Zelllinie. Die Zellen sind positiv für beide Gene, die Expressionsstärke von MafA ist geringer, als die von MafB. Die Stärke der Expression hängt von den Kulturbedingungen ab. M1p40 ist zum Vergleich weiter in B27 Medium kultiviert worden. HG: 4500mg/L Glukose; LG: 1000mg/L Glukose; FKS: fetales Kälberserum; SR: serum replacement; Wnt: Wnt3a**

#### 4.4.5 Ngn3 Expression

Ngn3 wird von den endokrinen Vorläuferzellen des Pankreas exprimiert und stellt einen sehr wichtigen Transkriptionsfaktor in der  $\beta$ -Zell Entstehung dar. Es wurde berichtet, dass GLP1 die Proliferation von Insulinoma Zellen (INS-1) induziert und die  $\beta$ -Zellmasse erhöht, indem es die Differenzierung und Neogenese von duktalem Progenitorzellen in endokrine Inselzellen, über Expression von Pdx1 induziert (Stoffers et al. 2000). Die Ngn3 Expression in der Pankreasmorphogenese wird hochreguliert, nachdem die Pdx1 Expression zurückgeht.

In der vorliegenden Studie wurde eine geringgradige Expression von Ngn3 in den Zellen der M1 Zelllinie nach der 5 tägigen Stimulation in Medium ohne FKS, mit 10nM GLP1 und 10mM Nicotinamid detektiert.

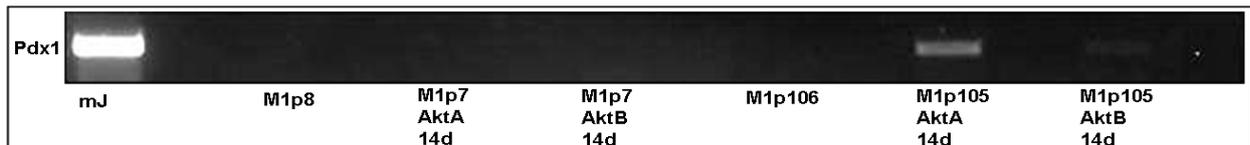


**Abbildung 37: RT-PCR Ergebnisse der M1 Zellen für Ngn3. Nach 5 Tagen Kultur in B27 Medium mit GLP1 und Nicotinamid (stimuliert) exprimieren die M1 Zellen Ngn3. Zellen, die nur in B27 Medium (Kontrolle) kultiviert wurden, sind negativ. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription**

#### 4.4.6 Pdx1 Expression

Pdx1 ist ein Transkriptionsfaktor, der während der Entwicklung pankreatischer Vorläuferzellen exprimiert wird (Ackermann und Gannon 2007). Für Aktvine wurde ein stimulierender Effekt auf die Pdx1 Expression bei embryonalen Stammzellen beschrieben (AktivinB stärker als AktivinA) (D'Amour et al. 2005, Frandsen et al. 2007).

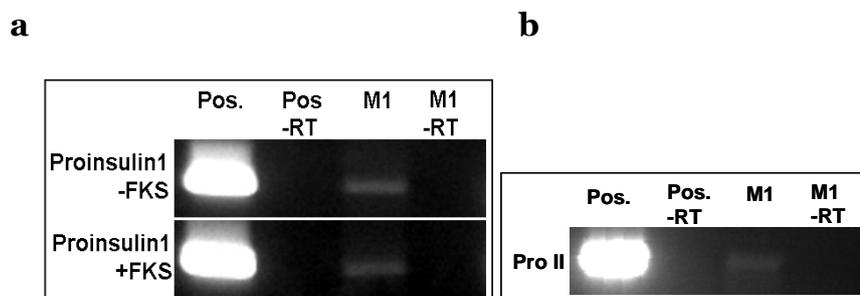
Bei den M1 Zellen konnte eine geringgradige Pdx1 Expression beobachtet werden, wenn die Zellen für 2 Wochen in Medium 3, mit 100ng/ml AktivinA mit 10%SR (ohne B27) kultiviert wurden. Die Expression war jedoch ausschließlich in der älteren Passage 105 und nicht in der Passage 7 detektierbar.



**Abbildung 38: RT-PCR Ergebnis der Pdx1 Expression. Die M1 Zellen (Passage 105) waren nach 14 Tagen Stimulation mit AktivinA positiv für Pdx1**

#### 4.4.7 Proinsulin Expression

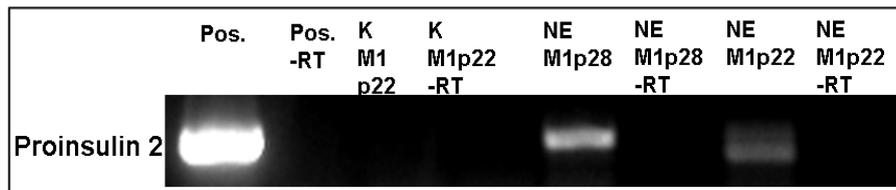
In mehreren Versuchen (n=9) wurde nach Stimulation mit 10nM GLP1 bzw. 10nM Exendin 4 und 10mM Nicotinamid für je 7 Tage eine sehr schwache Expression von Proinsulin 1 und 2 beobachtet. Dies war unabhängig davon, ob das Medium mit oder ohne 10% FKS supplementiert war.



**Abbildung 39: RT-PCR Ergebnisse der Expression von Proinsulin in M1 Zellen nach der Stimulation mit GLP1 und Nicotinamid. (a) Die Zellen sind nach 7 Tagen schwach positiv für Proinsulin 1 und 2 (ProII). (b) Die Kultivierung ohne FKS (-FKS) bewirkte keine Erhöhung der Proinsulin 1 Expression. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription**

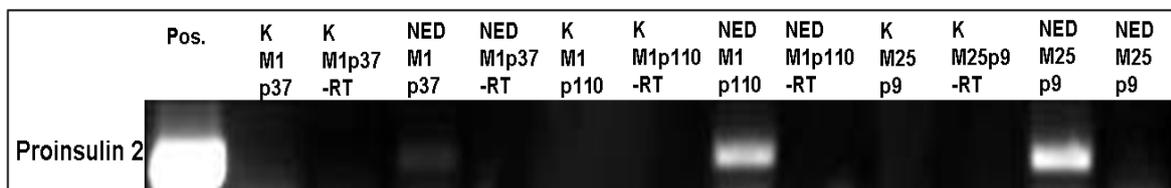
Nicotinamid war Bestandteil der Stimulationsmedien, die zu einer Expression von Ngn3 und Sox17 geführt haben.

Die Zellen, die von der Kultur in B27 Medium für 2 Monate auf die Kultur in HG Medium umgestellt wurden (M1p28), hatten eine stärkere Insulinexpression, als die Zellen, die nur 2 Wochen vorher in HG Medium kultiviert wurden (M1p22).



**Abbildung 40: RT-PCR Ergebnisse der Proinsulin 2 Expression.** Nach Kultur mit Nicotinamid und nachfolgend mit Exendin 4 (NE) wurde von den M1 Zellen Proinsulin 2 exprimiert. Der Effekt war stärker, wenn vorher 2 Monate auf HG Medium umgestellt wurde (p28). Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription

Eine andere Stimulation, die zur Insulinexpression führte, enthielt ebenfalls Nicotinamid. Die Zellen wurden eine Woche von B27 Medium auf X-VIVO ohne FKS umgestellt und anschließend wurde für drei Wochen gleichzeitig mit 10mM Nicotinamid, 10nM Exendin 4 und 20nM DBZ in X-VIVO stimuliert.



**Abbildung 41: RT-PCR Ergebnisse der Proinsulin 2 Expression.** Nach Kultur mit Nicotinamid, Exendin 4 und DBZ (NED) wurde von den M1 Zellen Proinsulin 2 exprimiert. Der Effekt war bei den älteren Zellen der Passage 110 (p110) stärker ausgeprägt, als bei Passage 37 (p37). Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription

Die Expression von Glukagon und Somatostatin war unter den oben aufgeführten Bedingungen und verschiedenen Passagen zu jeder Zeit negativ.

Bei der Stimulation mit Betacellulin, LY-294,002, Natriumbutyrat, DAPT, db-cAMP, EGF, IGF, Indolactam V, Nodal, Noggin, Pikolinsäure, Retinsäure konnte keine proendokrine Differenzierung beobachtet werden. Diese Daten werden aufgrund der negativen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit nicht als Abbildungen dargestellt.

## 4.5 Analyse der Genexpression mittels Illumina Beadarray

Um die molekulare Signatur der M1 Zellen besser zu charakterisieren, wurde ein Beadarray der Firma Illumina durchgeführt. Da die bisher gewonnenen Ergebnisse der Stimulation mit Nicotinamid und Exendin 4 (NE) vielversprechend waren, wurden die M1 Zellen unter basalen Bedingungen mit Zellen nach Differenzierung mit NE verglichen. Außerdem wurden die M1 Zellen mit der Pankreasvorläuferzelllinie mJ verglichen.

### 4.5.1 Genexpression der M1 Zelllinie unter basalen Bedingungen

Die Genarrayuntersuchungen wurden primär durchgeführt, um Unterschiede zwischen verschiedenen Kulturbedingungen und Zelllinien zu detektieren und nicht um die Expression individueller Gene zu identifizieren. Trotzdem wurden zur Validierung der Arrayergebnisse wurde die Genexpression einiger ausgewählter Marker, die bereits in der RT-PCR untersucht worden waren, im Genarray überprüft (Tabelle 18). Außerdem wurden im Array regulierte Gene mittels semiquantitativer RT-PCR getestet (Abbildung 44).

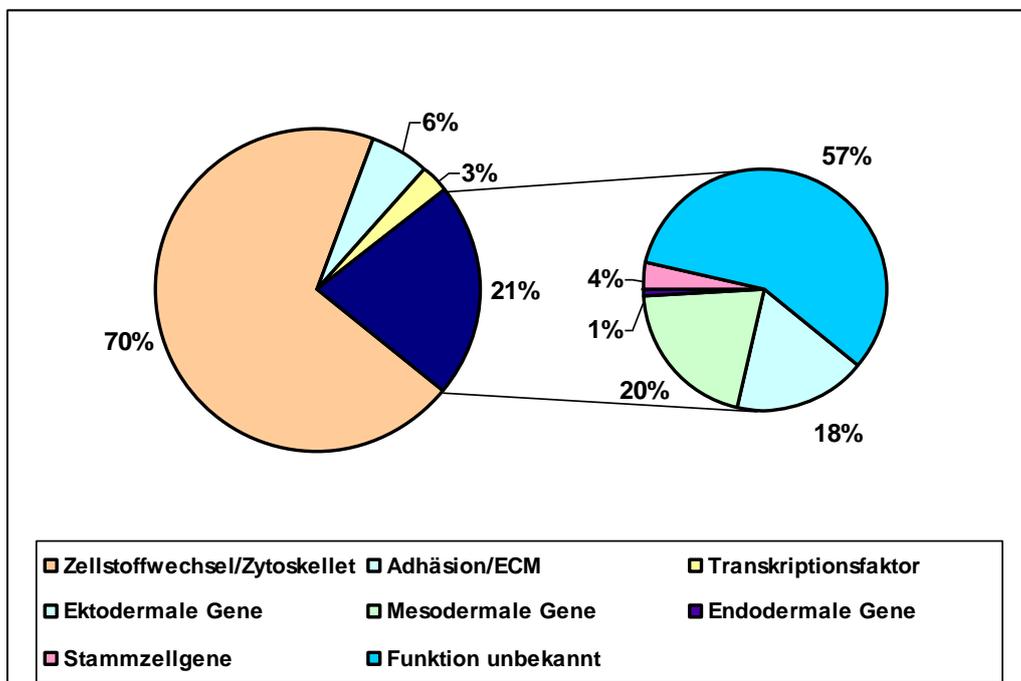
Gen	linearer Mittelwert der Replikate			
	mJ	M1 HG	M1B27	M1 NE
NGFR p75	18	45	20	35
Sox9	62	56	38	44
Nanog	15	15	16	16
GATA3	21	237	32	267
Sox2	16	17	16	18
CK15	14	21	8	15
CK19	2056	49	37	45
CK20	16	28	547	29

**Tabelle 18: Arraydaten einiger bereits mit RT-PCR untersuchter Gene**

Tabelle 18 zeigt, dass die Arraydaten mit den RT-PCR Ergebnissen weitgehend übereinstimmen. In der RT-PCR negative Gene, wie Nanog, Sox2 und CK15 zeigten sehr niedrige Expressionswerte. Die stark positive Genexpression z.B. für NGFR p75 und GATA3 war gleichermaßen im Genarray zu finden.

Wenn die ersten 500 am stärksten exprimierten Gene der M1 Zellen (Kultivierung in HG Medium) untersucht werden, so zeigt sich, dass 70% dieser Gene mit dem Zellstoffwechsel oder der Zellorganisation assoziiert sind. Nur 6% sind an der Adhäsion oder an der extrazellulären Matrix beteiligt und lediglich 3% sind Transkriptionsfaktoren, die nicht mit Prozessen des Zellstoffwechsels in Zusammenhang stehen.

Die anderen 21% der 500 am stärksten exprimierten Gene können weiter in ektodermale (18%), mesodermale (20%), endodermale (1%) und stammzellassoziierte (4%) Gene unterteilt werden (z.B. Midkine (Neurite growth-promoting factor 2), S100A11, Sca-1, Thy1). Die Funktion der restlichen 57% der Gene ist derzeit noch nicht bekannt.



**Abbildung 42: Unterteilung der 500 am stärksten exprimierten Gene der M1 Zellen (HG Medium) nach Funktion und Zuordnung zu den drei Keimblättern**

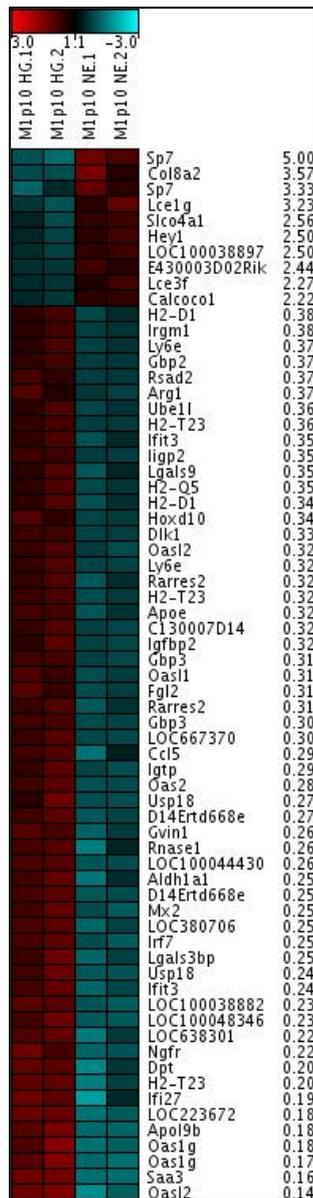
#### 4.5.2 Vergleich der Genexpression der M1 Zellen in Abhängigkeit von den Kulturbedingung und Vergleich mit der Pankreasprogenitorzelllinie mJ

Bei der molekularen Expressionsanalyse mittels Beadarray zeigte sich, dass durch die Kultivierung der M1 Zellen unter Differenzierungsbedingungen eine Reihe von Genen unterschiedlich exprimiert werden. So ergab sich bei 87 Genen eine signifikant unterschiedliche Regulation der Zellen im HG Medium im Vergleich zu den mit Nicotinamid und Exendin 4 stimulierten Zellen (Abbildung 43). Beim Vergleich zwischen den Zellen im HG Medium und den Zellen in B27 Medium waren es 313 Gene (Abbildung 46). Wie zu erwarten, konnten besonders große Unterschiede zwischen den M1 HG Zellen und der Pankreasprogenitorzelllinie mJ erfasst werden. Hier waren 10906 Gene signifikant unterschiedlich reguliert. Um Aussagen über die Funktion der regulierten Gene machen zu können, wurden weiterführende Analysen mit Panther und Bibliosphere durchgeführt.

	FDR 1%	FDR 5%	FDR 10%	heatmap
mJ vs M1HG	6042	8862	10906	FDR 10%, top 60 ratios
M1NE vs M1HG	23	63	87	FDR 10%, top 60 ratios
M1HG vs M1B27	0	84	313	FDR 10%, top 60 ratios

**Tabelle 19: Signifikant unterschiedlich regulierte Gene zwischen den im Beadarray untersuchten Zellen mJ, M1 HG, M1 B27 und den mit Nicotinamid und Exendin 4 stimulieren M1 Zellen (M1 NE). FDR: False discovery rate; 10% bedeutet, dass 10 von 100 signifikanten Ergebnissen falsch positiv sein können**

#### 4.5.2.1 Vergleich der NE stimulierten M1 Zellen mit den in HG Medium kultivierten Zellen



Die Kultivierung der M1 Zellen in Medium mit Nicotinamid und Exendin 4 (NE) führte überwiegend zu einer Herunterregulation von Genen. Davon betroffen sind Gene der Immunregulation (z.B. H2-D1, Irgm1, Ly6e, Gpb2, Rsad2, H2-T23, Ifit3, Iigp2), der Adhäsion (z.B. Arg1, Lgals9), der Neurogenese (z.B. Hoxd10, NGFR p75) und proteolytische Enzyme (z.B. Ube 1l, Usp18).

Am stärksten hochreguliert wird Sp7, ein Zinkfingertranskriptionsfaktor der an der Zellproliferation und Differenzierung beteiligt ist und Col8a2, ein Strukturprotein.

**Abbildung 43:** Die Heatmap zeigt die Expressionswerte (CarmaWeb) der 60 am stärksten zwischen M1 NE und M1 HG regulierten Gene (FDR<10%). Die roten Kästchen bedeuten, dass die Expression mit NE höher ist und die blauen, dass die Expression niedriger ist. Abgebildet sind die Gensymbole und die linearen Ratios (M1 NE versus M1 HG)

Um Informationen zu den Funktionen der regulierten Gene zu erhalten, wurde eine Panther Analyse für die 87 differenziell regulierten Gene (HG medium versus NE Stimulation) durchgeführt.

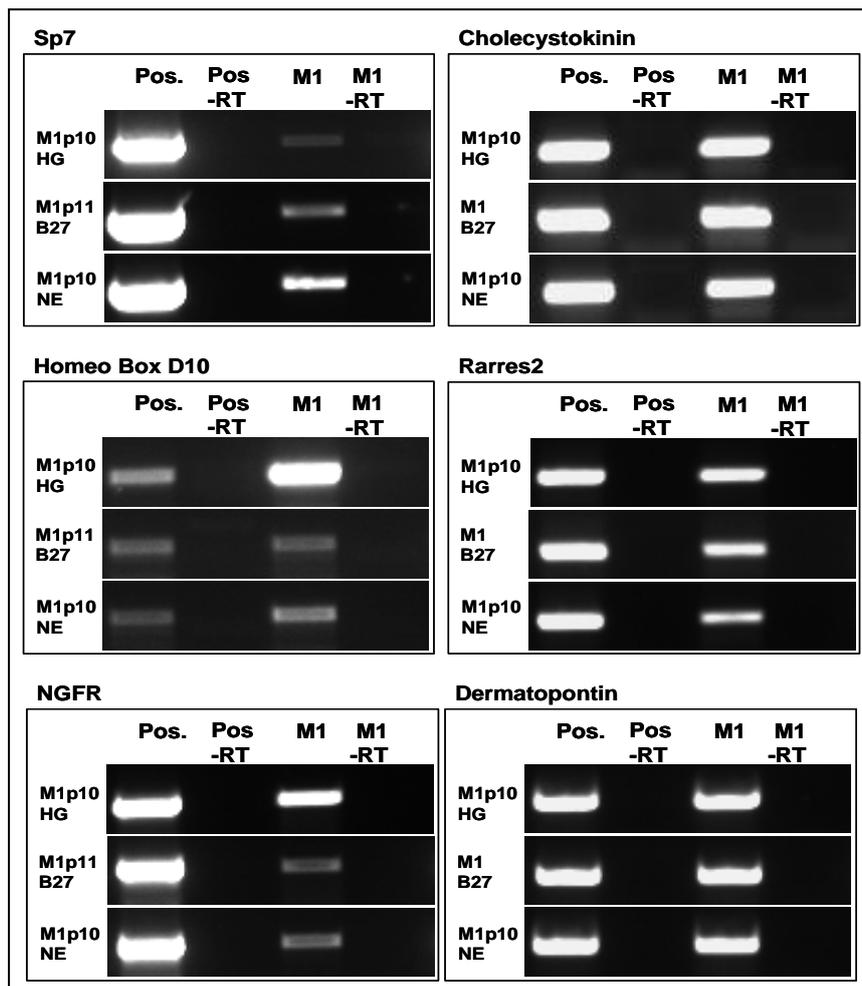
Tabelle 20 sind die Ergebnisse der Analyse zu sehen. Gene, deren Funktion noch unbekannt ist, wurden nicht aufgeführt. Nimmt man alle Gene, deren Funktion im Zusammenhang mit Zellteilung und dem normalen Zellstoffwechsel im Zusammenhang stehen aus der Analyse heraus, sind häufig Gene, die eine Rolle im Immunsystem spielen (gelb hinterlegt) und Gene, die mit neuronaler Differenzierung assoziiert werden (blau hinterlegt), nach Kultivierung der M1 Zellen in Medium mit NE herunter reguliert.

<b>Gen symbol</b>	<b>Panther: Molekulare Funktion</b>	<b>Panther: Biologischer Prozess</b>
AI607873	Other transcription factor	mRNA transcription regulation; Interferon-mediated immunity; Cell proliferation and differentiation
Aldh1a1	Dehydrogenase	Other carbon metabolism
ApoE	Transporter; Apolipoprotein	Lipid and fatty acid transport; Transport
Arg1	Molecular function unclassified	Cell adhesion
Arg1	Other hydrolase	Amino acid catabolism
Cck	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Protein phosphorylation; NF-kappaB cascade; Induction of apoptosis
Cck	Peptide hormone	Ligand-mediated signalling; Muscle contraction
Ccl5	Chemokine	Cytokine and chemokine mediated signalling pathway; Ligand-mediated signalling; Cytokine/chemokine mediated immunity
Cd34	Cell adhesion molecule; Miscellaneous function	Cell adhesion; Hematopoiesis
Col8a2	Extracellular matrix structural protein	Cell structure
Cpxm1	Metalloprotease	Proteolysis
D11Lgp2e	Helicase; Hydrolase	Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism; Apoptosis
D14Ertd668e	Double-stranded DNA binding protein	General mRNA transcription activities
Dcn	Receptor; Extracellular matrix	Cell adhesion-mediated signalling; Skeletal development
Dgkk	Kinase	Lipid metabolism; Other intracellular signalling cascade
Dpt	Extracellular matrix	Extracellular matrix protein-mediated Signalling
Fgl2	Signalling molecule; Extracellular matrix	Extracellular matrix protein-mediated signalling; Angiogenesis
Gbp1	Large G-protein	Macrophage-mediated immunity; Interferon-mediated immunity
Gbp2	Large G-protein	Macrophage-mediated immunity; Interferon-mediated immunity
Gbp3	Large G-protein	Macrophage-mediated immunity; Interferon-mediated immunity
H2-D1	Major histocompatibility complex antigen	MHCI-mediated immunity

<b>Gen symbol</b>	<b>Panther: Molekulare Funktion</b>	<b>Panther: Biologischer Prozess</b>
H2-Q5	Major histocompatibility complex antigen	MHCI-mediated immunity
H2-T23	Major histocompatibility complex antigen	MHCI-mediated immunity
Hap1	Other membrane traffic protein	Other intracellular protein traffic; Synaptic transmission
Hap1	Exodeoxyribonuclease; Endodeoxyribonuclease	DNA repair
Hey1	Basic helix-loop-helix transcription factor; Nucleic acid binding	mRNA transcription regulation; Neurogenesis
Hoxd10	Homeobox transcription factor;	mRNA transcription regulation; Neurogenesis
Ifi27	Molecular function unclassified	Immunity and defense
Ifit3	Miscellaneous function	Interferon-mediated immunity
Igfbp2	Other miscellaneous function protein	Extracellular matrix protein-mediated signalling; Growth factor homeostasis
Irf7	Other transcription factor; Nucleic acid binding	mRNA transcription regulation; Interferon-mediated immunity; Oncogenesis
Lgals3bp	Other receptor	Cell adhesion-mediated signalling; Macrophage-mediated immunity
Lgals9	Other signalling molecule; Other cell adhesion molecule	Cell adhesion; Other immune and defense; Induction of apoptosis
Mx2	Microtubule family cytoskeletal protein; Small GTPase; Other hydrolase	Endocytosis; Transport; Cell structure
NGFR p75	Other receptor	Signalling pathway; NF-kappaB cascade; JNK cascade; Other intracellular signalling cascade; Induction of apoptosis; Neurogenesis
Oas1g	Nucleic acid binding; Synthetase; Nucleotidyltransferase; Defense/immunity protein	Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism; Interferon-mediated immunity; Other metabolism
Oas2	Nucleic acid binding; Synthetase; Nucleotidyltransferase; Defense/immunity protein	Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism; Interferon-mediated immunity; Other metabolism
Oas1l	Nucleic acid binding; Synthetase; Nucleotidyltransferase; Defense/immunity protein	Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism; Interferon-mediated immunity; Other metabolism
Oas12	Nucleic acid binding; Synthetase; Nucleotidyltransferase; Defense/immunity protein	Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism; Interferon-mediated immunity; Other metabolism
Oas12	Nucleic acid binding; Synthetase; Nucleotidyltransferase; Defense/immunity protein	Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism; Interferon-mediated immunity; Other metabolism
Parp14	Nucleic acid binding	Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism
Rnase1	Endoribonuclease; Hydrolase	RNA catabolism
Saa3	Transporter; Apolipoprotein; Defense/immunity protein	Immunity and defense
Slco4a1	Other transporter	Anion transport
Slpi	Serine protease inhibitor	Proteolysis
Sp7	Zinc finger transcription factor	mRNA transcription regulation; Skeletal development; Cell proliferation and differentiation
Ube1l	Other ligase	Protein modification; Proteolysis
Usp18	Cysteine protease	Proteolysis

**Tabelle 20: Pantheranalyse der 87 zwischen M1 NE und M1 HG signifikant regulierten Gene. In gelb sind alle mit Immunantwort assoziierten Gene und in blau sind Gene markiert, die mit neuronalen Differenzierungsprozessen in Zusammenhang stehen**

Bei sechs Genen, die in den drei M1 Zellansätzen im Genarray unterschiedlich reguliert waren, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt, um die Ergebnisse der Arrayanalysen zu verifizieren. Nach der Normalisierung auf den gleichen  $\beta$ -Aktin Gehalt wurde die RT-PCR auf Sp7, Homeobox D10, NGFR p75, Cholecystokinin, Rarres2 und Dermatopontin durchgeführt (Abbildung 44).



**Abbildung 44:** RT-PCR von sechs ausgewählten Genen, die in der Array Analyse unterschiedlich reguliert waren. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription

In der RT-PCR wurden die Ergebnisse des Scans (Tabelle 21) bestätigt. Sp7 wird im Vergleich von M1NE zu M1HG signifikant hoch reguliert. Die Suppression von Cholecystokinin (Cck) ist bei den M1NE Zellen in der RT-PCR nicht deutlich zu sehen, da die Expressionsraten sehr hoch sind. Rarres2 wird im Vergleich von M1NE zu M1HG signifikant herunter reguliert. Homeo Box D10 (Hoxd10), der Nerve growth factor receptor (NGFR p75) und Dermatopontin (Dpt) sind im Array in den M1HG Zellen im Vergleich zu M1NE und M1B27 signifikant höher exprimiert. Die Suppression von Dpt konnte in der RT-PCR nicht bestätigt werden.

Gen	Signifikante Regulation		linearer Mittelwert der Replikate		
	M1B27 vs. M1HG	M1NE vs. M1HG	M1 HG	M1B27	M1 NE
Sp7	n.s.	4,930	21	30	104
Cck	n.s.	0,470	558	763	263
Hoxd10	0,1797	0,336	90	16	30
Rarres2	n.s.	0,307	239	73	74
NGFR p75	0,1258	0,216	163	20	35
Dpt	0,0376	0,205	782	30	169

**Tabelle 21: Daten aus dem Array für die RT-PCR verifizierte Gene. M1 Zellen kultiviert in B27 Medium (M1 B27), Hochglukosemedium (M1 HG) oder Medium mit Nicotinamid und Exendin 4 (M1 NE). n.s.: nicht signifikant**

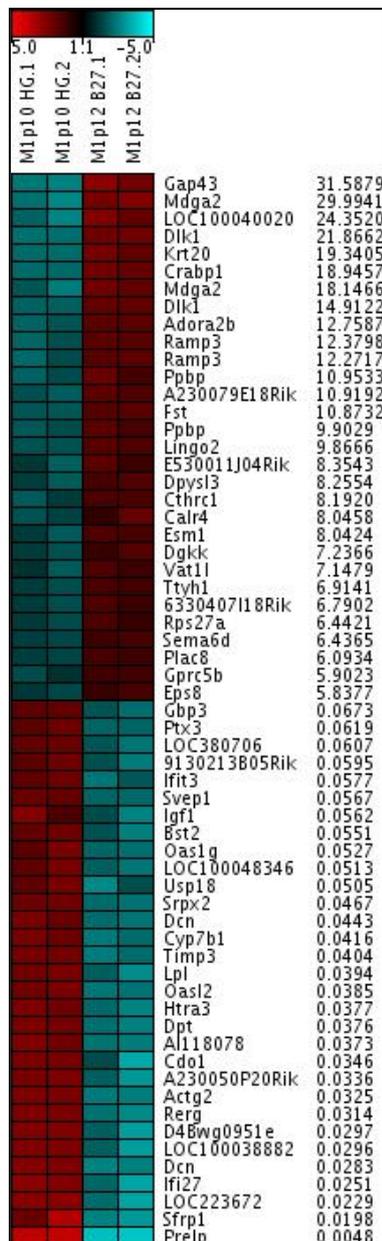
Bei der Bibliosphere Analyse der biologischen Prozesse und molekularen Funktionen der signifikant regulierten Gene (Anhang 7.5 und 7.6) wurden alle Ergebnisse mit einem Z-Score > 1 als signifikant erachtet. Hier zeigte sich neben regulierten Genen des Zellstoffwechsels ebenfalls eine gehäufte Assoziation mit Genen, die Bedeutung besitzen bei der Regulation der Immunantwort und die bei neuronalen Differenzierungsprozessen beschrieben worden waren.

Bei einer Analyse der Transkriptionsfaktoren (Abbildung 45) ergab sich, dass unter den 87 regulierten Genen drei regulierte Transkriptionsfaktoren (Sp7, Irf7 und Hey1) nachweisbar sind, die eine Bindungsstelle im Bereich des Promotors eines der identifizierten Gene besitzen, die in den M1 Zellen unter den hier beschriebenen Stimulationsbedingungen hoch- oder herunter reguliert werden.

Gene	Sp7 (V\$SP1F)	Irf7 (V\$IRFF)	Hey1 (V\$HESF)
DIK1			+
Sp7			+
Usp18		+	
Lgals3bp		+	
Oasl2		+	
Igtp		+	
Rsad2		+	
Ifi27		+	
Ccl5		+	
Apoe	+		
Cd34	+		
Hey1	+		

**Abbildung 45: Transkriptionsfaktoren aus der Analyse der zwischen M1 NE und M1 HG signifikant unterschiedlich regulierten Gene. Mit + sind die Transkriptionsfaktoren (Sp7, Irf7 und Hey1) gekennzeichnet, die eine Bindungsstelle im entsprechenden Genpromotor (linke Spalte) besitzen**

#### 4.5.2.2 Vergleich der in HG Medium kultivierten Zellen mit den in M1 B27 Medium kultivierten Zellen



Bei der Kultur in Medium mit B27 weisen die M1 Zellen eine deutliche Hochregulierung neuronaler Gene (z.B. GAP43, Mdga2, Sema6d), Gene, die mit Immunreaktionen assoziiert sind (z.B. Ppbp, Fst) und von Genen, die an Differenzierungsvorgängen beteiligt sind (z.B. Adora2b, Dpysl3, Cthrc1, Sema6d) auf (Anhang 7.7, 7.8 und 7.9).

Bei anderen immunanwortassoziierten Genen (z.B. Gbp3, Ptx3, Ifit3, Oas1g, Oas12, Cdo1, Ifi27), Genen die mit Differenzierung assoziiert sind (IGF1, Dcn, Sfrp1), wachstumsassoziierten Genen (Htra3, Rerg), Genen der extrazellulären Matrix (ECM) (Dpt, Dcn, Prelp), des Zytoskellets (Actg2) und bei Genen des Fettstoffwechsels (Cyp7b1, Lpl) ist eine Suppression bei Kultur in Medium mit B27 zu beobachten.

**Abbildung 46:** Die Heatmap zeigt die Expressionswerte der 60 (von insgesamt 313) am stärksten regulierten Gene (M1 B27 versus M1 HG, FDR<10%). Die roten Kästchen bedeuten, dass die Expression höher ist und die blauen, dass die Expression niedriger liegt. Abgebildet sind die Gensymbole und die linearen Ratios

### 4.5.3 Analyse ausgewählter Markergene

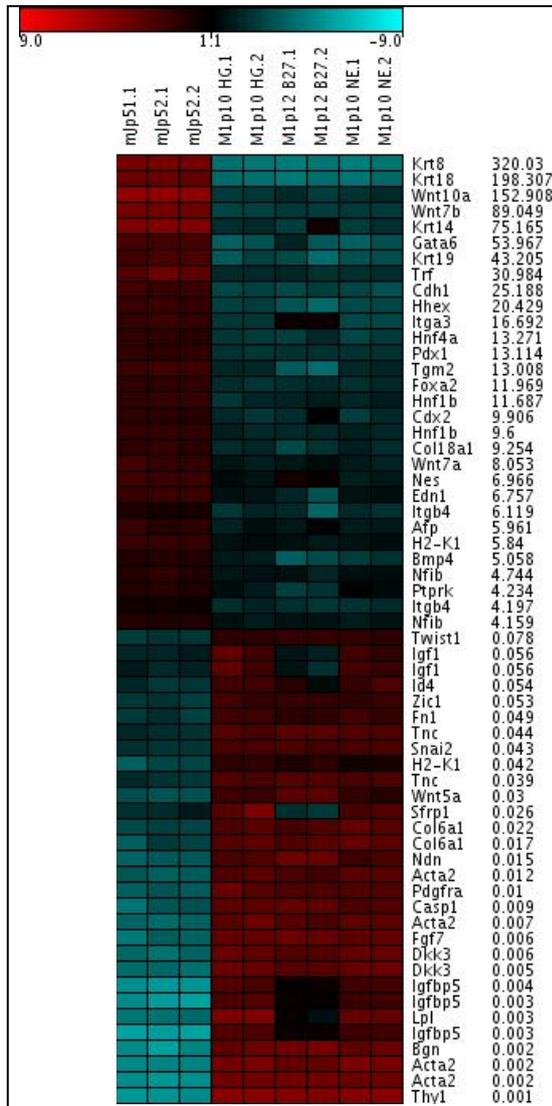
Die oben dargestellten Analysen dienen der allgemeinen Charakterisierung der isolierten Zelllinien. Um jedoch eine Aussage über die Möglichkeit der endodermalen bzw. endokrinen Differenzierung machen zu können, sind gezieltere Analysen nötig. So wurde für das weitere Vorgehen ein Set aus 406 Markergenen ausgewählt, die generell bei Stammzellen bzw. bei Stammzellen aus dem Haarfollikel oder bei Progenitorzellen des Pankreas bzw. der  $\beta$ -Zellen beschrieben worden sind. Außerdem enthält es Gene, die typisch für die Haut oder das Pankreas sind. 384 dieser Gene sind auf dem Array vorhanden und entsprechen 748 Sonden, da diverse Gene mehrfach auf dem Chip vertreten sind.

Da in der vorliegenden Arbeit besonders das endodermale bzw. endokrine Potential der HFSCs von Interesse ist, wurde ein Vergleich mit einer pankreatischen Vorläuferzelllinie mJ angestellt. Von den 384 Markergenen sind 187 in einem Verhältnis  $>2$  reguliert (Anhang 7.10). In der Tabelle 22 sind die 32 am stärksten zwischen M1 HG und mJ differenziell regulierten Gene dargestellt.

SYMBOL	DEFINITION	mJ vs M1HG Ratio
Krt8	Mus musculus keratin 8 (Krt8), mRNA.	320,030
Krt18	Mus musculus keratin 18 (Krt18), mRNA.	198,307
Wnt10a	Mus musculus wingless related MMTV integration site 10a (Wnt10a), mRNA.	152,908
Wnt7b	Mus musculus wingless-related MMTV integration site 7B (Wnt7b), mRNA.	89,049
Krt14	Mus musculus keratin 14 (Krt14), mRNA.	75,165
Gata6	Mus musculus GATA binding protein 6 (Gata6), mRNA.	53,967
Krt19	Mus musculus keratin 19 (Krt19), mRNA.	43,205
Trf	Mus musculus transferrin (Trf), mRNA.	30,984
Cdh1	Mus musculus cadherin 1 (Cdh1), mRNA.	25,188
Hhex	Mus musculus hematopoietically expressed homeobox (Hhex), mRNA.	20,429

SYMBOL	DEFINITION	mJ vs M1HG Ratio
Itga3	Mus musculus integrin alpha 3 (Itga3), mRNA.	16,692
Hnf4a	Mus musculus hepatic nuclear factor 4, alpha (Hnf4a), mRNA.	13,271
Pdx1	Mus musculus pancreatic and duodenal homeobox 1 (Pdx1), mRNA.	13,114
Tgm2	Mus musculus transglutaminase 2, C polypeptide (Tgm2), mRNA.	13,008
Foxa2	Mus musculus forkhead box A2 (Foxa2), mRNA.	11,969
Col6a1	Mus musculus procollagen, type VI, alpha 1 (Col6a1), mRNA.	0,017
Ndn	Mus musculus neudin (Ndn), mRNA.	0,015
Acta2	Mus musculus actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (Acta2), mRNA.	0,012
Pdgfra	Mus musculus platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide (Pdgfra), transcript variant 1	0,010
Casp1	Mus musculus caspase 1 (Casp1), mRNA.	0,009
Acta2	Mus musculus actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (Acta2), mRNA.	0,007
Fgf7	Mus musculus fibroblast growth factor 7 (Fgf7), mRNA.	0,006
Dkk3	Mus musculus dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis) (Dkk3), mRNA.	0,006
Dkk3	Mus musculus dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis) (Dkk3), mRNA.	0,005
Igfbp5	Mus musculus insulin-like growth factor binding protein 5 (Igfbp5), mRNA.	0,004
Igfbp5	Mus musculus insulin-like growth factor binding protein 5 (Igfbp5), mRNA.	0,003
Lpl	Mus musculus lipoprotein lipase (Lpl), mRNA.	0,003
Igfbp5	Mus musculus insulin-like growth factor binding protein 5 (Igfbp5), mRNA.	0,003
Bgn	Mus musculus biglycan (Bgn), mRNA.	0,002
Acta2	Mus musculus actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (Acta2), mRNA.	0,002
Acta2	Mus musculus actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (Acta2), mRNA.	0,002
Thy1	Mus musculus thymus cell antigen 1, theta (Thy1), mRNA.	0,001

**Tabelle 22: Liste von 32 der 187 signifikant regulierten Markergene aus dem Vergleich der M1 Zellen (HG Medium) und der mJ Zellen. Ausgewählt wurden die Gene, deren Expression sich am stärksten unterschied**



Wie in Tabelle 22 und Abbildung 47 dargestellt, sind die Cytokeratine 8/14/18/19, Adhäsionsmoleküle (Cdh, Itga3, Tgm2, Itgb4), Proteine der ECM (Edn1, Col18a1), Gene des Wnt Signallings (Wnt 7a/7b/10a), das stammzellassozierte Gen Nestin, endodermale (GATA6, Trf, Afp) und endokrine Gene (Hhex, HNF4 $\alpha$ , Pdx1, Foxa2, HNF1 $\beta$ ) in den mJ Zellen höher exprimiert.

In den M1 Zellen ist die Expression von neuronalen (Twist1, Id4, Zic1, Ndn) und immunassoziierten (IGF1) Genen, sowie Genen der Adhäsion (Fn1, Tnc) und der ECM (Col6a1, Pdgfra, Bgn) erhöht im Vergleich zu den mJ Zellen. Aber auch Gene des Wnt Signalweges (Wnt5a, Sfrp1, Dkk3), das Insulin-like growth factor binding Protein 5 (Igfbp5), der epitheliale Wachstumsfaktor FGF7, das mesodermale Strukturprotein Acta2 und das stammzellassozierte Gen Thy1 (CD90.2) sind in den M1 Zellen stärker exprimiert.

**Abbildung 47:** Die Heatmap zeigt die Expressionswerte der 60 (von insgesamt 187) am stärksten zwischen den M1 HG Zellen und mJ Zellen unterschiedlich regulierten Markergene (FDR<10%). Die roten Kästchen bedeuten, dass die Expression höher ist und die blauen, dass die Expression niedriger ist. Abgebildet sind die Gensymbole und die linearen Ratios

Von Interesse war ebenfalls, welche Markergene bei beiden aus sehr unterschiedlichen Organen isolierten Stammzellen bzw. Progenitorzellen besonders hoch exprimiert waren. Unter den ausgewählten 748 Sonden zeigten 466 eine hohe Expressionsrate. Unter diesen sind 217 Sonden mit einer Expressionsrate > zwanzig, 83 Sonden mit einer Expressionsrate > fünfzig und 42 Sonden in einem Bereich zwischen 500 und 6955 im Genarray detektierbar.

Gen	linearer Mittelwert der Replikate	
	mJ	M1HG
S100a6	2003	1965
Id1	1797	1799
Ppp3r1	954	713
Dab2	583	632
Sox9	62	56
Bmi1	54	50
Myc	29	34
Ptch1	30	28
Pou5f1	21	23
Kit	16	21

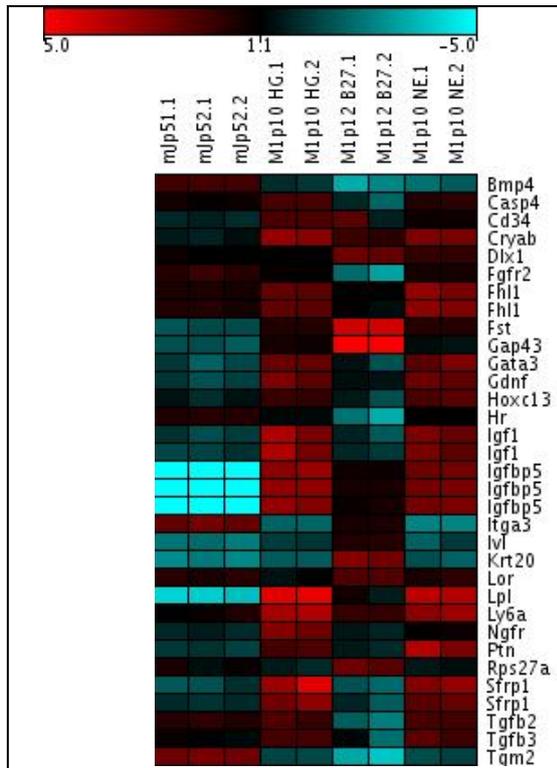
**Tabelle 23: Expressionsraten von stammzellassozierten Genen, die sowohl in der M1 Zelllinie (HG Medium) als auch in den mJ Pankreasprogenitorzellen detektierbar waren**

#### 4.5.3.1 Regulation der Markergene innerhalb der M1 Zellen

Bei der Analyse der 384 Markergene in den M1 Zellen, die unter verschiedenen Zellkulturbedingungen gezüchtet worden sind, waren 33 Gene auffällig, die signifikant unterschiedlich exprimiert wurden.

GEN- SYMBOL	Signifikante Regulation CarmaWeb		Signifikante Regulation Beadstudio		linearer Mittelwert der Replikate		
	M1B27 vs M1HG	M1NE vs M1HG	M1B27 vs M1HG	M1NE vs M1HG	M1 HG	M1B27	M1 NE
Bmp4	n.s.	n.s.	0,036	n.s.	81	20	40
Casp4	n.s.	n.s.	0,116	n.s.	356	55	238
Cd34	n.s.	0,437	n.s.	0,277	97	72	42
Cryab	n.s.	n.s.	0,261	n.s.	2636	736	1977
Dlx1	4,4444	n.s.	n.s.	2,837	60	266	124
Fgfr2	n.s.	n.s.	0,142	n.s.	661	102	833
Fhl1	0,2648	n.s.	n.s.	n.s.	3209	849	5493
Fhl1	0,2543	n.s.	n.s.	n.s.	3194	819	5642
Fst	10,8732	n.s.	n.s.	n.s.	119	1294	126
Gap43	31,5879	n.s.	n.s.	n.s.	53	1701	33
Gata3	n.s.	n.s.	0,057	n.s.	237	32	267
Gdnf	0,1793	n.s.	n.s.	n.s.	148	26	137
Hoxc13	n.s.	n.s.	0,039	n.s.	61	15	89
Hr	n.s.	n.s.	0,021	n.s.	115	19	135
Igf1	0,0562	n.s.	n.s.	n.s.	397	22	237
Igf1	0,0684	n.s.	n.s.	n.s.	373	24	206
Igfbp5	0,1696	n.s.	0,170	n.s.	6786	1145	4270
Igfbp5	0,1892	n.s.	n.s.	n.s.	6421	1215	4435
Igfbp5	0,1864	n.s.	n.s.	n.s.	5266	975	3982
Itga3	5,6557	n.s.	n.s.	n.s.	135	762	87
Ivl	3,5924	n.s.	n.s.	n.s.	46	164	35
Krt20	19,3405	n.s.	n.s.	n.s.	28	547	29
Lor	3,5310	n.s.	n.s.	n.s.	62	220	122
Lpl	0,0394	n.s.	0,034	n.s.	7925	328	4182
Ly6a	0,2003	n.s.	0,180	n.s.	17884	3575	13217
NGFR p75	0,1258	0,216	0,021	n.s.	163	20	35
Ptn	0,2303	n.s.	0,011	n.s.	90	21	285
Rps27a	6,4421	n.s.	n.s.	n.s.	729	4719	890
Sfrp1	0,0198	n.s.	0,006	n.s.	541	10	242
Sfrp1	0,0700	n.s.	n.s.	n.s.	248	18	159
Tgfb2	0,0848	n.s.	0,013	n.s.	245	21	248
Tgfb3	n.s.	n.s.	0,156	n.s.	311	67	355
Tgm2	0,2173	n.s.	0,124	n.s.	194	43	194

**Tabelle 24:** Liste der 33 aus 384 Markergenen in den M1 Zellen, die signifikante Expressionsunterschiede unter verschiedenen Zellkulturbedingungen aufgewiesen haben. n.s.: nicht signifikant



In Tabelle 24 und Abbildung 48 sind die signifikant innerhalb der M1 Zellen regulierten Gene des ausgewählten Markersets zu sehen.

Darunter sind das TGF $\beta$  Familienmitglied BMP4, der HFSC assoziierte Marker CD34 und auch Gene, die in Zusammenhang mit Entwicklungsprozessen stehen (Cryab, FGFR2, Fhl1) in den M1 HG Zellen signifikant hochreguliert. Neuronale Gene werden in den M1 HG Zellen sowohl schwächer (Gdnf), als auch stärker (NGFR p75, Ptn) exprimiert.

**Abbildung 48:** Die Heatmap zeigt den Expressionsvergleich der 33 Markergene, die innerhalb der drei unterschiedlich stimulierten M1 Zellen eine signifikante Regulation zeigten (FDR<10%). Die roten Kästchen bedeuten, dass die Expression im Vergleich zu den mJ Zellen höher ist und die blauen, dass die Expression niedriger ist. Abgebildet sind nur die Gensymbole

In den mit B27 kultivierten M1 Zellen sind Gene hochreguliert, die Differenzierungsvorgänge steuern (Dlx1, Fst), neuronale Gene (Gap43), und Adhäsionsmoleküle (Itga3, Iv1). Außerdem wird Cytokeratin 20 und das Gen für das epidermale Protein Loricrin, das in der Haut in den Zellen der terminal differenzierten Körnerschicht exprimiert wird (Trempeus et al. 2003) in B27 Medium hochreguliert. Die im Haarfollikel exprimierten Gene GATA3, Hoxc13, Hr, Igf1, Igfbp5 und TGF $\beta$ , sowie der Stammzellfaktor Ly6a (Sca-1) sind supprimiert.

### 4.5.3.2 Subanalyse der Markergene

Im Set „Markergene“ sind Gene zusammengefasst, die aufgrund ihrer Funktion von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit sind. Im Anhang 7.11 und 7.12 sind die wichtigsten der Markergene (Priorität 1 und 2) mit ihrer Zugehörigkeit aufgelistet (z.B. Endoderm, Ektoderm, Cytokeratine, Wnt-Signalling, Inselzellen).

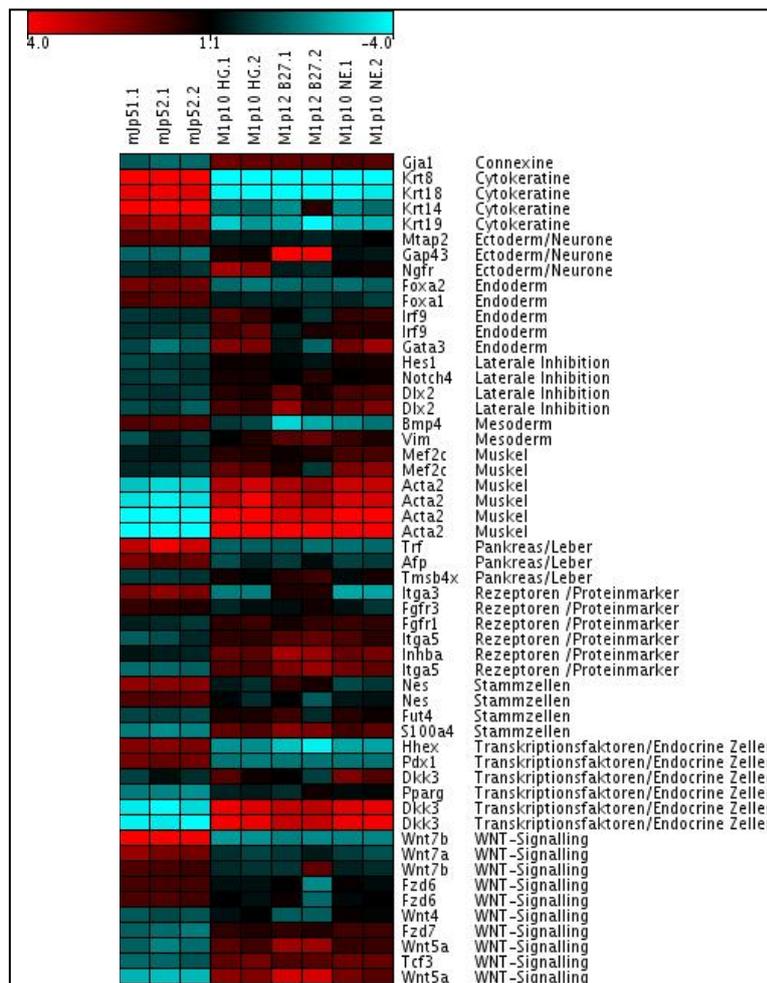
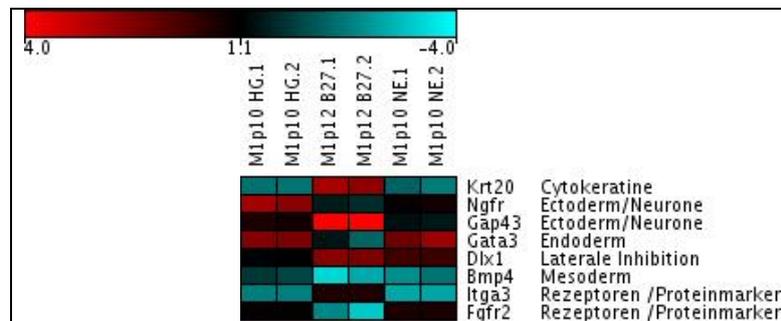


Abbildung 49 und Anhang 7.13 zeigen die signifikanten Unterschiede in der Regulation, der wichtigsten Markergene. Die Cytokeratine 8/14/18/19, die endodermalen Marker Foxa2, Trf und Afp, die endokrinen Marker Hhex und Pdx1, das TGFβ Mitglied Bmp4, das Integrin alpha 3 und das stammzellassoziierte Neurofilament Nestin werden in den mJ Zellen stärker exprimiert. Das neuronale Protein Gap43 wird am stärksten von den M1 B27 Zellen exprimiert.

**Abbildung 49:** Die Heatmap zeigt die Expressionswerte signifikant regulierter Markergene (FDR<10%). Dargestellt sind die zwischen M1 HG und mJ signifikant regulierten Gene mit einem Quotienten >2. In rot sind die Gene, die stärker exprimiert werden und in blau diejenigen, die schwächer exprimiert werden. Neben den Gensymbolen ist die Zuordnung angegeben

Bei allen M1 Zellen sind das Connexin Gja1, das mesodermale Strukturprotein Acta2, das Integrin alpha 5, der Wnt Inhibitor Dkk3 und der Stammzellmarker S100a4 höher reguliert als in den mJ Zellen.

Die Analyse der Genexpression der M1 Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen zeigt, dass unter den Markergenen bei den M1 B27 Zellen das Cytokeratin 20, Gap43, Dlx1 und das Integrin alpha 3 am stärksten und NGFR p75 am schwächsten exprimiert wird (Abbildung 50 und Anhang 7.13).



**Abbildung 50: Heatmap der innerhalb der M1 Zellen signifikant regulierten Markergene mit einem Quotienten >2. In rot sind die Gene, die stärker exprimiert werden und in blau diejenigen, die schwächer exprimiert werden**

## 5 Diskussion

Die Gewinnung von multipotenten adulten Stammzellen stellt eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung von Zellersatztherapien mit autologen Zellen dar. In der Haut und ihren Anhangsgebilden, besonders in der Wulstregion von Haarfollikeln wurden bereits verschiedene Populationen multipotenter Stammzellen nachgewiesen. Bisher wurde aus diesen die Generierung von Hautzellen (Taylor et al. 2000, Blanpain et al. 2004, Tumber et al. 2004, Ito et al. 2005), ganzen Haarfollikeln (Oshima et al. 2001, Morris et al. 2004, Claudinot et al. 2005,), Melanozyten, Adipozyten, Chondrozyten, Neuronen und glatten Muskelzellen beschrieben (Jahoda et al. 2003, Fernandes et al. 2004, Amoh et al. 2005, Medina et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Population von Zellen aus dem Haarfollikel von Mäusen isoliert, die eine Reihe von typischen Stammzellenmarkern exprimiert und multipotente Eigenschaften besitzt. Die Charakterisierung mittels RT-PCR und FACS Analyse lässt vermuten, dass die Zellen einen intermediären Phänotyp zwischen epithelialen und neuroektodermalen Progenitorzellen aufweisen. Da endokrine Zellen auch Merkmale von neuroektodermalen Zellen aufweisen (z.B. Expression des Amine Precursor Uptake and Decarboxylation [APUD] System), stellt diese in der vorliegenden Arbeit beschriebene neue Population von Stammzellen eine Zellquelle dar, die besonders interessant ist für die Generierung von endokrinen Zellen. Die molekularen Signale für die Transdifferenzierung von Stammzellen in endokrine Zellen oder  $\beta$ -Zellen sind allerdings bisher weitgehend unbekannt.

### 5.1 Isolierung der Stammzellen

Erstes Ziel der Arbeit war es, eine neue Methode im Labor zu etablieren, mit der reproduzierbar Progenitorzellen/Stammzellen aus murinen Haarfollikeln isoliert werden können. Ausgehend von publizierten Protokollen für die Gewinnung von Stammzellen aus dem Haarfollikel und anderen Geweben wurde eine Auswahl von Medien und Trägermatrices überprüft und durch die Supplementierung mit einzelnen Wachstumsfaktoren neue Kultivierungsbedingungen getestet.

Es konnte bestätigt werden, dass die effektivste Art der Isolierung von Haarfollikelzellen ein Verdau der Haut in Dispase (für 22-28 Stunden) mit anschließender Trypsinbehandlung darstellt. Bei der Austestung des Kulturmediums erbrachte das Protokoll von Amoh et al. (2005) die besten Resultate. Ebenfalls gute Langzeitkulturergebnisse wurden mit dem DMEM high glucose Medium und 5% FKS erzielt. Wie zu erwarten war, wurde in der Primärkultur jeweils eine Mischung unterschiedlicher Zelltypen beobachtet. In den meisten Versuchen veränderte sich die Zellmorphologie zunehmend, so dass innerhalb der ersten 4-8 Passagen ein stabiler Phänotyp zu verzeichnen war. An dieser Stelle soll betont werden, dass die drei beschriebenen Zelltypen in der Primärkultur, in mehreren unabhängigen Experimenten von zwei verschiedenen Mauslinien gewonnen werden konnten. Um vollständig definierte Kulturbedingungen, mit möglichst wenig differenzierungsstimulierenden Faktoren zu erhalten, wurde auch die serumfreie Kultivierung überprüft. Dies hat jedoch keinen Erfolg erbracht, so dass - wahrscheinlich bisher nicht identifizierte- Faktoren im FKS wichtig für die primäre Expansion der Zellen sind. In einem Langzeitkulturexperiment wurden die M1 Zellen bis zu 113 Passagen kultiviert, ohne dass im von uns getesteten Markerprofil Unterschiede zu verzeichnen waren. Die M1 Zellen besitzen somit ein wichtiges Merkmal von Stammzellen, die Eigenschaft zur Selbsterneuerung und ein hohes proliferatives Potential.

In den vorliegenden Versuchen wurde keine Klonierung der Zellen auf Einzellebene durchgeführt. Obwohl in den FACS Analysen keine unterschiedlichen Zellpopulationen aufgefallen sind, kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass auch in der Langzeitkultur unterschiedliche Zellklone koexistieren. Dies ist wichtig für die Interpretation der Experimente zur Zellcharakterisierung und Differenzierung.

## **5.2 Charakterisierung der isolierten Stammzellen**

Im Bereich der Haut und ihren Anhangsgebilden wurden von mehreren Arbeitsgruppen verschiedene Typen von Stammzellen vorgestellt (Reynolds und Jahoda 1991, Kobayashi et al. 1993, Lyle et al. 1998, Cotsarelis et al. 1990, Oshima et al. 2001, Toma et al. 2001, Liu et al. 2003, Trempus et al. 2003, Blanpain et al. 2004, Fernandes et al. 2004, Ito et al. 2004, Morris et al. 2004, Roh et al. 2004, Sieber-Blum et al. 2004, Tumber et al. 2004, Amoh et al. 2005, Selleri et al. 2005, Yano et

al. 2005, Hu et al. 2006, Medina et al. 2006, Yu et al. 2006, Zhang et al. 2006). Ein spezifischer Marker für adulte Stammzellen existiert bisher nicht. In den neu generierten Zelllinien wurde deshalb mittels RT-PCR, Durchflusszytometrie und Beadarray die Expression charakteristischer Transkriptionsfaktoren, Oberflächenmarker und Komponenten des Zytoskeletts analysiert, die entweder bei Haut- und Haarfollikelstammzellen oder Pankreasprogenitorzellen spezifisch exprimiert oder dort im Vergleich zu anderen Geweben überexprimiert werden.

Bei der Analyse der Expressionsmuster fanden sich in den M1 Zellen keine typischen Marker für embryonale Stammzellen (Oct4, Nanog, SSEA-1, SSEA-4) aber eine hohe Expression von Adhäsionsmolekülen. Die Integrine  $\beta 1$  und  $\alpha 6$ , sowie NCAM, der Hyaluronsäurerezeptor CD44 und das Transmembranmolekül CD9 waren in den M1 Zellen positiv. Da Stammzellen meist in einer Nische residieren (Watt et al. 2000) ist es plausibel, dass Adhäsions- und Migrationsmoleküle exprimiert und Faktoren der extrazellulären Matrix produziert werden (Jones und Watt 1993, Li et al. 1998, Lyle et al. 1998, Fernandes et al. 2004, Roh et al. 2005, Medina et al. 2006, Zhang et al. 2006, Guo et al. 2009). CD9 wurde außerdem 2002 von Oka et al. als Marker für ESCs vorgeschlagen. Das Integrin  $\beta 1$  wird im HF von basalen und suprabasalen Keratinozyten exprimiert,  $\alpha 6$  Integrin jedoch nur von Zellen der Basalschicht. Dies lässt vermuten, dass die M1 Zellen aus der basalen Zellschicht stammen.

Neben den Adhäsionsmolekülen sind die neuronalen Marker Nestin und NGFR p75 in der RT-PCR sehr stark positiv. Nestin, ursprünglich ein Marker für neurale Progenitorzellen, ist bei Zellen der Haarfollikelwulstregion sowohl im Telogen, als auch im Anagen primär in der ORS der Wulstregion und nicht im Bulbus lokalisiert (Li et al. 2003). Für Nestin positive Zellen aus der Wulstregion konnten bereits multipotente Eigenschaften nachgewiesen werden. Durch Gabe von Differenzierungsfaktoren konnten aus diesen Zellen Neuronen, glatte Muskelzellen und Melanozyten hergestellt werden (Amoh et al. 2005). Unter den stammzellassozierten Genen wurden von den M1 Zellen BCRP1, GATA3 und Sca-1 zu jedem Zeitpunkt sehr stark exprimiert. Der ATP-Binding Casette Transporter BCRP1 (ABCG2 beim Menschen) ist ein Marker für Side Population Zellen (Hoechst 33342 negative Zellen) des Knochenmarks, der Muskulatur und adulter Stammzellen des Pankreas (Zhou et al. 2001, Lechner et al. 2004). Im HF ist eine Koexpression von BCRP1 mit anderen Stammzellmarkern und die Lokalisation der BCRP1 exprimierenden Zellen in der Basalschicht und der Wulstregion bekannt (Waters et

al. 2007). Der Transkriptionsfaktor GATA3 wurde ursprünglich als essentieller Faktor für die Differenzierung von T-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen beschrieben. GATA3 spielt vermutlich aber auch eine wichtige Rolle bei Differenzierungsabläufen im Haarfollikel, da Mutationen im GATA3-Gen zu Defekten der IRS führten (Kaufman et al. 2003, Morris et al. 2004). Das Stammzellantigen Sca-1 ist ein etablierter Marker für die Anreicherung muriner, hämatopoetischer und mesenchymaler SC aus dem Knochenmark (Patterson et al. 2000). Eine Population ruhender Sca-1-positiver, für CD34 und c-kit (CD117) negativer Zellen wurde in der Haut bereits dokumentiert (Wolnicka-Glubisz et al. 2005). Allerdings unterscheiden sich diese Zellen von den hier beschriebenen HFSC, denn diese exprimieren auch CK14. Außerdem sind die M1 Zellen mit 7-9% lediglich schwach positiv für CD34. CD34 gilt als Marker der LRCs (in der Maus, nicht beim Menschen) und weist eine Korrelation mit CK15 auf. Da CD34 aber auch in niedriger Konzentration bei differenzierten Zellen vorkommen kann, ist es allein nicht zur Isolierung von HFSC geeignet. Aus diesem Grund wird seit 2004 für die Identifizierung der Wulststammzellen zusätzlich CD200 verwendet (Blanpain et al. 2004, Morris et al. 2004, Rosenblum et al. 2004, Amoh et al. 2005, Claudinot et al. 2005, Cotsarelis 2006). Beide Oberflächenmoleküle waren bei den Typ 1 Zellen in der FACS Analyse zwar nur schwach nachweisbar, jedoch machten diese auch in vorangehenden Arbeiten weniger als 10% der isolierten Zellen aus (Trempeus et al. 2003, Wolnicka-Glubisz et al. 2005).

Erstmals wurde in dieser Arbeit die hohe Expression des hämatopoetischen Markers CD90.2 und der epithelialen Marker CD105 und CD106 dokumentiert. Im Bereich der Cytokeratine waren die isolierten Zellen stark positiv für CK7, CK18, CK19 und CK20. Die letzten drei Cytokeratine werden auch von Merkelzellen im HF und von den dermalen DEEP-1 Zellen exprimiert (Medina et al. 2006, Yu et al. 2006). CK19-positive Zellen sind in der ganzen Basalschicht der ORS vom Wulst bis zum Bulbus zu finden (Trempeus et al. 2003, Zhang et al. 2006). CK19 wurde auch als Marker für HFSC der basalen ORS diskutiert (Lyle et al. 1998, Botchkarev und Paus 2003). Der erste Schritt der Differenzierung basaler Keratinozyten der interfollikulären Epidermis ist der Übergang in die suprabasale Stachelzellschicht. Damit ist die Herunterregulation der Expression von CK5 und CK14 und der Expressionsbeginn von CK1 und CK10 verbunden (Fuchs und Green 1980). Die Expression dieser Cytokeratine war in den M1 Zellen nicht nachweisbar.

Das Keratin CK7 wird auch in undifferenzierten Zellen der Talgdrüse exprimiert (Lo Celso et al. 2008). Es wurde gezeigt, dass BLIMP1 (c-Myc Repressor) positive Zellen unipotente Progenitorzellen sind, die die ganze Talgdrüse wiederherstellen können und sich am Verbindungsstück von Talgdrüse und Haarfollikel befinden (Waters et al. 2007, Lo Celso et al. 2008). Da die M1 Zellen BLIMP1 nicht stärker exprimieren, als die mJ Zellen (Daten aus Array; nicht abgebildet) ist jedoch davon auszugehen, dass es sich bei den M1 Zellen nicht um Talgdrüsenvorläuferzellen handelt.

CK15 wird über den Wnt Signalweg induziert und wurde 1998 von Lyle als spezifischer Marker der Wulstregion identifiziert, da es in der restlichen ORS nicht exprimiert wird. Für CK15 positive Zellen konnte gezeigt werden, dass sie in verschiedene Zelltypen differenzieren (Morris et al 2004, Amoh et al. 2005, Cotsarelis 2006, Ohyama et al. 2006). Liu et al. (2003) stellten jedoch fest, dass das Muster der CK15 Expression und die CK15 Promotoraktivität sich mit dem Alter verändern und die aus den SC entstehenden Zellen CK15 nicht mehr exprimieren. Auch in vitro behalten die SC nur eine geringe CK15 Expression, so dass dieser Marker primär für in vivo Markierungen zu verwenden ist (Roh et al. 2005). Im Genarray war CK15 in den M1 Zellen im Vergleich zu den mJ Zellen zwar signifikant höher exprimiert, aber die Expressionsrate war immer noch so gering, dass es in der RT-PCR nicht nachweisbar war. Ob dies an der in vitro Kultur liegt, oder daran, dass die Zellen schon zu TA Zellen differenziert sind, kann anhand der vorliegenden Daten nicht entschieden werden. CK15 negative und CK18/CK19/CK20 positive Zellen, wie die M1 Zellen dieser Arbeit, könnten frühe Progenitorzellen (sogenannte Transit-Amplifying Zellen) darstellen (Lyle et al. 1998).

Nicht ganz so stark, wie die oben dargestellten Gene waren die Marker Lhx2, S100a4 und Sox9 positiv. Lhx2 wird die Funktion zugeschrieben im Follikel die Signale der epidermalen Differenzierung zu unterdrücken und damit den Stammzellstatus zu erhalten, weshalb es auch schon als HFSC Marker vorgeschlagen wurde (Rhee et al. 2006, Fuchs 2008). S100a4 gehört zu einer Familie Kalzium bindender Proteine und ist im Beadarray im Vergleich zu den mJ Zellen bei den M1 Zellen höher reguliert. Es wird mit ruhenden und undifferenzierten Zellen assoziiert und ist bei den differenzierteren Matrixzellen des HF nicht mehr anwesend (Ito et al. 2004, Morris et al. 2004). Der Transkriptionsfaktor Sox9 spielt nicht nur eine essentielle Rolle für die Entwicklung der ORS (Vidal et al. 2005), sondern auch für den Erhalt des endokrinen Stammzellpools im Pankreas (Seymour 2007).

Studien zeigten, dass durch die Abschaltung der Expression von Sox9 in der Haut, die CD34 Expression abnahm und es in der Folge zu einem Haarzyklusarrest aufgrund der geschädigten SC kommt (Vidal et al. 2005).

Aus dem Expressionsprofil der M1 Zellen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Zellen epitheliale Zellen darstellen, die zusätzlich Charakteristika von neuroektodermalen Zellen aufweisen. Interessant ist ein Vergleich der M1 Zelllinie mit den bisher in der Literatur beschriebenen Progenitorzellen und Stammzellen in der Haarfollikelregion.

Aus der Haut wurden Nestin positive, multipotente skin derived precursor (SKP) Zellen aus der dermalen Papille und mesenchymale Stammzellen (MSC) isoliert (Toma et al. 2001, Fernandes et al. 2004, McKenzie et al. 2006, Lorenz et al. 2008). Obwohl die hier isolierten Zellen IGF1 und FGF7 produzieren, welche auch von der dermalen Papille sezerniert werden (Paus und Cotsarelis 1999), sind sie negativ für charakteristische mesenchymale Marker (Brachyury, Vimentin, CD73). In der äußeren Wurzelscheide des Mausbartfollikels, im Bereich der Wulstregion bis zur Matrix am Bulbus, wurden pluripotente epidermale SC mit Neuralleistenursprung (EPI-NCSC) isoliert (Sieber-Blum et al. 2004, Hu et al. 2006). Diese Zellen exprimieren ebenfalls Nestin, aber sind wie die SKPs und die Haut-MSCs Cytokeratin negativ. Die dermis derived epidermalen Progenitorzellen (DEEP-1) exprimieren zwar die Cytokeratine 18 und 19 jedoch nicht Nestin und BCRP1 (Medina et al. 2006).

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den in der vorliegenden Arbeit generierten M1 Zellen um neuroektodermale Progenitorzellen/Stammzellen aus der Region des Haarfollikels handelt. Diese Population Nestin und Cytokeratin positiver Haarfollikelzellen wurde erstmals in der vorliegenden Arbeit beschrieben (Nath et al. 2011). Zu berücksichtigen ist, dass Unterschiede im Ausgangsgewebe, Speziesdifferenzen und unterschiedliche Isolierungs- und Kultivierungsbedingungen dazu beitragen könnten, dass sich Variationen im Expressionsprofil einzelner Marker im Vergleich zu den in vorangehenden Studien beschriebenen Stammzellen zeigen. Zur weiteren Charakterisierung der M1 Zellen wurden Genarrayanalysen durchgeführt.

### 5.3 Genexpressionsprofil der Typ 1 Zellen

Für die Erstellung des molekularen Profils der M1 Zellen wurden drei verschiedene Kulturbedingungen analysiert. Eine Langzeitkultur in HG Medium mit 5% FKS (Basalkultur), eine Langzeitkultur mit B27 Medium (proneuronale Bedingungen) und ein Differenzierungsansatz mit Nicotinamid und Exendin 4 (NE) (proendokrine Bedingungen). Zusätzlich wurde das Expressionsprofil der M1 Zellen mit einer Pankreasstammzelllinie (mJ) verglichen.

Zwischen den mJ und den M1 HG Zellen waren 10906 Gene signifikant unterschiedlich reguliert. Bei Betrachtung von 406 ausgewählten Genen, die bei Stammzellen und endokrinen Progenitorzellen exprimiert werden, zeigte sich wie erwartet, dass die mJ Zellen endodermale Marker, wie z.B. Pdx1 und Hepatocyte Nuclear Factors 4 $\alpha$ , -1 $\beta$  und -3 $\beta$ , deutlich stärker exprimieren. In den M1 Zellen waren 30 Transkripte signifikant im Vergleich zu den mJ Zellen erhöht. Unter diesen sind die Gene besonders interessant, die an der Neurogenese beteiligt sind (Twist1, Id4, Zic1, Ndn) und Gene des Wnt Signalweges (Wnt5a, Sfrp1, Dkk3). Mit dem Genarray wurden auch Gene identifiziert, die in beiden Stammzelltypen besonders hoch exprimiert waren. In der Literatur beschriebene stammzellassoziierte Gene waren S100a6 und Sox9. Außerdem Id1, welches von BMP2 induziert wird, und sowohl eine Rolle in der Regulation von Haarzellen, als auch im adulten und entstehenden Pankreas spielt (Jones et al. 2006, Hua und Sarvetnick 2007). Ein weiterer detektierter Marker war die Proteinphosphatase Ppp3r1, die an der Transition von epithelial zu mesenchymal beteiligt ist (Chang et al. 2004). Desweiteren wurde Dab2 nachgewiesen, welches wichtig ist für viele Differenzierungsvorgänge, wie die Entwicklung des Endoderms und des Nervensystems (Cheung et al. 2008, Yang et al. 2009). Das chromatinbindende Protein Bmi1, das als Marker für eine Subpopulation von Azinuszellen verwendet wird, aber auch eine Rolle bei der Proliferation und Entwicklung neuronaler Progenitorzellen inne hat, war vermehrt in den den M1 Zellen exprimiert (Fasano et al. 2007, Sangiorgi und Capecchi 2009).

Die Unterschiede zwischen den beiden Langzeitkulturen in hoher Glukosekonzentration oder B27 Supplementierung (HG und B27) waren größer (313 regulierte Gene) als die zwischen den basalen (HG) und den mit Nicotinamid und Exendin 4 (NE) stimulierten M1 Zellen (87 regulierte Gene).

Bei den mit NE stimulierten Zellen kam es zu einer Herunterregulierung von Genen der Immunregulation, Adhäsion und Neurogenese, während Gene der Differenzierung und Proliferation höher exprimiert waren. Letzteres entspricht den Erwartungen an einen Differenzierungsansatz. Aufgrund der vorhergehenden RT-PCR Ergebnisse wurde insbesondere die Hochregulierung endokriner Transkriptionsfaktoren untersucht. Eine signifikante Änderung dieser Faktoren war aber nicht zu beobachten. Der Zinkfingertranskriptionsfaktor Sp7 wird nach der Stimulation am stärksten hochreguliert. SP7 ist an der Modulation der Gene für das Fettsäuretransportprotein Apoe und des Neurogenesetranskriptionsfaktors Hey1 beteiligt und führt in diesem Ansatz zu einer Herunterregulierung des HFSC Markergens CD34. Es ist jedoch noch unbekannt, welche zusätzlichen Faktoren durch SP7 reguliert werden.

Beim Vergleich zur Langzeitkultur in B27 Medium waren bei den M1 Zellen in HG Medium und bei der Stimulation mit NE Gene der Differenzierung und Proliferation gesteigert exprimiert und stammzellassoziierte Gene (Sca-1) herunter reguliert. Zusätzlich war eine deutliche Hochregulierung immunassoziiertes und neuronales Gene (besonders Gap43) zu sehen. Dies gab die ersten Hinweise, dass die M1-Zellen in neuronale Zellen ausreifen können. Dieser Befund ist bestens vereinbar mit vorangehenden Arbeiten, die berichtet haben, dass die Stammzellen des HF bevorzugt in neuronale Zellen differenzieren (Fernandes et al. 2004, Amoh et al. 2005, Yu et al. 2006). Warum in den M1 Zellen eine Reihe von Genen differenziell exprimiert werden, die bisher vor allem bei der Regulation der Immunantwort beschrieben worden sind, bleibt unklar. Möglich ist, dass diese Faktoren, wie es z.B. bei GATA3 beschrieben worden ist, eine viel größere Rolle auch bei anderen Differenzierungsprozessen spielen. Hier müssen sicherlich noch weitere Experimente durchgeführt werden, um deren Funktion bei den M1 Zellen aufzuklären. Mit den Genarray Daten wurde die Grundlage geschaffen die M1-Zellen genau zu charakterisieren. Da die Expression auf mRNA Ebene nicht gleichzusetzen ist mit einer Proteinexpression und funktioneller Bedeutung, ist der nächste Schritt der Nachweis interessanter Transkripte durch FACS Analyse, Immunhistochemie oder Western-Blotting. Diese Untersuchungen gingen aber über die Grenzen der vorliegenden Promotionsarbeit hinaus und sollen in einer nachfolgenden Arbeit untersucht werden.

## 5.4 Multipotenz der isolierten Stammzellen

Nach der Zellphänotypisierung und Charakterisierung wurde die Multipotenz der isolierten Haarfollikelzellen, als wichtiges Charakteristikum von Stammzellen untersucht. Verwendet wurden publizierte Protokolle zur Herstellung von Adipozyten, Sebozyten, Chondrozyten, Osteoblasten, Muskelzellen und Neuronen.

Die Typ 2 und Typ 3 Zellen waren in keinem der Versuche zur Differenzierung fähig, so dass in diesen Ansätzen wahrscheinlich Zellpopulationen isoliert worden sind, die entweder bereits vordifferenziert waren oder nur oligopotente Eigenschaften aufweisen.

Zellen von Typ 1 zeigten eindeutig multipotente Eigenschaften. Mit einer Oil Red O Färbung konnte überzeugend eine fast vollständige Differenzierung in Adipozyten nachgewiesen werden. Der Sebozytendifferenzierungsansatz zeigte eine deutliche Sebumbildung, das durch kleine zytoplasmatische Fetteinschlüsse charakterisiert war. Der Rückgang der CK7 Expression nach der Differenzierungsphase kann als zusätzlicher Hinweis auf die Differenzierung in Sebozyten gewertet werden. In der Alcianblaufärbung wurde die Generierung einer proteoglykanreichen extrazellulären Chondrozytenmatrix dokumentiert. Die Differenzierung der M1 Zellen in Osteoblasten ist nicht gelungen. In der von-Kossa Färbung fand sich lediglich vereinzelt eine Mineralisierung von Knochenmatrix. Die M1 Zellen scheinen die Fähigkeit der Osteoblasten-/Knochenbildung nicht zu besitzen.

Die Ansätze zur Generierung von Muskelzellen und Neuronen haben in beiden Fällen zu einer eindeutigen Änderung der Zellmorphologie und Expression von spezifischen Markern geführt. Der immunhistologische Nachweis mit monoklonalen Antikörpern gegen  $\beta$  III Tubulin, einem frühen Differenzierungsmarker für Neurone, und des Intermediärfilaments Desmin, einem Marker von Muskelzellen, zeigte dies eindrucksvoll. Somit sind die Zellen in der Lage ektodermale (Sebozyten, Neuronen) und mesodermale (Adipozyten, Chondrozyten, Muskelzellen) Zelltypen zu bilden. Dieser Nachweis der Multipotenz kann als klarer Beweis für die Stammzellnatur der Typ 1 Zellen gewertet werden.

In der vorliegenden Arbeit war es von besonderem Interesse zu prüfen, ob die M1 Zellen auch in der Lage sind in endodermale oder sogar endokrine Zelltypen auszureifen. Rückschlüsse auf das Transdifferenzierungspotential der Haarfollikelzellen in Insulin produzierende  $\beta$ -Zellen wurden in 71 Differenzierungsansätzen unter Verwendung von teils publizierten, teils selbst konzipierten Kulturbedingungen untersucht. Analysiert wurde ein Gruppe von Markergenen für die verschiedenen Entwicklungsstadien von endodermalen Zellen, endokrinen Progenitorzellen und reifen Inselzellen, die aus Studien der Embryonalentwicklung des Pankreas oder der Differenzierung von embryonalen Stammzellen bekannt sind.

Da die oben beschriebene Charakterisierung die neuroektodermale Natur der Typ 1 Zellen offenbart hatte, wurden Versuche zur Differenzierung in endodermale Zellen durchgeführt. In der Langzeitkultur mit B27 und bFGF konnte durch den Zusatz von FGF10 und Cyclopamin eine schwache Expression von HNF3 $\beta$ , HNF4 $\alpha$  und des Transkriptionsfaktors Isl1 erreicht werden. Sehr überraschend war die starke Expression des Transkriptionsfaktors MafB, der beteiligt ist an der Regulation der Genexpression von Insulin in der  $\beta$ -Zelle (Wang et al. 2007, Vanhooose et al. 2008). Dieser Befund stimmte sehr optimistisch, dass es tatsächlich gelingen könnte aus den M1 Zellen Insulin positive Zellen herzustellen. Durch die Gabe des GLP1 Analogons Exendin-4, oder Aktivin A/B plus Nicotinamid war es möglich eine schwache Expression von endodermalen bzw. pro-endokrinen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Pdx1, Ngn3 und Nkx6.1 zu erzielen. In einzelnen Experimenten gelang es sogar eine relativ starke Expression von Proinsulin II zu detektieren. Allerdings war die Induktion der Expression auf RT-PCR Ebene sehr variabel und Proinsulin konnte auf Proteinebene bisher in den M1 Zellen nicht nachgewiesen werden.

Die in der Embryonalentwicklung beschriebene sequentielle Aktivierung bzw. Deaktivierung spezifischer proendokriner Transkriptionsfaktoren entsprechend der Hierarchie der Betazellentwicklung konnte in den vorliegenden Versuchen nicht nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, dass unter den hier verwendeten Differenzierungsbedingungen jeweils nur eine geringe Zahl von M1 Zellen tatsächlich transdifferenzierten. Die Gründe könnten zum Teil in Unterschieden in der spontanen Vordifferenzierung in der Zellkultur liegen. Die Differenzierung von Stammzellen in spezialisierte Zellen wird durch intrazelluläre und extrazelluläre Determinanten, die Einfluss auf die spezifischen Genprogramme haben, kontrolliert.

Dies schließt auch biophysikalische Interaktionen, wie Zell-Zell Kontakt und Zell-ECM Signale, Peptide bzw. Proteine (Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine), und kleine Moleküle (Nährstoffe, Metabolite, Säuren) mit ein. Macht man sich diese Komplexität der Differenzierung einer Stammzelle in eine  $\beta$ -Zelle bewusst, so ist es nicht verwunderlich, dass eine vollständige Transdifferenzierung einer adulten Progenitor- oder Stammzellen in reife  $\beta$ -Zellen in den vorliegenden Experimenten und auch in den Versuchen anderer Arbeitsgruppen noch nicht gelungen ist.

Mit den M1 Stammzellen müssen die Effekte der verschiedenen Differenzierungsfaktoren in weiteren Experimenten überprüft werden, in denen unterschiedliche Konzentrationen und Variationen in der Expositionsdauer verwendet werden. Sicher wird es auch notwendig sein, die Ausreifung über die schrittweise Zugabe weiterer Differenzierungsfaktoren zu optimieren. Essentiell ist die potentielle spontane Vordifferenzierung so gering wie möglich zu halten. Hier wäre es günstig die M1 Zellen durch „Limiting Dilution“ auf Einzelzellebene zu klonieren, um mit Zellklonen arbeiten zu können.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der Differenzierungsstudien, dass die M1 Zellen eine neue Population von multipotenten, Nestin und Cytokeratin positiven adulten Stammzellen darstellen. Die Generierung von mesenchymalen und neuronalen Zellen aus dem Haarfollikel machen berechtigte Hoffnung, dass diese Zellen in Zukunft für die Herstellung von autologen Transplantatgeweben eingesetzt werden könnten. In der hier vorliegenden Studie konnte kein Protokoll etabliert werden, mit dem reproduzierbar Insulin-positive Zellen hergestellt werden können. Das endokrine Differenzierungspotenzial der Haarfollikelstammzellen muss in weiteren aufwendigen Experimenten geklärt werden.

## 6 Zusammenfassung

Stammzellen in der Haut und ihren Anhangsgebilden sind in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung für regenerative Therapien gerückt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Stammzellen aus murinen Haarfollikeln zu isolieren, zu charakterisieren und das Differenzierungspotential zu untersuchen.

Nach der Testung unterschiedlicher Isolationsmethoden und Kulturbedingungen ist es gelungen, im Labor eine Methode für die reproduzierbare Isolierung und Langzeitkultivierung einer definierten Population von epithelialen Haarfollikelstammzellen zu entwickeln. Es wurde eine Langzeitzelllinie (M1 Zellen) generiert, die ein hohes proliferatives Potential besitzt (Kultivierung bis zu 113 Passagen). Die M1 Zellen weisen charakteristische Marker von Stammzellen (Sca-1, BCRP1, Sox9, Lhx2) auf und zeigen einen Phänotyp, der zwischen epithelialen (Cytokeratin 18, 19 und 20) und neuroektodermalen Progenitorzellen (Nestin, NGFR p75) einzugliedern ist. Mit einem Genarray wurde die Zelllinie zusätzlich ausgiebig charakterisiert und mit einer endokrinen Progenitorzelllinie verglichen. Es konnte eine Konstellation an Oberflächenmolekülen und Transkriptionsfaktoren detektiert werden, die bisher für keine Stammzellen der Haut oder des Haarfollikels beschrieben worden ist.

Unter definierten Zellkulturbedingungen waren die M1 Zellen fähig sich in vitro sowohl in ektodermale Zelltypen, wie Sebozyten und Neuronen zu entwickeln als auch in mesodermale Zelltypen, wie Adipozyten, Chondrozyten, oder Muskelzellen zu differenzieren. Darüber hinaus konnte nach der Stimulation mit proendokrinen Wachstumsfaktoren die Expression einiger endodermaler bzw. endokriner Transkriptionsfaktoren (HNF3 $\beta$ , Isl1, MafB, Ngn3, Pdx1) auf RNA Ebene detektiert werden. Eine reproduzierbare Transdifferenzierung in (Pro)-Insulin-positive Zellen ist bisher nicht gelungen.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit eine neue Population von Nestin und Cytokeratin positiven murinen Haarfollikelstammzellen isoliert und charakterisiert. Die Zellen besitzen multipotente Eigenschaften, so dass ein Einsatz für regenerative Therapieansätze möglich erscheint. Das Potential der gerichteten Differenzierung in endokrine Zellen muss in nachfolgenden Studien noch genauer aufgeklärt werden.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: (a) Schematische Darstellung des Haarbulbus aus Fuchs 2007. _____	11
Abbildung 2: Wichtige Transkriptionsfaktoren der $\beta$ -Zelldifferenzierung _____	14
Abbildung 3: Gezupftes Anagenbarthaar mit Lage der Bulgeregion, direkt nach Dispaseverdau in PBS _____	27
Abbildung 4: Typische Light Cycler PCR auf $\beta$ -Aktin. (a) Zunahme der Kopienzahl mit den Zyklen, (b) Schmelzkurve (die abweichende blaue Kurve ist die der Negativkontrolle) und (c) Standardkurve eines Light Cycler Laufs _____	45
Abbildung 5: Spheroide der Typ 1 Zellen, nach einem Tag Kultur auf ultra low attachment Platten _____	52
Abbildung 6: Gezupftes Fellhaar, wenige Tage nach Dispaseverdau in Medium mit B27 _____	57
Abbildung 7: Vergleich der Wachstumskurven von Passage 21 und Passage 93 der Zelllinie M1 _____	62
Abbildung 8: Zelltypen mit verschiedener Morphologie in der Primärkultur. _____	63
Abbildung 9: (a) M1 Langzeitkultur in B27 Medium. (b) M1 Langzeitkultur in HG Medium _____	65
Abbildung 10: FACS Ergebnisse der HFSC-Marker bei den in B27 Medium kultivierten M1 Zellen. Die Zellen sind für die Intergrine $\alpha 6$ (CD49f) und $\beta 1$ , sowie für NCAM stark positiv, die Stammzellmarker CD34 und CD200 werden nur schwach exprimiert _____	67
Abbildung 11: RT-PCR Ergebnisse für potentielle HFSC-Marker bei Kultivierung der Zelllinie M1 in B27 Medium. Die Zellen sind stark positiv für Nestin und P75 . Etwas schwächer werden Sox9 und Lhx2 exprimiert. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription _____	67
Abbildung 12: Untersuchung embryonaler Marker in der M1 Zelllinie (B27 Medium). (a) In der FACS Analyse sind die M1 Zellen negativ für SSEA-1 und SSEA-4. (b) In der RT-PCR kein Nachweis von Oct4 oder Nanog. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription _____	68
Abbildung 13: Die in B27 Medium kultivierten M1 Zellen sind in der RT-PCR für die stammzellassozierten Marker BCRP1 und GATA3 positiv und für Sox2 negativ. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription _____	69
Abbildung 14: Die FACS Analyse stammzellassoziierter Marker zeigt die positive Expression von Sca-1 in den M1 Zellen (Kultivierung in B27 Medium) _____	69
Abbildung 15: RT-PCR Ergebnisse der Cytokeratinexpression der M1 Zelllinie bei Kultur in DMEM/F12 3:1 Medium mit FGF (20 ng/ml) und 10% SR. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription _____	70
Abbildung 16: Die FACS Ergebnisse der Testung auf epitheliale und mesenchymalen Oberflächenmoleküle für die M1 Zellen. Die M1 Zelllinie ist positiv für CD9, CD44, CD90.2, CD105 und CD106 (Kultivierung in B12 Medium) _____	72
Abbildung 17: RT-PCR zum Nachweis von Vimentin in den M1 Zellen (Kultivierung in B27 Medium). Vimentin wird von den M1 Zellen nicht exprimiert. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription _____	72
Abbildung 18: RT-PCR zum Nachweis von HNF1 $\beta$ , HNF3 $\beta$ , HNF4 $\alpha$ , HNF6, GATA4 und Sox17 in den M1 Zellen (Kultivierung in B27 Medium). Alle Marker sind in den M1 Zellen negativ. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription _____	73
Abbildung 19: RT-PCR zum Nachweis von Ngn3, NeuroD, Nkx6.1, Pax4, Pdx1, Isl1, Proinsulin I und Proinsulin II in den M1 Zellen (Kultivierung in B27 Medium). Alle Marker sind in den M1 Zellen negativ. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription _____	74
Abbildung 20: (a-b) Positive Oil Red O Färbung der 14 Tage in Adipozytenmedium stimulierten M1 Zellen. (c) Negative Oil Red O Färbung der nicht stimulierten M1 Zellen _____	77
Abbildung 21: (a-c) Sebumbildung in den für 12 Tage mit Sebozytenmedium stimulierten M1 Zellen. (d) Unstimulierte M1 Zellen als Kontrolle für 12 Tage in B27 Medium kultiviert _____	78
Abbildung 22: CK7 Expression der M1 Zellen. Die unstimulierte Kontrolle (K) exprimiert CK7 stärker, als die in Sebozytenmedium (M1 Sebo) kultivierten Zellen. Die Kontrolle der M1 Zellen, die die gleiche Konzentration an DMSO (K DMSO), wie das	

	Sebozytenmedium enthielt, zeigte die gleiche Expressionsstärke wie die M1 Negativkontrolle. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription	79
Abbildung 23:	(a) Positive Alcianblaufärbung, der für 21 Tage in Chondrozytenmedium kultivierten M1 Zellen. (b) Negative Kontrolle der M1 Zellen, die für 21 Tage in B27 Medium wuchsen	79
Abbildung 24:	(a-b) Färbung der Kalziumsalze in den M1 Zellen nach 28tägiger Stimulation in Osteoblastenmedium. Vergleich einer 28 Tage (a-b) und 21 Tage (c) langen Stimulation der M1 Zellen. (d) Negative von-Kossa-Färbung der M1 Population nach 28 Tagen in B27 Medium	80
Abbildung 25:	RT-PCR der M1 Zellen auf Calponin und Smooth Muscle Aktin (SMA). Sowohl die Kontrolle (K) der M1 Zellen in B27 Medium, als auch die für 14 Tage mit Muskelzellmedium (Muskel) stimulierten Zellen sind positiv für beide Marker. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription	81
Abbildung 26:	Desminfärbung nach Inkubation der M1 Zellen in Muskelmedium (14 Tage). Färbung mit einem monoklonalen anti-Desminantikörper und FITC (grün). (a) Vergleich der Negativkontrolle mit den (b) für 14 Tage differenzierten M1 Zellen. (c) Ausdifferenzierte Zellen im Phasenkontrast- und (d) unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die DAPI gefärbten Zellkerne leuchten blau	82
Abbildung 27:	(a-c) Neuronenähnliche Morphologie der für 21 Tage in Neuronenmedium stimulierten M1 Zellen. (d) Nicht stimulierte M1 Zellen 21 Tage in B27 Medium	83
Abbildung 28:	$\beta$ III Tubulin Färbung mit einem monoklonalen Antikörper und anti-Maus-FITC (grün). (a, c, e) Links die Phasenkontrastbilder und (b, d, f) daneben die zugehörigen Bilder desselben Ausschnitts unter dem Fluoreszenzmikroskop. (b+d) Positive Färbung der für 21 Tage in Neuronenmedium stimulierten M1 Zellen. (f) Negative $\beta$ III Tubulin Färbung der 21 Tage in HG Medium gewachsenen M1 Zellen. Die DAPI gefärbten Zellkerne leuchten blau	84
Abbildung 29:	RT-PCR der M1 Zellen auf Map2. Sowohl die für 21 Tage in Neuronenmedium kultivierten Zellen als auch die in B27 Medium kultivierten Zellen (M1) sind positiv für MAP2. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription	85
Abbildung 30:	Protokoll für die Differenzierung von embryonalen Stammzellen in $\beta$ -Zellen (nach D'Amour et al. 2006 und Kroon et al. 2008). CYC: KAAD-Cyclopamine; DAPT: $\gamma$ -Secretase Inhibitor; FGF10: Fibroblast Growth Factor 10; Gcg: Glukagon; Ghrl: Ghrelin; hESC: human embryonic stem cell; HGF: Hepatocyte Growth Factor; Iapp: Islet Amyloid Polypeptid; IGF-I: Insulin-like Growth Factor I; KGF: Keratinocyte Growth Factor; Ppy: Pancreatisches Polypeptid; SCID: Severe Combined Immunodeficiency; Sst: Somatostatin. (Abbildung aus Evans-Mollina et al. 2009)	86
Abbildung 31:	Transkriptionsfaktorkomplexe, die den Insulinpromotor aktivieren. HNF: Hepatocyte Nuclear Factor; Isl1: Islet-1; Lmx1.1: LIM Homeobox Factor 1.1; mMafA: Mammalian Homolog of Avian MafA; NeuroD1: Neurogenic Differentiation 1; Pdx1: Pancreatic and Duodenal Homeobox Factor 1	87
Abbildung 32:	RT-PCR Ergebnisse der Brachyuryexpression in M1 Zellen. (a) Die M1 Kontrollzellen ohne Stimulation waren zu jedem der 3 Zeitpunkte negativ. Nach 6 Tagen mit Wnt3a wird Brachyury hochreguliert und nach 10 und 13 Tagen wird die Expression wieder schwächer. (b) Die 3 tägige Stimulation mit Bmp4 resultierte ebenfalls in einer positiven Brachyuryexpression. Die in B27 Medium kultivierten Kontrollzellen zeigten keine Expression. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription	88
Abbildung 33:	RT-PCR Analyse der HNF Expression. (a) HNF3 $\beta$ Expression und (b) HNF4 Expression der M1 Zellen nach Stimulation mit FGF10 und Cyclopamin. (c) Ab Passage 77 exprimieren die M1 Zellen (Kontrolle) auch basal HNF3 $\beta$ . Nach der Zugabe von Bmp4 wurde die HNF3 $\beta$ Expression herunter reguliert. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription	89
Abbildung 34:	RT-PCR Ergebnisse der Isl1 Expression der M1 Zelllinie. Die Zellen sind positiv für Isl1. Die Stärke der Expression hängt von den Kulturbedingungen ab. M1p40 ist zum Vergleich in B27 Medium kultiviert worden. HG: 4500mg/L Glukose; LG: 1000mg/L Glukose; FKS: fetales Kälberserum; SR: serum replacement; Wnt: Wnt3a. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription	90
Abbildung 35:	RT-PCR Ergebnis der Isl1 Expression der M1 Zellen. Die Kultur mit FGF10 und Cyclopamin (CYC) bewirkt eine Hochregulation von Isl1. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription	90

- Abbildung 36: RT-PCR Ergebnisse der MafA/B Expression der M1 Zelllinie. Die Zellen sind positiv für beide Gene, die Expressionsstärke von MafA ist geringer, als die von MafB. Die Stärke der Expression hängt von den Kulturbedingungen ab. M1p40 ist zum Vergleich weiter in B27 Medium kultiviert worden. HG: 4500mg/L Glukose; LG: 1000mg/L Glukose; FKS: fetales Kälberserum; SR: serum replacement; Wnt: Wnt3a \_\_\_\_\_ 91
- Abbildung 37: RT-PCR Ergebnisse der M1 Zellen für Ngn3. Nach 5 Tagen Kultur in B27 Medium mit GLP1 und Nicotinamid (stimuliert) exprimieren die M1 Zellen Ngn3. Zellen, die nur in B27 Medium (Kontrolle) kultiviert wurden, sind negativ. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription \_\_\_\_\_ 92
- Abbildung 38: RT-PCR Ergebnis der Pdx1 Expression. Die M1 Zellen (Passage 105) waren nach 14 Tagen Stimulation mit AktivinA positiv für Pdx1 \_\_\_\_\_ 93
- Abbildung 39: RT-PCR Ergebnisse der Expression von Proinsulin in M1 Zellen nach der Stimulation mit GLP1 und Nicotinamid. (a) Die Zellen sind nach 7 Tagen schwach positiv für Proinsulin 1 und 2 (Proll). (b) Die Kultivierung ohne FKS (-FKS) bewirkte keine Erhöhung der Proinsulin 1 Expression. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription \_\_\_\_\_ 93
- Abbildung 40: RT-PCR Ergebnisse der Proinsulin 2 Expression. Nach Kultur mit Nicotinamid und nachfolgend mit Exendin 4 (NE) wurde von den M1 Zellen Proinsulin 2 exprimiert. Der Effekt war stärker, wenn vorher 2 Monate auf HG Medium umgestellt wurde (p28). Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription \_\_\_\_\_ 94
- Abbildung 41: RT-PCR Ergebnisse der Proinsulin 2 Expression. Nach Kultur mit Nicotinamid, Exendin 4 und DBZ (NED) wurde von den M1 Zellen Proinsulin 2 exprimiert. Der Effekt war bei den älteren Zellen der Passage 110 (p110) stärker ausgeprägt, als bei Passage 37 (p37). Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription \_\_\_\_\_ 94
- Abbildung 42: Unterteilung der 500 am stärksten exprimierten Gene der M1 Zellen (HG Medium) nach Funktion und Zuordnung zu den drei Keimblättern \_\_\_\_\_ 97
- Abbildung 43: Die Heatmap zeigt die Expressionswerte (CarmaWeb) der 60 am stärksten zwischen M1 NE und M1 HG regulierten Gene (FDR<10%). Die roten Kästchen bedeuten, dass die Expression mit NE höher ist und die blauen, dass die Expression niedriger ist. Abgebildet sind die Gensymbole und die linearen Ratios (M1 NE versus M1 HG) \_\_\_\_\_ 99
- Abbildung 44: RT-PCR von sechs ausgewählten Genen, die in der Array Analyse unterschiedlich reguliert waren. Pos. = Positivkontrolle; -RT = ohne reverse Transkription \_\_\_\_\_ 102
- Abbildung 45: Transkriptionsfaktoren aus der Analyse der zwischen M1 NE und M1 HG signifikant unterschiedlich regulierten Gene. Mit + sind die Transkriptionsfaktoren (Sp7, Irf7 und Hey1) gekennzeichnet, die eine Bindungsstelle im entsprechenden Genpromotor (linke Spalte) besitzen \_\_\_\_\_ 104
- Abbildung 46: Die Heatmap zeigt die Expressionswerte der 60 (von insgesamt 313) am stärksten regulierten Gene (M1 B27 versus M1 HG, FDR<10%). Die roten Kästchen bedeuten, dass die Expression höher ist und die blauen, dass die Expression niedriger liegt. Abgebildet sind die Gensymbole und die linearen Ratios \_\_\_\_\_ 105
- Abbildung 47: Die Heatmap zeigt die Expressionswerte der 60 (von insgesamt 187) am stärksten zwischen den M1 HG Zellen und mJ Zellen unterschiedlich regulierten Markergene (FDR<10%). Die roten Kästchen bedeuten, dass die Expression höher ist und die blauen, dass die Expression niedriger ist. Abgebildet sind die Gensymbole und die linearen Ratios \_\_\_\_\_ 108
- Abbildung 48: Die Heatmap zeigt den Expressionsvergleich der 33 Markergene, die innerhalb der drei unterschiedlich stimulierten M1 Zellen eine signifikante Regulation zeigten (FDR<10%). Die roten Kästchen bedeuten, dass die Expression im Vergleich zu den mJ Zellen höher ist und die blauen, dass die Expression niedriger ist. Abgebildet sind nur die Gensymbole \_\_\_\_\_ 111
- Abbildung 49: Die Heatmap zeigt die Expressionswerte signifikant regulierter Markergene (FDR<10%). Dargestellt sind die zwischen M1 HG und mJ signifikant regulierten Gene mit einem Quotienten >2. In rot sind die Gene, die stärker exprimiert werden und in blau diejenigen, die schwächer exprimiert werden. Neben den Gensymbolen ist die Zuordnung angegeben \_\_\_\_\_ 112
- Abbildung 50: Heatmap der innerhalb der M1 Zellen signifikant regulierten Markergene mit einem Quotienten >2. In rot sind die Gene, die stärker exprimiert werden und in blau diejenigen, die schwächer exprimiert werden \_\_\_\_\_ 113

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Differentialdiagnostische Kriterien für Typ 1 und Typ 2 Diabetes bei Diagnosestellung	2
Tabelle 2: Medienzusammensetzung für die Differenzierung in Adipozyten	37
Tabelle 3: Medienzusammensetzung für die Differenzierung in Sebozyten	38
Tabelle 4: Medienzusammensetzung für die Differenzierung in Chondrozyten	39
Tabelle 5: Medienzusammensetzung für die Differenzierung in Osteoblasten	39
Tabelle 6: Medienzusammensetzung für die Differenzierung in Muskelzellen	41
Tabelle 7: Medienzusammensetzung für die Differenzierung in Neuronen	41
Tabelle 8: Master Mix der Reversen Transkription	43
Tabelle 9: Master Mix der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion für jede Probe	46
Tabelle 10: Master Mix der Polymerase-Kettenreaktion (Promega)	47
Tabelle 11: Ablauf der immunhistologischen Färbung mit der Fluoreszenzmethode (links) oder der ABC Methode (rechts)	53
Tabelle 12: Proben der Haarfollikelstammzellen für die Gen-Array Analyse	54
Tabelle 13: Vergleichszellen mJ für die Gen-Array Analyse	55
Tabelle 14: Zusammensetzung der Zellkulturmedien	60
Tabelle 15: Anteil der im FACS positiven Zellen (%) der drei isolierten Zelltypen bei Kultur in B27 Medium. n.t.: nicht getestet	66
Tabelle 16: Bestimmung epithelialer und mesenchymaler Marker in der FACS Analyse.	71
Tabelle 17: Vergleich der in dieser Arbeit isolierten Typ 1 Zellen (M1) und den bekannten Stammzellen im Bereich des Haarfollikels. Die grau unterlegten Flächen stimmen mit den Typ1 Zellen überein. Die leeren Flächen bedeuten, dass die Expression für diese Gene bei der entsprechenden Zelllinie nicht beschrieben ist. SKP: skin derived precursor; DEEP1: dermis derived epithelial progenitor 1; ORS: outer root sheath; IRS: inner root sheath; LRC: label retaining cell; BSC: bulge stem cell; BC: bulge cell; hHFSC: human hair follicle stem cell; TAC: transit amplifying cell; EPI-NCSC: epidermal neural crest derived stem cell; SP: side population. Mit * gekennzeichnete Gene werden erst weiter unten in den Ergebnissen erwähnt. Mit + gekennzeichnete Gene sind eher schwach exprimiert und mit ++ gekennzeichnete sind sehr stark exprimiert	76
Tabelle 18: Arraydaten einiger bereits mit RT-PCR untersuchter Gene	96
Tabelle 19: Signifikant unterschiedlich regulierte Gene zwischen den im Beadarray untersuchten Zellen mJ, M1 HG, M1 B27 und den mit Nicotinamid und Exendin 4 stimulierten M1 Zellen (M1 NE). FDR: False discovery rate; 10% bedeutet, dass 10 von 100 signifikanten Ergebnissen falsch positiv sein können	98
Tabelle 20: Pantheranalyse der 87 zwischen M1 NE und M1 HG signifikant regulierten Gene. In gelb sind alle mit Immunantwort assoziierten Gene und in blau sind Gene markiert, die mit neuronalen Differenzierungsprozessen in Zusammenhang stehen	101
Tabelle 21: Daten aus dem Array für die RT-PCR verifizierten Gene. M1 Zellen kultiviert in B27 Medium (M1 B27), Hochglukosemedium (M1 HG) oder Medium mit Nicotinamid und Exendin 4 (M1 NE). n.s.: nicht signifikant	103
Tabelle 22: Liste von 32 der 187 signifikant regulierten Markergene aus dem Vergleich der M1 Zellen (HG Medium) und der mJ Zellen. Ausgewählt wurden die Gene, deren Expression sich am stärksten unterschied	107
Tabelle 23: Expressionsraten von stammzellassoziierten Genen, die sowohl in der M1 Zelllinie (HG Medium) als auch in den mJ Pankreasprogenitorzellen detektierbar waren	109
Tabelle 24: Liste der 33 aus 384 Markergenen in den M1 Zellen, die signifikante Expressionsunterschiede unter verschiedenen Zellkulturbedingungen aufgewiesen haben. n.s.: nicht signifikant	110

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

ADA	Amerikanische Diabetes Gesellschaft
AFP	Alpha-Feto-Protein
AK	AK
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
db-cAMP	N6,2'-O-Dibutyryl-adenosine 3',5'-cyclic monophosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BCRP1	Breast cancer resistance protein 1 (=ABCG2)
BrdU	5'-Bromo-2'-deoxyuridin (synthetisches Thymidinanalogon)
BSC	bulge stem cells
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cck	Cholecystokinin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CK	Cytokeratin
CYC	KAAD-cyclopamine
d	Tag/e
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycin-t-butylester ( $\gamma$ -Secretase Inhibitor)
DBZ	Dichlorobenzamilhydrochlorid
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DE	Definitives Endoderm
DEEP1	Dermis derived epithelial progenitor 1
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

---

DP	Dermale Papille
Dpt	Dermatopontin
E	embryonic day
EB	Embryoid body
ECC	Embryonale Karzinomzellen
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EPC	Endotheliale Vorläuferzellen
EPI-NCSC	epidermal neural crest derived stem cells
ESC	Embryonale Stammzellen
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FDR	False discovery rate
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
Flk1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2)
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
GAP43	Growth associated protein 43
GATA	GATA binding protein (Transkriptionsfaktor, der die Sequenz GATA erkennt)
Gcg	Glukagon
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Ghrl	Ghrelin
GLP1	Glucagon-like Peptid 1
GSK3 $\beta$	Glykogen Synthase Kinase 3 beta
$\gamma$ -GT	$\gamma$ -glutamyl-transpeptidase
h	Stunde/n
hESC	humane embryonale Stammzellen
HF	Haarfollikel
HFSC	Haarfollikelstammzellen
HG	High Glucose
HGF	Hepatocyte growth factor
HNF	Hepatocyte nuclear factor
Hoxd10	Homeo Box D10

---

HSC	Hämatopoetische Stammzellen
Iapp	Islet amyloid polypeptide
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IGF	Insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
Ihh	Indian hedgehog
ILV	(-)-Indolactam V
IPCs	Insulin produzierende Zellen
IRS	Innere Wurzelscheide (inner root sheath)
Isl1	Insulin gene enhancer protein Islet-1
i.v.	intravenös
KGF	Keratinocyte growth factor
Krt1-15	Cytokeratin 15 Promotor
LG	Low Glucose
Lhx2	LIM homeobox 2
LIF	Leukemia inhibitory factor
Lmx1.1	LIM homeobox factor 1.1
LRC	label retaining cells
Ly6a	Lymphocyte antigen 6 complex, locus A (=Sca-1)
Map2	Microtubule associated Protein 2
Mdga2	MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 2
mH1	Pankreasstammzelllinie
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
mJ5	Pankreasstammzelllinie
MODY1	Maturity onset diabetes of the young, subtype 1
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stammzellen
n	Anzahl
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NE	mit Nicotinamid und Exendin 4 stimuliert
NGFR p75	Nerve growth factor receptor
NeuroD1	Neurogenic differentiation 1

---

NGF	Nerve growth factor
Ngn3	Neurogenin 3
Nkx6.1	Nk6 homeobox 1
NSC	Neurale Stammzellen
n.s.	nicht signifikant
n.t.	nicht getestet
NT3	Neurotrophin-3
OD	Optische Dichte
ORS	Äußere Wurzelscheide (outer root sheath)
P75	Neurotrophin Rezeptor
Pax	Paired box gene
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
Pdx1	Pancreatic duodenum homeobox protein 1
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
Ppy	Pancreatic polypeptide
P/S	Penicillin/Streptomycin
PSA-NCAM	Polysialylated neural cell adhesion molecule
RA	Retinoic acid
rh	Recombinant human
RIN	RNA integrity number
rm	Recombinant mouse
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute
RRAR2	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase chain reaction
S100A11	S100 calcium binding protein A11
SC	stem cell
Sca-1	Stem cell antigen 1
SCID	Severe Combined Immunodeficiency Disorder
Shh	Sonic hedgehog

---

SKP	skin derived precursor
SMA	(alpha) Smooth muscle actin
s.o.	siehe oben
Sox	SRY (sex determining region Y)-box
SP	side population
Sp7	Trans-acting transcription factor 7
SR	Serum replacement
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
SSEA	Stage-specific embryonic antigen
Sst	Somatostatin
Std.	Stunden
s.u.	siehe unten
TA	transit-amplifying
TAC	transit-amplifying cell
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGFβ	Transforming growth factor beta
Thy1	Thymus cell antigen 1, theta (CD90.2)
TNFR16	Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
Trf	Transferrin
TXF	Transkriptionsfaktor
U	Units (Einheiten)
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7.4 Primersequenzen und Amplifikationsbedingungen der RT-PCR

Gen	Primersequenz: A: Forward (5' → 3') B: Reverse (3' → 5')	Temp [°C]	Größe [bp]	MgCl <sub>2</sub> [mM]	Positiv- kontrolle
Aktin	A: ACCCACACTGTGCCCATCTA B: GCCACAGGATTCCATACCCA	58	342	2	keine
Albumin	A: GTCTTAGTGAGGTGGAGCAT B: ACTACAGCACTTGGTAACAT	55	465	2	Leber
α1Antitrypsin	A: TCGATCCTAAGCACACTGAGG B: CGGCTTGTAAGACTGTAGC	54	477	2,5	Leber
α-Fetoprotein	A: ACTCACCCCAACCTTCTGTCTC B: CAGCAGTGGCTGATACCAGAG	60	422	2,5	Leber
Amylase 2	A: AGTACCTGTGGAAGTTACCT B: ACACAAGGGCTCTGTTCAGAA	58	538	2,5	Pankreas
Brachyury	A: AGTATGAACCTCGGATTAC B: CCGGTTGTTACAAGTCTCAG	56	858	3	EB
BCRP1	A: CCATAGCCACAGGCCAAAGT B: GGGCCACATGATTCTTCCAC	60	327	2,5	EB
Calponin	A: ACCAACCATACACAAGTTCAGTCC B: CCAATGATGTTCTGCCTTCTCTC	58	151	3	Herz
Cholecysto- kinin	A: TATGTCTGTGCGTGGTGTATGGCA B: TTAAGAACGGACATGCGGCCAGAA	56	229	3	GH
Ck1	A: GAGATTTTCAGGAGGAGGCTTC B: TTCATCCTCGTACTTGGTCCTG	58	700	2	Haut
Ck7	A: GATGACCTCCGCAACACC B: TCCAGCAGCTTGGCGTAG	55	296	1	Haut
Ck14	A: CTAGCCGCATGTCTCCATC B: GCAGGAGGACATTGGCATTG	58	513	2	Haut
Ck15	A: TCAATGTGGAAATGGACGCAGCAC B: GAAATTGCTGCTGCTGCTACTGCT	55	542	1,5	Haut
Ck18	A: GCCTTGCCGCCGATGACTTTAGA B: TGATTTCCGCAGACTTGGTGGTGA	60	396	1,5	Pankreas
Ck19	A: GTCCTACAGATTGACAATGC B: CACGCTCTGGATCTGTGACAG	60	569	2	Lunge
Ck20	A: TGGGGGCAATGGGAAACTGG B: CTGCCGGCGAAGAACCTCAAC	60	457	2	EB
c-met	A: AGCCAGTAATGATCTCAATG B: TCAGGATAGGGGACAGGT	56	567	1	Leber
Deltex	A: GGGCGTGCTCCGAAACAAG B: GCCCTTGCTGGTGGTCTCTAT	58	786	2	EB
Dermato- pontin	A: TCTTAACCGCCAAGGCTTCAGCTA B: AAATTGCCACTCACGATCCAGCAC	56	271	3	Haut
γGT	A: GCTGAGCTGATTGAGCATCCG B: GGTTGATGAAGTTGGGCGAGCT	62	523	2,5	Gallengang
GAD 65	A: ACGGGCGGCATCGGAAACAA B: AATACAGGGCGATCTCATAGGTG	62	530	3	GH
GAD 67	A: ACCGGGGACAAGGCGATTCA B: GGTGGCGGCTGGGTTAGAGATG	62	387	2,5	GH
Gap43	A: GATGGCTCTGCTACTACC B: TCGGCTTGTTTAGGCTCC	54	230	1	Kleinhirn
Gata1	A: GGGAAGAGCAACAACACGTTTC B: GTTTGCTGACAATCATTGCT	58	382	1,5	EB
Gata3	A: ACGTCTCACTCTCGAGGCAGCATG B: GAAGTCCTCCAGCGGTCATGCAC	59	567	1	Milz
Gata4	A: CTCTGGAGGCGAGATGGGAC	57	414	1,5	KH

Gen	Primersequenz:	Temp [°C]	Größe [bp]	MgCl <sub>2</sub> [mM]	Positiv- kontrolle
	A: Forward (5' → 3') B: Reverse (3' → 5')				
Hes1	B: GCGCATCTCTTCACTGCTGCT A: CAGCCAGTGTCAACACGACAC	60	307	2	mJ5
Hes5	B: TCGTTCATGCACTCGCTGAA A: CGCATCAACAGCAGCATAGAG	58	269	2	KH
HNF1β (Tcf2)	B: TGGAAGTGGTAAAGCAGCTTC A: GTTGAAATTC AAGAGTGACTTGCTC	55	281	3	Pankreas
HNF3β (Foxa2)	B: CTTTAATGGGAGGCTTCCTGAGATG A: CCTCTATGTAGACTACTGCTTCTC	55	277	1,5	mJ5
HNF4α	B: CCTGGATTTCAACATGTCCAGAATG A: CTTCTTCTTCATGCCAG	55	270	1,5	mJ5
HNF6 (Onecut1)	B: ACACGTCCCCATCTGAAG A: GCAATGGAAGTAATTCAGGGCAG	55	461	3	Pankreas
Homeo Box D10	B: CATGAAGAAGTTGCTGACAGTGC A: CACTTGCTCATTACCCCAACAT	58	522	3	GH
α6-Integrin	B: TAAGGGCACCTCTTCTTTCTGCCA A: AGGAGTCGCGGATATCTTT	58	503	2,5	EB
IA-2	B: CAGGCCTTCTCCGTCAAATA A: GCGCAGACAGGGCTCCAGATTT	62	421	3	Inseln
Isl1	B: CGGGCTCCTCGCACCAAGATG A: TCTAAGGTGTACCACATCGAGTGT	58	632	2	mH1
Lhx2	B: GCAGGCTGATCTATGTCGCTT A: GTGCTGTGAATGCAAGCTCAACCT	56	662	1	Großhirn
MafA	B: CAAGCTGCTTCAAGTCCTTGGCAT A: AGGCCTTCCGGGGTCAGAG	60	370	1,5	Inseln
MafB	B: TGGAGCTGGCACTTCTCGCT A: CAACAGCTACCCACTAGCCA	58		3	Pankreas
Map2	B: GGCGAGTTTCTCGCACTTGA A: AAGGCCAAGAACACACGATTG	58	626	2	Kleinhirn
Nanog	B: ACCAAGCCCTAAGCTTCGACTAA A: GCACCAACTCAACTTCTGAGC	58	265	1	EB
Nestin	B: CTCGAGAGTAGCCACCATATC A: CCATCCGGGGCCCTGAAGTCG	60	576	1,5	mJ5
NeuroD	B: GCAAGGGGGAAGAGAAGGATGTCG A: CTGATCTGGTCTCCTTCGTACAG	58	540	1	EB
Ngn3	B: GATGCGAATGGCTATCGAAAG A: CATACTAGGGACTGCTCCGA	58	510	1	Transfizierte mJ5
Nkx2.2	B: CATAAAGCTGTGGTCCGCTA A: CTCTTCTCAAAGCGCAGAC	58	514	1	Pankreas
Nkx6.1	B: AACCAACCGTGGTAAGGATCG A: TTCTCTGGACAGCAAATCTTCG	58	297	2	Pankreas
Notch1	B: CTGAGTGATTTTCTCGTCGTCA A: TTACAGCCACCATCACAGCCACACC	62	377	2,5	EB
Notch2	B: ATGCCCTCGGACCAATCAGA A: CACCTTGAAGCTGCAGACAT	60	218	3	EB
Notch3	B: TGGTAGACCAAGTCTGTGATGAT A: ATATATATGGAGTTGCTCCCTTCC	63	304	22	EB
Notch4	B: GGCTTTGAGCAGACAAGACCCCTT A: GGAAGCGACACGTACGAGTCTGG	59	330	1	EB
Numb	B: CAACACCCGGCACATCGTAGGT A: CATCCCCATCCTCTCCCACCTCTC	68	510	1	EB
Oct 4	B: GGGCCCGCACACTCTTTGACACT A: GGC GTTCTCTTTGGAAAGGTGTTTC	62	313	2	EB
P75	B: CTCGAACCACATCCTTCTCT A: GTGCGGGGTGGGCTCAGGACT	62	422	2	EB
Pax4	B: CCACAAGGCCACAACCACAGG A: GTGAGCAAGATCCTAGGACGC	58	378	1	Transfizierte mJ5
Pax6	B: CGGGGAGAAGATAGTCCGATT A: TCACAGCGGAGTGAATCAGC	58	377	1	EB
	B: TATCGTTGGTACAGACCCCTC				

Gen	Primersequenz:	Temp [°C]	Größe [bp]	MgCl <sub>2</sub> [mM]	Positiv- kontrolle
	A: Forward (5' → 3') B: Reverse (3' → 5')				
Pdx1	A: GACATCTCCCCATACGAAGT B: GTCCCGCTACTACGTTTCTTAT	62	452	2	mJ5
Preprogluka- gon	A: ATTTACTTTGTGGCTGGATTG B: TGTCAGTGATCTTGGTTTGAA	60	526	2,5	Pankreas
Preproso- matostatin	A: CTCTGCATCGTCTCCAGCTTT B: CAGGATGTGAATGTCTTCCAG	60	311	2,5	Pankreas
Proinsulin I	A: CTGTTGGTGCACCTCCTACC B: GCAGTAGTTCTCCAGCTGGT	60	315	2,5	Pankreas
Proinsulin II	A: TCAAGCAGCACCTTTGTGGTT B: GTTGCAGTAGTTCTCCAGCTG	60	254	2,5	Pankreas
RRAR2	A: TGTGGACAGAGCTGAAGAAGTGCT B: TGGAGAAGGCAAAGTCCAGGTA	56	311	3	Haut
SMA	A: CAGGCATGGATGGCATCAATCAC B: ACTCTAGCTGTGAAGTCAAGTGTGCG	58	253	2	Herz
Sox1	A: GCCGCGCCGCAAGACCAAGAC B: CGCCGTAAGGGATGCCCGGTAGC	62	476	3	KH
Sox2	A: GGAGTGGAACTTTTGTCCGA B: TTCATGTAGGTCTGCGAGCTG	58	423	1	Kleinhirn
Sox3	A: TTCGCACTCGCAGCGCGTGCCTCGG B: ACGGCCAACTTTTCGGTCTCCTC	57	320	2	EB
Sox9	A: GCAAGCTGGCAAAGTTGATCT B: GCTGCTCAGTTCACCGATG	55	105	1,5	Hoden
Sox10	A: GGAGGTTGCTGAACGAAAGTG B: TCCATGTTGGACATTACCTCG	58	445	1	KH
Sox15	A: TGGAGCGTCTGGGGGACTTC B: TGGGGATAGGTAAGGGGAGAAAAG	55	526	1,5	EB
Sox17	A: AAGGCGAGGTGGTGGCGAGTAG B: CCTGGCAGTCCCGATAGTGG	55	489	1,5	GH
Sp7	A: TCCCTTCTCAAGACCAATGGACT B: TGCTCAAGTGGTCGTTCTGGTAA	60	914	2	GH
TNFR16	A: AGGGCACATACTCAGATGAAGCCA B: ACTGTAGAGGTTGCCATCACCCCTT	58	560	1	EB
Vimentin	A: CGTCTTTTGGGGTGTGAGTTGTTA B: GAAGGCGAGGAGAGCAGGATTT	58	360		MSC
Wnt2	A: GATCCAAAGAAGAAAGGAAGTGCC B: AGGGAAGAAAAGGCGAATATGACC	60	706	3	EB
Wnt5a	A: CACGCTAAGGGTTCCTATGAGA B: TCGGTCTGCACTGTCTTAAACTGG	60	443	3	EB
Wnt10b	A: GCTCGAATGAGACTCCACAACAAC B: GCACCAAGAGGACAACCATTCCTG	60	585	2	EB
Wnt11	A: TACCTGTCAGCCACGAAGGTGGTA B: ATCTGCAGGGAAGTCCACCAAGGT	60	433	2	EB

## 7.5 Bibliosphere Analyse der biologischen Prozesse mit den 87 zwischen M1 NE und M1 HG signifikant unterschiedlich regulierten Genen

Prozess	ID	Total	Beobachtet	Erwartet	Zscore
immune response	GO:0006955	428	11	1,25	8,86
response to virus	GO:0009615	52	3	0,15	7,34
immune system process	GO:0002376	704	12	2,05	7,11
response to stimulus	GO:0050896	1652	17	4,81	5,86
response to other organism	GO:0051707	141	3	0,41	4,06
defense response	GO:0006952	366	5	1,07	3,86
neuron development	GO:0048666	254	4	0,74	3,83
organ morphogenesis	GO:0009887	549	6	1,6	3,54
axonogenesis	GO:0007409	175	3	0,51	3,51
neurite morphogenesis	GO:0048812	185	3	0,54	3,38
response to biotic stimulus	GO:0009607	186	3	0,54	3,36
neuron morphogenesis during differentiation	GO:0048667	187	3	0,54	3,35
cellular macromolecule catabolic process	GO:0044265	210	3	0,61	3,08
neuron differentiation	GO:0030182	337	4	0,98	3,08
cellular morphogenesis during differentiation	GO:0000904	212	3	0,62	3,06
neurite development	GO:0031175	218	3	0,63	2,99
multi-organism process	GO:0051704	220	3	0,64	2,97
biopolymer catabolic process	GO:0043285	224	3	0,65	2,93
generation of neurons	GO:0048699	379	4	1,1	2,79
neurogenesis	GO:0022008	401	4	1,17	2,66
cellular catabolic process	GO:0044248	404	4	1,18	2,64
macromolecule catabolic process	GO:0009057	277	3	0,81	2,47
growth	GO:0040007	286	3	0,83	2,4
cell part morphogenesis	GO:0032990	305	3	0,89	2,27
cell projection organization and biogenesis	GO:0030030	305	3	0,89	2,27
cell projection morphogenesis	GO:0048858	305	3	0,89	2,27
response to wounding	GO:0009611	308	3	0,9	2,24
cell migration	GO:0016477	310	3	0,9	2,23
response to external stimulus	GO:0009605	489	4	1,42	2,19
anatomical structure morphogenesis	GO:0009653	1105	7	3,22	2,18
response to stress	GO:0006950	894	6	2,6	2,17
catabolic process	GO:0009056	519	4	1,51	2,06
behavior	GO:0007610	352	3	1,02	1,97
cell motility	GO:0006928	358	3	1,04	1,94
localization of cell	GO:0051674	358	3	1,04	1,94
tissue development	GO:0009888	363	3	1,06	1,91
cellular structure morphogenesis	GO:0032989	414	3	1,21	1,66
cell morphogenesis	GO:0000902	414	3	1,21	1,66
cell development	GO:0048468	657	4	1,91	1,54
nervous system development	GO:0007399	689	4	2,01	1,44
organ development	GO:0048513	1446	7	4,21	1,42
system development	GO:0048731	1745	8	5,08	1,37
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0006357	489	3	1,42	1,34
transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0006366	529	3	1,54	1,2

Prozess	ID	Total	Beobachtet	Erwartet	Zscore
regulation of gene expression	GO:0010468	1852	8	5,39	1,19
biological adhesion	GO:0022610	540	3	1,57	1,16
cell adhesion	GO:0007155	540	3	1,57	1,16
embryonic development	GO:0009790	539	3	1,57	1,16
cell differentiation	GO:0030154	1336	6	3,89	1,12
proteolysis	GO:0006508	551	3	1,6	1,12
anatomical structure development	GO:0048856	1940	8	5,65	1,05

## 7.6 Bibliospheranalyse der molekularen Funktionen der 87 zwischen M1 NE und M1 HG signifikant unterschiedlich regulierten Gene

Funktion	ID	Total	Beobachtet	Erwartet	Zscore
GTPase activity	GO:0003924	126	5	0,37	7,69
GTP binding	GO:0005525	283	5	0,82	4,65
guanyl nucleotide binding	GO:0019001	291	5	0,85	4,56
guanyl ribonucleotide binding	GO:0032561	291	5	0,85	4,56
nucleoside-triphosphatase activity	GO:0017111	409	5	1,19	3,54
pyrophosphatase activity	GO:0016462	426	5	1,24	3,42
hydrolase activity, acting on acid anhydrides	GO:0016817	428	5	1,25	3,41
hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides	GO:0016818	428	5	1,25	3,41
hydrolase activity	GO:0016787	1726	12	5,02	3,29
catalytic activity	GO:0003824	4192	21	12,2	2,9
molecular function	GO:0003674	11768	42	34,26	2,36
binding	GO:0005488	8732	32	25,42	1,86
ribonucleotide binding	GO:0032553	1407	7	4,1	1,5
purine ribonucleotide binding	GO:0032555	1407	7	4,1	1,5
purine nucleotide binding	GO:0017076	1461	7	4,25	1,39
protein binding	GO:0005515	4577	17	13,32	1,18
transcription regulator activity	GO:0030528	1055	5	3,07	1,14
nucleotide binding	GO:0000166	1641	7	4,78	1,07
nucleic acid binding	GO:0003676	2222	9	6,47	1,07

## 7.7 Bibliosphereanalyse der biologischen Prozesse mit den 313 zwischen M1 HG und M1 B27 signifikant unterschiedlich regulierten Genen

Prozess	ID	Total	Beobachtet	Erwartet	Zscore
growth	GO:0040007	286	15	2,83	7,33
regulation of growth	GO:0040008	174	11	1,72	7,14
enzyme linked receptor protein signalling pathway	GO:0007167	268	14	2,65	7,06
neurogenesis	GO:0022008	401	17	3,97	6,65
generation of neurons	GO:0048699	379	16	3,75	6,43
cell differentiation	GO:0030154	1336	35	13,22	6,27
neuron development	GO:0048666	254	12	2,51	6,06
system development	GO:0048731	1745	41	17,27	6,05
cell growth	GO:0016049	102	7	1,01	6,01
nervous system development	GO:0007399	689	22	6,82	5,96
cell proliferation	GO:0008283	548	19	5,42	5,95
odontogenesis of dentine-containing tooth	GO:0042475	38	4	0,38	5,95
neuron differentiation	GO:0030182	337	14	3,34	5,93
negative regulation of developmental process	GO:0051093	338	14	3,35	5,91
biological process	GO:0008150	11052	146	109,38	5,89
negative regulation of kinase activity	GO:0033673	39	4	0,39	5,85
negative regulation of protein kinase activity	GO:0006469	39	4	0,39	5,85
cell development	GO:0048468	657	21	6,5	5,83
cellular developmental process	GO:0048869	1456	35	14,41	5,7
odontogenesis	GO:0042476	41	4	0,41	5,68
negative regulation of transferase activity	GO:0051348	41	4	0,41	5,68
regulation of cell growth	GO:0001558	85	6	0,84	5,67
response to stimulus	GO:0050896	1652	38	16,35	5,66
cellular process	GO:0009987	8768	123	86,78	5,59
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signalling pathway	GO:0007169	176	9	1,74	5,56
multicellular organismal development	GO:0007275	2211	46	21,88	5,55
regulation of cell size	GO:0008361	115	7	1,14	5,54
steroid metabolic process	GO:0008202	145	8	1,44	5,53
organ morphogenesis	GO:0009887	549	18	5,43	5,51
segmentation	GO:0035282	44	4	0,44	5,44
neurite development	GO:0031175	218	10	2,16	5,4
neurite morphogenesis	GO:0048812	185	9	1,83	5,35
tissue remodeling	GO:0048771	68	5	0,67	5,31
anatomical structure development	GO:0048856	1940	41	19,2	5,31
neuron morphogenesis during differentiation	GO:0048667	187	9	1,85	5,31
cholesterol metabolic process	GO:0008203	70	5	0,69	5,21
developmental process	GO:0032502	2831	53	28,02	5,19
multicellular organismal process	GO:0032501	2811	52	27,82	5,04
extracellular structure organization and biogenesis	GO:0043062	101	6	1	5,04
tissue development	GO:0009888	363	13	3,59	5,04
sterol metabolic process	GO:0016125	75	5	0,74	4,98
epidermis morphogenesis	GO:0048730	78	5	0,77	4,85
immune response	GO:0006955	428	14	4,24	4,83
cellular morphogenesis during differentiation	GO:0000904	212	9	2,1	4,82
axonogenesis	GO:0007409	175	8	1,73	4,81

Prozess	ID	Total	Beobachtet	Erwartet	Zscore
cell surface receptor linked signal transduction	GO:0007166	1222	28	12,09	4,77
anatomical structure morphogenesis	GO:0009653	1105	26	10,94	4,73
cell part morphogenesis	GO:0032990	305	11	3,02	4,66
cell projection organization and biogenesis	GO:0030030	305	11	3,02	4,66
cell projection morphogenesis	GO:0048858	305	11	3,02	4,66
tissue morphogenesis	GO:0048729	113	6	1,12	4,65
cell migration	GO:0016477	310	11	3,07	4,59
blood vessel morphogenesis	GO:0048514	188	8	1,86	4,55
transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signalling pathway	GO:0007178	86	5	0,85	4,53
negative regulation of catalytic activity	GO:0043086	59	4	0,58	4,5
developmental growth	GO:0048589	60	4	0,59	4,45
negative regulation of cell differentiation	GO:0045596	123	6	1,22	4,37
organ development	GO:0048513	1446	30	14,31	4,36
sulfur metabolic process	GO:0006790	62	4	0,61	4,35
epidermis development	GO:0008544	133	6	1,32	4,12
regulation of anatomical structure morphogenesis	GO:0022603	99	5	0,98	4,09
cell motility	GO:0006928	358	11	3,54	4,02
localization of cell	GO:0051674	358	11	3,54	4,02
blood vessel development	GO:0001568	218	8	2,16	4,02
vasculature development	GO:0001944	221	8	2,19	3,98
ectoderm development	GO:0007398	140	6	1,39	3,96
lipid catabolic process	GO:0016042	105	5	1,04	3,92
anti-apoptosis	GO:0006916	74	4	0,73	3,85
biological adhesion	GO:0022610	540	14	5,34	3,82
cell adhesion	GO:0007155	540	14	5,34	3,82
muscle development	GO:0007517	189	7	1,87	3,79
ossification	GO:0001503	110	5	1,09	3,78
biomineral formation	GO:0031214	111	5	1,1	3,75
proteolysis	GO:0006508	551	14	5,45	3,74
regionalization	GO:0003002	198	7	1,96	3,64
regulation of biological process	GO:0050789	4655	67	46,07	3,63
alcohol metabolic process	GO:0006066	252	8	2,49	3,53
regulation of developmental process	GO:0050793	766	17	7,58	3,52
response to stress	GO:0006950	894	19	8,85	3,52
regulation of cellular process	GO:0050794	4461	64	44,15	3,49
pattern specification process	GO:0007389	255	8	2,52	3,49
cellular structure morphogenesis	GO:0032989	414	11	4,1	3,47
cell morphogenesis	GO:0000902	414	11	4,1	3,47
response to wounding	GO:0009611	308	9	3,05	3,46
biological regulation	GO:0065007	4954	69	49,03	3,4
tube development	GO:0035295	214	7	2,12	3,39
regulation of cell proliferation	GO:0042127	377	10	3,73	3,3
axon guidance	GO:0007411	91	4	0,9	3,29
regulation of multicellular organismal process	GO:0051239	273	8	2,7	3,27
cell fate commitment	GO:0045165	132	5	1,31	3,26
skeletal development	GO:0001501	176	6	1,74	3,26
lipid metabolic process	GO:0006629	558	13	5,52	3,25
negative regulation of apoptosis	GO:0043066	177	6	1,75	3,24
wound healing	GO:0042060	93	4	0,92	3,23
cell death	GO:0008219	688	15	6,81	3,22
negative regulation of programmed cell death	GO:0043069	181	6	1,79	3,18
death	GO:0016265	697	15	6,9	3,16
regulation of cell differentiation	GO:0045595	233	7	2,31	3,13

Prozess	ID	Total	Beobachtet	Erwartet	Zscore
immune system process	GO:0002376	704	15	6,97	3,12
response to biotic stimulus	GO:0009607	186	6	1,84	3,1
catabolic process	GO:0009056	519	12	5,14	3,09
response to other organism	GO:0051707	141	5	1,4	3,08
striated muscle development	GO:0014706	141	5	1,4	3,08
regulation of protein kinase activity	GO:0045859	141	5	1,4	3,08
anterior/posterior pattern formation	GO:0009952	142	5	1,41	3,06
apoptosis	GO:0006915	652	14	6,45	3,04
negative regulation of cellular process	GO:0048523	934	18	9,24	2,98
programmed cell death	GO:0012501	662	14	6,55	2,98
regulation of kinase activity	GO:0043549	146	5	1,44	2,98
membrane organization and biogenesis	GO:0016044	246	7	2,43	2,96
negative regulation of biological process	GO:0048519	1014	19	10,04	2,93
immune effector process	GO:0002252	149	5	1,47	2,93
signal transduction	GO:0007165	2242	35	22,19	2,93
chordate embryonic development	GO:0043009	303	8	3	2,93
regulation of transferase activity	GO:0051338	149	5	1,47	2,93
positive regulation of biological process	GO:0048518	1021	19	10,1	2,9
tube morphogenesis	GO:0035239	151	5	1,49	2,89
embryonic development ending in birth or egg hatching	GO:0009792	308	8	3,05	2,88
cellular lipid metabolic process	GO:0044255	487	11	4,82	2,87
response to external stimulus	GO:0009605	489	11	4,84	2,86
adaptive immune response	GO:0002250	108	4	1,07	2,86
adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	GO:0002460	108	4	1,07	2,86
circulatory system process	GO:0003013	110	4	1,09	2,81
blood circulation	GO:0008015	110	4	1,09	2,81
skeletal muscle development	GO:0007519	111	4	1,1	2,79
response to chemical stimulus	GO:0042221	377	9	3,73	2,77
positive regulation of cell proliferation	GO:0008284	209	6	2,07	2,76
cell communication	GO:0007154	2494	37	24,68	2,69
regulation of biological quality	GO:0065008	858	16	8,49	2,66
multi-organism process	GO:0051704	220	6	2,18	2,62
reproductive process	GO:0022414	225	6	2,23	2,56
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0045944	281	7	2,78	2,56
cellular catabolic process	GO:0044248	404	9	4	2,54
positive regulation of biosynthetic process	GO:0009891	410	9	4,06	2,5
cellular component organization and biogenesis	GO:0016043	1512	24	14,96	2,46
behavior	GO:0007610	352	8	3,48	2,46
positive regulation of cellular process	GO:0048522	904	16	8,95	2,43
cellular macromolecule metabolic process	GO:0044260	2173	32	21,51	2,43
Wnt receptor signalling pathway	GO:0016055	130	4	1,29	2,41
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0006357	489	10	4,84	2,39
protein modification process	GO:0006464	1099	18	10,88	2,24
positive regulation of RNA metabolic process	GO:0051254	317	7	3,14	2,21
positive regulation of transcription, DNA-dependent	GO:0045893	317	7	3,14	2,21
biopolymer modification	GO:0043412	1125	18	11,13	2,14
negative regulation of cell proliferation	GO:0008285	147	4	1,45	2,13
transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0006366	529	10	5,24	2,13
regulation of signal transduction	GO:0009966	394	8	3,9	2,11
positive regulation of cellular metabolic process	GO:0031325	464	9	4,59	2,1

Prozess	ID	Total	Beobachtet	Erwartet	Zscore
positive regulation of macromolecule biosynthetic process	GO:0010557	395	8	3,91	2,1
positive regulation of metabolic process	GO:0009893	470	9	4,65	2,05
post-translational protein modification	GO:0043687	913	15	9,04	2,05
cellular protein metabolic process	GO:0044267	2061	29	20,4	2,04
inflammatory response	GO:0006954	217	5	2,15	1,97
protein metabolic process	GO:0019538	2102	29	20,8	1,93
regulation of cellular component organization and biogenesis	GO:0051128	222	5	2,2	1,91
regulation of apoptosis	GO:0042981	424	8	4,2	1,89
positive regulation of transcription	GO:0045941	359	7	3,55	1,86
regulation of programmed cell death	GO:0043067	430	8	4,26	1,85
anion transport	GO:0006820	167	4	1,65	1,84
positive regulation of gene expression	GO:0010628	363	7	3,59	1,83
defense response	GO:0006952	366	7	3,62	1,8
protein catabolic process	GO:0030163	171	4	1,69	1,79
endocytosis	GO:0006897	172	4	1,7	1,78
membrane invagination	GO:0010324	172	4	1,7	1,78
positive regulation of macromolecule metabolic process	GO:0010604	441	8	4,36	1,77
positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	GO:0045935	373	7	3,69	1,75
regulation of response to stimulus	GO:0048583	177	4	1,75	1,72
protein amino acid phosphorylation	GO:0006468	601	10	5,95	1,7
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0000122	182	4	1,8	1,66
embryonic development	GO:0009790	539	9	5,33	1,62
nitrogen compound metabolic process	GO:0006807	266	5	2,63	1,48
cellular ion homeostasis	GO:0006873	197	4	1,95	1,48
chemical homeostasis	GO:0048878	271	5	2,68	1,43
oxidation reduction	GO:0055114	496	8	4,91	1,42
cellular chemical homeostasis	GO:0055082	203	4	2,01	1,42
regulation of protein metabolic process	GO:0051246	273	5	2,7	1,42
cellular metabolic process	GO:0044237	5308	61	52,53	1,41
phosphorylation	GO:0016310	659	10	6,52	1,4
cellular carbohydrate metabolic process	GO:0044262	206	4	2,04	1,39
regulation of catalytic activity	GO:0050790	285	5	2,82	1,32
localization	GO:0051179	2531	31	25,05	1,29
reproduction	GO:0000003	441	7	4,36	1,28
locomotory behavior	GO:0007626	218	4	2,16	1,27
central nervous system development	GO:0007417	290	5	2,87	1,27
ion homeostasis	GO:0050801	218	4	2,16	1,27
phosphorus metabolic process	GO:0006793	775	11	7,67	1,24
phosphate metabolic process	GO:0006796	775	11	7,67	1,24
metabolic process	GO:0008152	5805	65	57,45	1,23
regulation of cellular protein metabolic process	GO:0032268	223	4	2,21	1,22
biopolymer catabolic process	GO:0043285	224	4	2,22	1,21
primary metabolic process	GO:0044238	5139	58	50,86	1,2
anatomical structure formation	GO:0048646	227	4	2,25	1,18
sexual reproduction	GO:0019953	305	5	3,02	1,16
negative regulation of transcription, DNA-dependent	GO:0045892	231	4	2,29	1,15
negative regulation of RNA metabolic process	GO:0051253	232	4	2,3	1,14
negative regulation of biosynthetic process	GO:0009890	313	5	3,1	1,1

## 7.8 Bibliospheranalyse der molekularen Funktionen der 313 zwischen M1 HG und M1 B27 signifikant unterschiedlich regulierten Gene

Funktion	ID	Total	Beobachtet	Erwartet	Zscore
heparin binding	GO:0008201	62	9	0,61	10,78
growth factor activity	GO:0008083	146	14	1,44	10,54
polysaccharide binding	GO:0030247	85	10	0,84	10,06
pattern binding	GO:0001871	91	10	0,9	9,66
glycosaminoglycan binding	GO:0005539	78	9	0,77	9,43
insulin-like growth factor binding	GO:0005520	19	4	0,19	8,84
growth factor binding	GO:0019838	48	6	0,48	8,07
lipid transporter activity	GO:0005319	49	5	0,48	6,53
protein kinase regulator activity	GO:0019887	49	5	0,48	6,53
molecular function	GO:0003674	11768	152	116,47	5,9
kinase regulator activity	GO:0019207	60	5	0,59	5,76
carbohydrate binding	GO:0030246	246	11	2,43	5,56
protein binding	GO:0005515	4577	76	45,3	5,35
receptor binding	GO:0005102	575	18	5,69	5,27
enzyme inhibitor activity	GO:0004857	182	8	1,8	4,67
binding	GO:0005488	8732	116	86,42	4,56
hormone activity	GO:0005179	110	5	1,09	3,78
serine-type endopeptidase inhibitor activity	GO:0004867	85	4	0,84	3,47
endopeptidase inhibitor activity	GO:0004866	124	5	1,23	3,43
structural molecule activity	GO:0005198	425	11	4,21	3,37
protease inhibitor activity	GO:0030414	127	5	1,26	3,37
enzyme regulator activity	GO:0030234	559	13	5,53	3,24
monooxygenase activity	GO:0004497	108	4	1,07	2,86
serine hydrolase activity	GO:0017171	159	5	1,57	2,76
serine-type peptidase activity	GO:0008236	159	5	1,57	2,76
endopeptidase activity	GO:0004175	335	8	3,32	2,61
cysteine-type peptidase activity	GO:0008234	124	4	1,23	2,52
calcium ion binding	GO:0005509	711	13	7,04	2,31
transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	GO:0016772	866	15	8,57	2,26
serine-type endopeptidase activity	GO:0004252	147	4	1,45	2,13
peptidase activity	GO:0008233	530	10	5,25	2,12
kinase activity	GO:0016301	757	13	7,49	2,07
iron ion binding	GO:0005506	277	6	2,74	1,99
catalytic activity	GO:0003824	4192	52	41,49	1,89
molecular transducer activity	GO:0060089	1523	22	15,07	1,88
signal transducer activity	GO:0004871	1523	22	15,07	1,88
protein kinase activity	GO:0004672	529	9	5,24	1,68
oxidoreductase activity	GO:0016491	608	10	6,02	1,66
electron carrier activity	GO:0009055	191	4	1,89	1,55
transferase activity	GO:0016740	1459	20	14,44	1,54
enzyme activator activity	GO:0008047	193	4	1,91	1,53
receptor activity	GO:0004872	1303	18	12,9	1,49
cytokine activity	GO:0005125	201	4	1,99	1,44
guanyl nucleotide binding	GO:0019001	291	5	2,88	1,27
guanyl ribonucleotide binding	GO:0032561	291	5	2,88	1,27
hydrolase activity	GO:0016787	1726	22	17,08	1,26
phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	GO:0016773	620	9	6,14	1,18

<b>Funktion</b>	<b>ID</b>	<b>Total</b>	<b>Beobachtet</b>	<b>Erwartet</b>	<b>Zscore</b>
substrate-specific transporter activity	GO:0022892	821	11	8,13	1,04

## 7.9 Mit Zelldifferenzierung assoziierte Gene der 313 zwischen M1 HG und M1 B27 signifikant unterschiedlich regulierten Gene

<b>Regulatorische Funktion</b>	<b>Gensymbol</b>	<b>Genname</b>
Keine	Agri	agrin
Keine	Ank3	ankyrin 3, epithelial
Keine	ApoE	apolipoprotein E
Keine	Axin2	axin2
Keine	Cav1	caveolin, caveolae protein 1
Keine	Cdkn1c	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)
TF	Dlx1	distal-less homeobox 1
Keine	Ercc1	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
Keine	Fhl1	four and a half LIM domains 1
TF	Foxc1	forkhead box C1
Keine	Fst	follistatin
Keine	Fzd5	frizzled homolog 5 (Drosophila)
Keine	Gap43	growth associated protein 43
Keine	Gas7	growth arrest specific 7
Keine	Gdnf	glial cell line derived neurotrophic factor
TF	Hoxd10	homeo box D10
Keine	Igf1	insulin-like growth factor 1
Keine	Itga3	integrin alpha 3
Keine	Ivl	involucrin
Keine	Klk8	kallikrein related-peptidase 8
Keine	Lor	loricrin
Keine	Mdk	midkine
Keine	Mgp	matrix Gla protein
Keine	NGFR p75	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
Keine	Nrn1	neuritin 1
Keine	Prl2c2	prolactin family 2, subfamily c, member 2
Keine	Ptprz1	protein tyrosine signalling, receptor type Z, polypeptide 1
Keine	Sema6d	sema domain, transmembrane domain, and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D
Keine	Serpine2	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 2
Keine	Sfrp1	secreted frizzled-related protein 1
TF	Smarca1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1
Keine	Spp1	secreted phosphoprotein 1
Keine	Tgfb2	transforming growth factor, beta 2
Keine	Tmem176b	transmembrane protein 176B
TF	Zfp2	zinc finger protein, multitype 2

**7.10 187 aus den 384 ausgewählten Markergenen sind zwischen mJ und M1 HG signifikant unterschiedlich reguliert**

GENSYMBOL	mJ vs M1HG Verhältnis	linearer Mittelwert der Replikate			
		mJ	M1 HG	M1B27	M1 NE
Krt8	320,030	8814	28	23	24
Krt18	198,307	3272	16	15	17
Wnt10a	152,908	2167	14	17	18
Wnt7b	89,049	1526	17	21	21
Krt14	75,165	1684	22	61	18
Gata6	53,967	950	18	42	18
Krt19	43,205	2056	49	37	45
Trf	30,984	889	28	26	24
Cdh1	25,188	535	21	21	18
Hhex	20,429	740	36	17	29
Itga3	16,692	2264	135	762	87
Hnf4a	13,271	365	27	32	23
Pdx1	13,114	168	13	13	13
Tgm2	13,008	2525	194	43	194
Foxa2	11,969	169	14	16	16
HNF1b	11,687	160	14	19	19
Cdx2	9,906	197	20	43	19
HNF1b	9,600	159	17	15	17
Col18a1	9,254	1618	174	105	183
Wnt7a	8,053	137	17	20	15
Nes	6,966	315	45	106	33
Edn1	6,757	705	104	42	108
Itgb4	6,119	378	63	43	61
Afp	5,961	71	12	15	11
H2-K1	5,840	151	26	22	25
Bmp4	5,058	409	81	20	40
Nfib	4,744	97	20	18	24
Ptpkr	4,234	1861	444	178	617
Itgb4	4,197	166	40	30	33
Nfib	4,159	611	148	157	136
Itgb6	4,126	183	44	119	70
Nfib	3,933	56	14	17	15
Id2	3,709	699	187	105	218
Foxa1	3,650	53	14	13	12
Wnt7b	3,589	83	23	65	25
Mtap2	3,436	127	37	38	47
Cdc25c	3,355	174	52	91	79
Nes	3,237	53	17	15	17
Ets1	3,222	980	305	362	337
Nfib	3,222	116	36	31	33
Egfr	3,190	897	281	504	194
Col18a1	3,134	60	19	14	20
Cd44	3,084	69	23	23	22

GENSYMBOL	mJ vs M1HG Verhältnis	linearer Mittelwert der Replikate			
		mJ	M1 HG	M1B27	M1 NE
Nfib	2,994	61	20	22	22
Cdc25c	2,940	170	58	62	71
Itgb6	2,915	85	30	86	33
Lmx1a	2,871	43	15	17	17
Tfrc	2,668	1804	677	478	951
Fzd6	2,641	134	51	36	61
Tfrc	2,559	1882	732	436	905
Jag1	2,555	56	22	17	19
Casp3	2,530	24	9	12	15
Srd5a1	2,521	72	28	19	33
Nfib	2,518	43	17	15	17
Fzd6	2,475	162	66	52	68
Tmpo	2,467	255	103	89	115
Tmpo	2,466	320	129	88	114
Pdgfa	2,378	1116	466	1081	632
Cd44	2,376	39	16	21	15
Trp53	2,261	56	25	32	32
Bcl2	2,198	57	26	26	32
Casp7	2,156	121	56	90	52
Ptprk	2,150	56	26	15	23
Cdh1	2,149	37	18	15	18
Fgfr3	2,145	40	19	26	17
Tgfbr1	2,125	1149	548	400	757
Mki67	2,057	535	258	273	290
ErbB2	2,024	101	50	68	84
Dot1l	2,005	124	62	57	86
Casp4	0,499	61	121	39	83
Maf	0,495	17	34	22	35
Snai1	0,493	15	30	27	40
Tmsb4x	0,486	3998	8300	13060	8238
Fn1	0,483	20	45	96	93
Stat3	0,475	346	738	922	935
Mef2c	0,472	24	50	42	72
Vdr	0,468	23	48	20	57
Hoxa9	0,455	22	47	35	54
Mxd4	0,448	29	65	128	58
Casp4	0,447	160	356	55	238
Wnt4	0,446	22	50	20	57
Stat5a	0,445	54	120	94	121
Ivl	0,440	20	46	164	35
Bdnf	0,437	20	45	94	46
Hes1	0,437	211	482	349	521
Vim	0,435	1138	2580	5935	3406
Igf1	0,430	17	38	19	31
Hmga1	0,424	785	1859	4969	1997
Notch4	0,418	40	96	96	85
Fhl1	0,416	1332	3194	819	5642
Hgf	0,416	14	34	43	35
Mxd4	0,410	45	109	157	121

GENSYMBOL	mJ vs M1HG Verhältnis	linearer Mittelwert der Replikate			
		mJ	M1 HG	M1B27	M1 NE
Fhl1	0,396	1269	3209	849	5493
Chrd	0,392	22	56	38	53
Stat3	0,387	38	98	50	80
Dlx2	0,387	15	38	53	59
Tgfb3	0,372	117	311	67	355
Bdnf	0,370	15	41	26	53
Hoxa9	0,368	20	54	86	64
Dkk3	0,357	18	52	21	89
Fgfr1	0,351	18	51	43	51
Fut4	0,350	22	64	61	65
Bdnf	0,350	345	988	1051	1124
Ppap2a	0,345	34	98	69	106
Ppap2a	0,338	20	58	27	51
Vcan	0,326	14	44	57	53
Hoxc13	0,325	20	61	15	89
Pparg	0,321	42	130	163	164
Il1ra1	0,321	242	757	418	671
Il1ra1	0,316	720	2273	1665	2229
Fn1	0,294	18	64	79	87
Itga5	0,276	27	94	156	112
Irf9	0,270	20	76	28	60
Inhba	0,255	302	1187	2394	1403
Timp2	0,244	2576	10543	7170	8331
Gap43	0,243	13	53	1701	33
Col6a1	0,237	10	47	37	87
Id3	0,232	92	392	305	373
Pou4f1	0,231	10	43	8	25
Adam12	0,225	15	68	124	79
Tnc	0,222	17	77	128	77
Ppap2a	0,222	224	1011	559	1070
Mef2c	0,219	32	145	50	223
Irf9	0,218	72	335	137	192
Dlx2	0,216	17	77	143	127
Fst	0,209	25	119	1294	126
Cd34	0,209	20	97	72	42
Pfn2	0,208	146	700	1102	629
Ctsl	0,200	17	89	89	83
Igfbp4	0,191	18	95	172	54
Fzd7	0,190	77	403	402	521
Pfn2	0,184	111	603	899	518
Fn1	0,168	21	126	66	114
Ptn	0,165	15	90	21	285
Ltbp1	0,164	74	451	958	389
Bnc1	0,141	44	311	354	225
Itga5	0,139	56	402	806	548
Wnt5a	0,127	16	122	299	98
Tac1	0,127	14	108	106	95
Ly6a	0,120	2173	17884	3575	13217
Ncam1	0,118	29	245	146	351

GENSYMBOL	mJ vs M1HG Verhältnis	linearer Mittelwert der Replikate			
		mJ	M1 HG	M1B27	M1 NE
NGFR p75	0,113	18	163	20	35
Vdr	0,110	16	146	74	152
Tcf3	0,107	93	869	679	849
Hoxb2	0,107	18	167	123	151
Snai1	0,103	32	314	273	393
Gja1	0,102	1180	11550	10458	8967
Cryab	0,098	258	2636	736	1977
Fzd2	0,095	37	396	398	380
Gdnf	0,092	13	148	26	137
Sfrp1	0,091	22	248	18	159
Igfbp4	0,090	22	254	270	137
Eng	0,089	23	253	304	232
S100a4	0,087	29	329	505	294
Gata3	0,087	21	237	32	267
Vdr	0,082	20	243	90	270
Twist1	0,078	28	362	444	392
Igf1	0,056	19	373	24	206
Igf1	0,056	21	397	22	237
Id4	0,054	13	228	76	240
Zic1	0,053	17	324	291	270
Fn1	0,049	98	1950	1230	1876
Tnc	0,044	120	2719	3423	2728
Snai2	0,043	76	1768	1687	1779
H2-K1	0,042	21	484	399	254
Tnc	0,039	83	2126	2503	1978
Wnt5a	0,030	16	531	1263	387
Sfrp1	0,026	13	541	10	242
Col6a1	0,022	49	2209	1843	2803
Col6a1	0,017	61	3500	3080	4092
Ndn	0,015	20	1336	2760	1075
Acta2	0,012	21	1769	1197	1857
Pdgfra	0,010	16	1654	1081	1111
Casp1	0,009	14	1410	1624	993
Acta2	0,007	22	3341	1931	2930
Fgf7	0,006	21	3173	3903	2944
Dkk3	0,006	14	2336	1492	2256
Dkk3	0,005	16	3194	2019	3235
Igfbp5	0,004	20	5266	975	3982
Igfbp5	0,003	21	6786	1145	4270
Lpl	0,003	21	7925	328	4182
Igfbp5	0,003	17	6421	1215	4435
Bgn	0,002	23	9660	14061	9588
Acta2	0,002	21	10921	6651	12436
Acta2	0,002	35	21050	21646	19188

## 7.11 Markergene der Prioritätsstufe 1

GENSYMBOL	Priorität 1	GENSYMBOL	Priorität 1
Krt20	Cytokeratine	Abcg2	Stammzellen
Krt10	Cytokeratine	Cd200	Stammzellen
Krt14	Cytokeratine	Cd200	Stammzellen
Krt15	Cytokeratine	Cd200	Stammzellen
Krt16	Cytokeratine	Fut4	Stammzellen
Krt17	Cytokeratine	Kit	Stammzellen
Krt18	Cytokeratine	Kit	Stammzellen
Krt19	Cytokeratine	Kit	Stammzellen
Krt5	Cytokeratine	Lhx2	Stammzellen
Krt8	Cytokeratine	Msi1	Stammzellen
Abcc8	Inselzellen	Nanog	Stammzellen
Abcc8	Inselzellen	Nanog	Stammzellen
Chga	Inselzellen	Nes	Stammzellen
Chga	Inselzellen	Nes	Stammzellen
Chga	Inselzellen	Pou5f1	Stammzellen
Gad1	Inselzellen	Pou5f1	Stammzellen
Gad1	Inselzellen	S100a4	Stammzellen
Gad1	Inselzellen	S100a6	Stammzellen
Gad1	Inselzellen	Shh	Stammzellen
Gad2	Inselzellen	Shh	Stammzellen
Gcg	Inselzellen	Sycp3	Stammzellen
Gck	Inselzellen	T	Stammzellen
Ins1	Inselzellen	Arx	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Ins2	Inselzellen	Bhlhb8	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Kcnj11	Inselzellen	Bhlhb8	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Ppy	Inselzellen	Cer1	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Ptprn	Inselzellen	Cer1	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Ptprn	Inselzellen	Cpa1	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Ptprn	Inselzellen	Cxcr4	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Ptprn2	Inselzellen	Dkk1	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Ptprn2	Inselzellen	Dkk3	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Ptprn2	Inselzellen	Dkk3	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Slc2a2	Inselzellen	Dkk3	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Slc2a2	Inselzellen	Dkk4	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Slc2a2	Inselzellen	Hhex	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Slc2a2	Inselzellen	Isl1	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Slc30a8	Inselzellen	Mafa	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Slc30a8	Inselzellen	Mafa	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen

<b>GENSYMBOL</b>	<b>Priorität 1</b>	<b>GENSYMBOL</b>	<b>Priorität 1</b>
Slc30a8	Inselzellen	Mafb	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Sst	Inselzellen	Mixl1	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Syp	Inselzellen	Mixl1	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Afp	Pankreas/Leber	Myc	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Alb	Pankreas/Leber	Myc	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Amy2	Pankreas/Leber	Myt1	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Dpp4	Pankreas/Leber	Neurod1	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Dpp4	Pankreas/Leber	Neurog3	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
G6pc	Pankreas/Leber	Nkx2-2	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Ggt1	Pankreas/Leber	Nkx2-2	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Lipe	Pankreas/Leber	Nkx2-5	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Lipe	Pankreas/Leber	Nkx6-1	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Lipe	Pankreas/Leber	Pax3	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Met	Pankreas/Leber	Pax4	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Tmsb4x	Pankreas/Leber	Pax6	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Tmsb4x	Pankreas/Leber	Pax6	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen
Trf	Pankreas/Leber	Pdx1	Transkriptionsfaktoren /Endokrine Zellen

## 7.12 Markergene der Prioritätsstufe 2

<b>GENSYMBOL</b>	<b>Priorität 2</b>	<b>GENSYMBOL</b>	<b>Priorität 2</b>
Gjb2	Connexine	Hes6	Laterale Inhibition
Gja1	Connexine	Hes5	Laterale Inhibition
Gja8	Connexine	Numb	Laterale Inhibition
Gja3	Connexine	Dlx2	Laterale Inhibition
Gjd2	Connexine	Notch2	Laterale Inhibition
Gjb1	Connexine	Numb	Laterale Inhibition
Gjb2	Connexine	Hes6	Laterale Inhibition
Gjd2	Connexine	Numb	Laterale Inhibition
Gjd2	Connexine	Bmp4	Mesoderm
Gjb2	Connexine	Vim	Mesoderm
NGFR p75	Ektoderm/Neurone	Bmp4	Mesoderm
Gap43	Ektoderm/Neurone	Vim	Mesoderm
Mtap2	Ektoderm/Neurone	Acta2	Muskel
Mtap2	Ektoderm/Neurone	Mef2c	Muskel
Mtap2	Ektoderm/Neurone	Mef2c	Muskel
Mtap2	Ektoderm/Neurone	Myod1	Muskel
Sox5	Ektoderm/Neurone	Acta2	Muskel
Neurog2	Ektoderm/Neurone	Des	Muskel
Sox5	Ektoderm/Neurone	Mef2c	Muskel
Gfap	Ektoderm/Neurone	Acta2	Muskel
Th	Ektoderm/Neurone	Mef2c	Muskel
Mtap2	Ektoderm/Neurone	Acta2	Muskel
Sox10	Ektoderm/Neurone	Acta2	Muskel
Sox30	Ektoderm/Neurone	Mef2c	Muskel
NGFR p75	Ektoderm/Neurone	Myf5	Muskel, Muskel Rezeptoren
Sox7	Ektoderm/Neurone	Itga3	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox13	Ektoderm/Neurone	Acvr11	/Proteinmarker Rezeptoren
Neurog1	Ektoderm/Neurone	Itga6	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox3	Ektoderm/Neurone	Acvr2b	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox2	Ektoderm/Neurone	Fgfr3	/Proteinmarker Rezeptoren
Tubb3	Ektoderm/Neurone	Itgb1	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox21	Ektoderm/Neurone	Fgfr4	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox14	Ektoderm/Neurone	Itga5	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox18	Ektoderm/Neurone	Fgfr1	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox15	Ektoderm/Neurone	Inhba	/Proteinmarker Rezeptoren
Ascl1	Ektoderm/Neurone	Fgfr2	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox1	Ektoderm/Neurone	Itga6	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox17	Ektoderm/Neurone	Acvr11	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox9	Ektoderm/Neurone	Fgfr3	/Proteinmarker Rezeptoren
Gfap	Ektoderm/Neurone	Fgfr1	Rezeptoren

<b>GENSYMBOL</b>	<b>Priorität 2</b>	<b>GENSYMBOL</b>	<b>Priorität 2</b>
			/Proteinmarker Rezeptoren
Mtap2	Ektoderm/Neurone	Itgb1	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox5	Ektoderm/Neurone	Itga5	/Proteinmarker Rezeptoren
NGFR p75	Ektoderm/Neurone	Itga6	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox7	Ektoderm/Neurone	Fgfr2	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox2	Ektoderm/Neurone	Itga6	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox14	Ektoderm/Neurone	Fgfr2	/Proteinmarker Rezeptoren
Sox21	Ektoderm/Neurone	Fgfr2	/Proteinmarker
Sox30	Ektoderm/Neurone	Fzd4	WNT-Signalling
Sox17	Ektoderm/Neurone	Dvl1	WNT-Signalling
Neurog2	Ektoderm/Neurone	Wnt8a	WNT-Signalling
Sox3	Ektoderm/Neurone	Wnt3a	WNT-Signalling
Sox9	Ektoderm/Neurone	Wnt11	WNT-Signalling
Mtap2	Ektoderm/Neurone	Lef1	WNT-Signalling
Sox5	Ektoderm/Neurone	Wnt5a	WNT-Signalling
Sox7	Ektoderm/Neurone	Wnt7a	WNT-Signalling
Sox21	Ektoderm/Neurone	Wnt2	WNT-Signalling
Mtap2	Ektoderm/Neurone	Wnt10b	WNT-Signalling
Sox5	Ektoderm/Neurone	Wnt7b	WNT-Signalling
Gata3	Endoderm	Wnt1	WNT-Signalling
Foxa2	Endoderm	Wnt4	WNT-Signalling
Irf9	Endoderm	Fzd7	WNT-Signalling
Bcl11a	Endoderm	Fzd8	WNT-Signalling
Foxa1	Endoderm	Ctnnb1	WNT-Signalling
Gata1	Endoderm	Fzd1	WNT-Signalling
Mnx1	Endoderm	Tcf3	WNT-Signalling
Gata4	Endoderm	Fzd6	WNT-Signalling
Foxa2	Endoderm	Fzd3	WNT-Signalling
Bcl11a	Endoderm	Dvl1	WNT-Signalling
Irf9	Endoderm	Lef1	WNT-Signalling
Mnx1	Endoderm	Wnt10b	WNT-Signalling
Gata1	Endoderm	Wnt5a	WNT-Signalling
Bcl11a	Endoderm	Wnt8a	WNT-Signalling
Dlx1	Laterale Inhibition	Ctnnb1	WNT-Signalling
Numb	Laterale Inhibition	Wnt7b	WNT-Signalling
Hes6	Laterale Inhibition	Fzd3	WNT-Signalling
Notch4	Laterale Inhibition	Fzd4	WNT-Signalling
Notch1	Laterale Inhibition	Wnt4	WNT-Signalling
Hes1	Laterale Inhibition	Fzd7	WNT-Signalling
Hes5	Laterale Inhibition	Fzd6	WNT-Signalling
Numb	Laterale Inhibition	Tcf3	WNT-Signalling
Notch2	Laterale Inhibition	Lef1	WNT-Signalling
Notch3	Laterale Inhibition	Wnt8a	WNT-Signalling
Hes3	Laterale Inhibition	Wnt5a	WNT-Signalling
Dlx2	Laterale Inhibition	Ctnnb1	WNT-Signalling
Notch4	Laterale Inhibition	Lef1	WNT-Signalling

### 7.13 Regulierte Gene innerhalb der ausgewählten Markergene der Priorität 1 und 2

GEN- SYMBOL	Priorität 1	Priorität 2	mJ vs M1HG	M1B27 vs M1HG	M1NE vs M1HG	Beadstudio		linearer Mittelwert der Replikate			
						M1NE vs M1HG	M1B27 vs M1HG	mJ	M1 HG	M1B27	M1 NE
Krt8	Cytokeratine		320,030	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	8814	28	23	24
Krt18	Cytokeratine		198,307	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	3272	16	15	17
Wnt7b		WNT-Signalling	89,049	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1526	17	21	21
Krt14	Cytokeratine		75,165	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1684	22	61	18
Krt19	Cytokeratine		43,205	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	2056	49	37	45
Trf	Pankreas Leber		30,984	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	889	28	26	24
Hhex	Transkriptionsfaktor en Endokrine Zellen		20,429	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	740	36	17	29
Itga3	Rezeptoren Proteinmarker		16,692	5,6557	n.s.	n.s.	n.s.	2264	135	762	87
Pdx1	Transkriptionsfaktor en Endokrine Zellen		13,114	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	168	13	13	13
Foxa2		Endoderm	11,969	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	169	14	16	16
Wnt7a		WNT-Signalling	8,053	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	137	17	20	15
Nes	Stammzelle n		6,966	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	315	45	106	33
Afp	Pankreas Leber		5,961	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	71	12	15	11
Bmp4		Mesoderm	5,058	n.s.	n.s.	n.s.	0,036	409	81	20	40
Foxa1		Endoderm	3,650	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	53	14	13	12
Wnt7b		WNT-Signalling	3,589	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	83	23	65	25
Mtap2		Ektoderm/Neurone	3,436	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	127	37	38	47
Nes	Stammzelle n		3,237	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	53	17	15	17
Fzd6		WNT-Signalling	2,641	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	134	51	36	61

GEN-SYMBOL	Priorität 1	Priorität 2	mJ vs M1HG	M1B27 vs M1HG	M1NE vs M1HG	Beadstudio		linearer Mittelwert der Replikate			
						M1NE vs M1HG	M1B27 vs M1HG	mJ	M1 HG	M1B27	M1 NE
Fzd6		WNT-Signalling	2,475	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	162	66	52	68
Fgfr3		Rezeptoren Proteinmarker	2,145	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	40	19	26	17
Slc2a2	Inselzellen		1,992	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	34	17	38	16
Lhx2	Stammzelle n		1,932	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	17	9	14	19
Itga6		Rezeptoren Proteinmarker	1,913	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	36	19	52	26
Mtap2		Ektoderm/Neurone	1,891	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	22	11	14	14
Mef2c		Muskel	1,866	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	18	10	12	11
Acvr2b		Rezeptoren Proteinmarker	1,799	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	152	84	109	91
Gja8		Connexine	1,759	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	13	7	11	10
Fgfr2		Rezeptoren Proteinmarker	1,736	n.s.	n.s.	n.s.	0,142	1156	661	102	833
Fzd3		WNT-Signalling	1,727	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	44	26	24	38
Met	Pankreas Leber		1,696	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	22	13	13	13
Cer1	Transkriptionsfaktore n		1,661	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	17	10	12	14
Slc30a8	Endokrine Zellen Inselzellen		1,656	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	17	10	14	13
Fgfr2		Rezeptoren Proteinmarker	1,534	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	42	27	32	32
Amy2	Pankreas Leber		1,515	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	19	13	15	16
Sox10		Ektoderm/Neurone	1,480	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	15	10	18	16
Mtap2		Ektoderm/Neurone	1,461	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	20	14	20	19
Nkx2-5	Transkriptionsfaktor en		1,386	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	31	22	22	23
Hes3	Endokrine Zellen	Laterale Inhibition	0,726	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	17	23	85	22

GEN-SYMBOL	Priorität 1	Priorität 2	mJ vs M1HG	M1B27 vs M1HG	M1NE vs M1HG	Beadstudio		linearer Mittelwert der Replikate			
						M1NE vs M1HG	M1B27 vs M1HG	mJ	M1 HG	M1B27	M1 NE
Fzd7		WNT-Signalling	0,689	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	11	16	16	20
Ptpn	Inselzellen		0,688	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	17	25	75	22
Krt15	Cytokeratine		0,684	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	14	21	8	15
Myc	Transkriptionsfaktoren	Endokrine Zellen	0,659	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	12	18	15	9
Fgfr1	Rezeptoren	Proteinmarker	0,655	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	15	22	17	23
Nkx6-1	Transkriptionsfaktoren	Endokrine Zellen	0,640	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	16	25	16	34
Mef2c	Muskel		0,622	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	13	20	19	27
Isl1	Transkriptionsfaktoren	Endokrine Zellen	0,608	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	15	25	24	23
Wnt2		WNT-Signalling	0,605	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	16	27	23	34
Notch3		Laterale Inhibition	0,603	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	16	26	29	21
Fzd8		WNT-Signalling	0,600	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	16	26	63	28
Krt20	Cytokeratine		0,563	19,3405	n.s.	n.s.	n.s.	16	28	547	29
Cd200	Stammzelle		0,563	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	15	27	20	28
Des	Muskel		0,554	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	22	40	30	34
Sox5	Ektoderm/Neurone		0,553	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	62	112	79	108
Sox7	Ektoderm/Neurone		0,512	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	15	29	20	25
Tmsb4x	Pankreas	Leber	0,486	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	3998	8300	13060	8238
Mef2c	Muskel		0,472	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	24	50	42	72
Wnt4		WNT-Signalling	0,446	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	22	50	20	57
Hes1		Laterale Inhibition	0,437	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	211	482	349	521
Vim	Mesoderm		0,435	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1138	2580	5935	3406
Notch4		Laterale Inhibition	0,418	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	40	96	96	85

GEN-SYMBOL	Priorität 1	Priorität 2	mJ vs M1HG	M1B27 vs M1HG	M1NE vs M1HG	Beadstudio		linearer Mittelwert der Replikate			
						M1NE vs M1HG	M1B27 vs M1HG	mJ	M1 HG	M1B27	M1 NE
Dlx2		Laterale Inhibition	0,387	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	15	38	53	59
Dkk3		Transkriptionsfaktor Endokrine Zellen	0,357	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	18	52	21	89
Fgfr1		Rezeptoren Proteinmarker	0,351	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	18	51	43	51
Fut4		Stammzellen Transkriptionsfaktor	0,350	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	22	64	61	65
Pparg		Endokrine Zellen	0,321	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	42	130	163	164
Itga5		Rezeptoren Proteinmarker	0,276	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	27	94	156	112
Irf9		Endoderm	0,270	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	20	76	28	60
Inhba		Rezeptoren Proteinmarker	0,255	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	302	1187	2394	1403
Gap43		Ektoderm/Neurone	0,243	31,5879	n.s.	n.s.	n.s.	13	53	1701	33
Mef2c		Muskel	0,219	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	32	145	50	223
Irf9		Endoderm	0,218	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	72	335	137	192
Dlx2		Laterale Inhibition	0,216	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	17	77	143	127
Fzd7		WNT-Signalling	0,190	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	77	403	402	521
Itga5		Rezeptoren Proteinmarker	0,139	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	56	402	806	548
Wnt5a		WNT-Signalling	0,127	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	16	122	299	98
NGFR p75		Ektoderm/Neurone	0,113	0,1258	0,216	n.s.	0,021	18	163	20	35
Tcf3		WNT-Signalling	0,107	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	93	869	679	849
Gja1		Connexine	0,102	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1180	11550	10458	8967
S100a4		Stammzellen	0,087	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	29	329	505	294
Gata3		Endoderm	0,087	n.s.	n.s.	n.s.	0,057	21	237	32	267
Wnt5a		WNT-Signalling	0,030	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	16	531	1263	387

GEN- SYMBOL	Priorität 1	Priorität 2	mJ vs M1HG	M1B27 vs M1HG	M1NE vs M1HG	Beadstudio		linearer Mittelwert der Replikate			
						M1NE vs M1HG	M1B27 vs M1HG	mJ	M1 HG	M1B27	M1 NE
Acta2		Muskel	0,012	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	21	1769	1197	1857
Acta2		Muskel	0,007	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	22	3341	1931	2930
Dkk3		Transkriptionsfaktor en Endokrine Zellen	0,006	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	14	2336	1492	2256
Dkk3		Transkriptionsfaktor en Endokrine Zellen	0,005	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	16	3194	2019	3235
Acta2		Muskel	0,002	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	21	10921	6651	12436
Acta2		Muskel	0,002	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	35	21050	21646	19188
Dlx1		Laterale Inhibition	n.s.	4,4444	n.s.	2,837	n.s.	68	60	266	124

## 8 Literaturverzeichnis

- Aberdam D, Gambaro K, Medawar A, Aberdam E, Rostagno P, de la Forest Divonne S, Rouleau M.** 2007. Embryonic stem cells as a cellular model for neuroectodermal commitment and skin formation. *C R Biol* 330(6-7):479-484.
- Ackermann AM, Gannon M.** 2007. Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol.* 38(1-2):193-206
- American Diabetes Association.** 2007. American Diabetes Association clinical practice recommendations 2004. *Diabetes Care* 27(Suppl 1):42-85
- Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM.** 2005. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(15):5530-5534
- Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM.** 2005. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(49): 17734-17738
- Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, Hrabe de Angelis M, Lendahl U, Edlund H.** 1999. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400(6747):877-881
- Bai L, Meredith G, Tuch BE.** 2005. Glucagon-like peptide-1 enhances production of insulin in insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells. *J Endocrinol* 186(2):343-352
- Bakre MM, Hoi A, Mong JC, Koh YY, Wong KY, Stanton LW.** 2007. Generation of multipotential mesendodermal progenitors from mouse embryonic stem cells via sustained Wnt pathway activation. *J Biol Chem* 282(43):31703-31712
- Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J.** 1999. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* 265(1):134-139
- Bartoov-Shifman R, Hertz R, Wang H, Wollheim CB, Bar-Tana J, Walker MD.** 2002. Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *J Biol Chem* 277(29):25914-25919
- Blanpain C, Fuchs E.** 2006. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:339-373
- Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E.** 2004. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 118(5):635-648
- Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, Wobus AM.** 2003. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(3):998-1003
- Boden G.** 2001. Pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Metab Clin North Amer* 30:801-815
- Bortvin A, Eggan K, Skaletsky H, Akutsu H, Berry DL, Yanagimachi R, Page DC, Jaenisch R.** 2003. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* 130(8):1673-1680
- Botchkarev VA, Paus R.** 2003. Molecular biology of hair morphogenesis: development and cycling. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 298(1):164-180
- Botchkarev VA, Welker P, Albers KM, Botchkarev NV, Metz M, Lewin GR, Bulfone- Paus S, Peters EM, Lindner G, Paus R.** 1998. A new role for neurotrophin-3: involvement in the regulation of hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol* 153(3):785-799
- Braun KM, Niemann C, Jensen UB, Sundberg JP, Silva-Vargas V, Watt FM.** 2003. Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development* 130(21):5241-5255
- Brendel MD, Eckhard M, Brandhorst D, Brandhorst H, Winter D, Jaeger C, Jahr H, Ziegler A, Iken M, Shen H, Weimer R, Rau W, PadbergW, Bretzel RG.** 2003. Inselzelltransplantation—aktueller Stand und Perspektiven. *Diab Stoffw* 12:239-252
- Brun T, He KH, Lupi R, Boehm B, Wojtusciszyn A, Sauter N, Donath M, Marchetti P, Maedler K, Gauthier BR.** 2008. The diabetes-linked transcription factor Pax4 is expressed in human pancreatic islets and is activated by mitogens and GLP-1. *Hum Mol Genet* 17(4):478-489
- Brückel J, Kerner W.** 2005. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Praxisleitlinie. [www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/praxisleitlinien/12/2005](http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/praxisleitlinien/12/2005)
- Bhushan A, Itoh N, Kato S, Thiery JP, Czernichow P, Bellusci S, Scharfmann R.** 2001. Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development* 128(24):5109-5117

- Carpenter MK, Rosler E, Rao MS.** 2003. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 5(1):79-88
- Chakrabarti SK, Mirmira RG.** 2003. Transcription factors direct the development and function of pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab* 14(2):78-84
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A.** 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113(5):643-655
- Chandra V, G S, Phadnis S, Nair PD, Bhonde RR.** 2009. Generation of Pancreatic Hormone Expressing Islet like Cell Aggregates from Murine Adipose Tissue-derived Stem Cells. [Epub ahead of print]
- Chang CP, Neilson JR, Bayle JH, Gestwicki JE, Kuo A, Stankunas K, Graef IA, Crabtree GR.** 2004. A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell* 118(5):649-663
- Chase HB, Rauch R, Smith VW.** 1951. Critical stages of hair development and pigmentation in the mouse. *Physiol Zool* 24(1):1-8
- Chen S, Borowiak M, Fox JL, Maehr R, Osafune K, Davidow L, Lam K, Peng LF, Schreiber SL, Rubin LL, Melton D.** 2009. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nat Chem Biol* 5(4):258-265
- Cheung KK, Mok SC, Rezaie P, Chan WY.** 2008. Dynamic expression of Dab2 in the mouse embryonic central nervous system. *BMC Dev Biol* 8:76
- Choi Y, Ta M, Atouf F, Lumelsky N.** 2004. Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny. *Stem Cells* 22(6):1070-1084
- Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, Frisen J.** 2000. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288(5471):1559-1560
- Claudinet S, Nicolas M, Oshima H, Rochat A, Barrandon Y.** 2005. Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(41):14677-14682
- Cotsarelis G.** 2006. Gene expression profiling gets to the root of human hair follicle stem cells. *J Clin Invest* 116(1):19-22
- Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM.** 1990. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle and skin carcinogenesis. *Cell* 61:1329-1337
- D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE.** 2005. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23(12):1534-1541
- D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE.** 2006. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24(11):1392-1401
- DECODE Study Group.** 2001. Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch Intern Med* 161:397-404
- Diabetes Control and Complications Trial Research Group.** 1993. The effects of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977-986
- Domashenko A, Gupta S, Cotsarelis G.** 2000. Efficient delivery of transgenes to human hair follicle progenitor cells using topical lipoplex. *Nat Biotechnol* 18(4):420-423
- Dreyer M, Berger M, Kiess W, Lüdecke HJ, Redaelli, Schatz H, Waldhäusl.** 2003. Therapie des Diabetes mellitus Typ 1. Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinie DDG. *Diab Stoffw* 12:49-66
- Ebling & Johnson.** 1964. The action of hormones on spontaneous hair growth cycles in the rat. *Symp Zool Soc* 12:97-130
- Edlund H.** 2002. Pancreatic organogenesis—developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 3(7):524-532
- Ellis RA, Moretti G.** 1959. Vascular patterns associated with catagen hair follicles in the human scalp. *Ann N Y Acad Sci* 83:448-457
- Erdo F, Buhrlé C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Focking M, Kustermann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann KA, Trapp T.** 2003. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:780-785.
- Evans-Molina C, Vestermark GL, Mirmira RG.** 2009. Development of insulin-producing cells from primitive biologic precursors. *Curr Opin Organ Transplant* 14(1):56-63
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** 2003. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26:3160-3167

- Fasano CA, Dimos JT, Ivanova NB, Lowry N, Lemischka IR, Temple S.** 2007. shRNA knockdown of Bmi-1 reveals a critical role for p21-Rb pathway in NSC self-renewal during development. *Cell Stem Cell* 1(1):87-99
- Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabe-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui CC, Miller FD.** 2004. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* 6(11):1082-1093
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F.** 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279(5356):1528-1530
- Frandsen U, Porneki AD, Floridon C, Abdallah BM, Kassem M.** 2007. Activin B mediated induction of Pdx1 in human embryonic stem cell derived embryoid bodies. *Biochem Biophys Res Commun* 362(3):568-574
- Fuchs E.** 2007. Scratching the surface of skin development. *Nature* 445(7130):834-842
- Fuchs E.** 2008. Skin stem cells: rising to the surface. *J Cell Biol* 180(2):273-284
- Fuchs E, Green H.** 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19(4):1033-1042
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G.** 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116(6):769-778
- Ghazizadeh S, Taichman LB.** 2001. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J* 20(6):1215-1222
- Goicoa S, Alvarez S, Ricordi C, Inverardi L, Domínguez-Bendala J.** 2006. Sodium butyrate activates genes of early pancreatic development in embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 8(3):140-149
- Golosow N, Grobstein C.** 1962. Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis. *Dev Biol* 4:242-255
- Göke R, Fehmann HC, Linn T, Schmidt H, Krause M, Eng J, Göke B.** 1993. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem* 268(26):19650-19655
- Grapin-Botton A, Constam D.** 2007. Evolution of the mechanisms and molecular control of endoderm formation. *Mech Dev* 124(4):253-278.
- Greco V, Chen T, Rendl M, Schober M, Pasolli HA, Stokes N, Dela Cruz-Racelis J, Fuchs E.** 2009. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell* 4(2):155-169
- Greig NH, Holloway HW, De Ore KA, Jani D, Wang Y, Zhou J, Garant MJ, Egan JM.** 1999. Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia* 42(1):45-50
- Grinnell KL, Bickenbach JR.** 2007. Skin keratinocytes pre-treated with embryonic stem cell-conditioned medium or BMP4 can be directed to an alternative cell lineage. *Cell Prolif* 40(5):685-705
- Grivennikov IA.** 2008. Embryonic stem cells and the problem of directed differentiation. *Biochemistry (Mosc)* 73(13):1438-1452
- Gruessner AC, Sutherland DE.** 2005. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. *Clin Transplant* 19(4):433-455
- Gu G, Brown JR, Melton DA.** 2003. Direct lineage tracing reveals the ontogeny of pancreatic cell fates during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 120(1):35-43
- Guo W, Miao C, Liu S, Qiu Z, Li J, Duan E.** 2009. Efficient differentiation of insulin-producing cells from skin-derived stem cells. *Cell Prolif* 42(1):49-62
- Guz Y, Nasir I, Teitelman G.** 2001. Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* 142(11):4956-4968
- Hao E, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Lakey JR, Geron I, Monosov EZ, Barcova M, Mercola M, Levine F.** 2006. Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas. *Nat Med* 12(3):310-316
- Hardy MH.** 1992. The secret life of the hair follicle. *Trends Genet* 8(2):55-61
- Hart AW, Baeza N, Apelqvist A, Edlund H.** 2000. Attenuation of FGF signalling in mouse beta-cells leads to diabetes. *Nature* 408(6814):864-868
- Häring H, Joost H, Laube H, Matthaei S, Meissner H, Panten U, Schernthaner G.** 2003. Antihyperglykämische Therapie des Diabetes mellitus Typ 2. Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinie DDG. *Diab Stoffw* 12:13-31
- He S, Pant D, Schiffmacher A, Bischoff S, Melican D, Gavin W, Keefer C.** 2006. Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: novel pattern of NANOG protein localization in the nucleolus. *Mol Reprod Dev* 73(12):1512-1522

- Hebrok M, Kim SK, Melton DA.** 1998. Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* 12(11):1705-1713
- Heid HW, Moll I, Franke WW.** 1988. Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles. *Differentiation* 37(2):137-157
- Hoogduijn MJ, Gorjup E, Genever PG.** 2006. Comparative characterization of hair follicle dermal stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 15(1):49-60
- Hori Y, Gu X, Xie X, Kim SK.** 2005. Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells. *PLoS Med* 2(4):e103
- Hu YF, Zhang ZJ, Sieber-Blum M.** 2006. An epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) molecular signature. *Stem Cells* 24(12):2692-2702
- Hua H, Sarvetnick N.** 2007. Expression of Id1 in adult, regenerating and developing pancreas. *Endocrine* 32(3):280-286
- Hunt DP, Morris PN, Sterling J, Anderson JA, Joannides A, Jahoda C, Compston A, Chandran S.** 2008. A highly enriched niche of precursor cells with neuronal and glial potential within the hair follicle dermal papilla of adult skin. *Stem Cells*. 26(1):163-172
- Ito M, Kizawa K, Hamada K, Cotsarelis G.** 2004. Hair follicle stem cells in the lower bulge form the secondary germ, a biochemically distinct but functionally equivalent progenitor cell population, at the termination of catagen. *Differentiation* 72(9-10):548-557
- Ito M, Kizawa K, Toyoda M, Morohashi M.** 2002. Label-retaining cells in the bulge region are directed to cell death after plucking, followed by healing from the surviving hair germ. *J Invest Dermatol* 119(6):1310-1316
- Ito M, Liu Y, Yang Z, Nguyen J, Liang F, Morris RJ, Cotsarelis G.** 2005. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat. Med.* 11(12):1351-1354
- Jahoda CA.** 2003. Cell movement in the hair follicle dermis – more than a two-way street? *J Invest Dermatol* 121:1267-1275
- Jahoda CA, Whitehouse J, Reynolds AJ, Hole N.** 2003. Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp Dermatol* 12(6):849-859
- Jensen J.** 2004. Gene regulatory factors in pancreatic development. *Dev Dyn* 229(1):176-200
- Jiang J, Au M, Lu K, Eshpeter A, Korbitt G, Fisk G, Majumdar AS.** 2007. Generation of Insulin-producing Islet-like Clusters from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 25(8):1940-1953
- Jones JM, Montcouquiol M, Dabdoub A, Woods C, Kelley MW.** 2006. Inhibitors of differentiation and DNA binding (Ids) regulate Math1 and hair cell formation during the development of the organ of Corti. *J Neurosci* 26(2):550-558
- Jones PH, Watt FM.** 1993. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 73(4):713-724
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H.** 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*. 371(6498):606-609
- Jørgensen MC, Ahnfeldt-Rønne J, Hald J, Madsen OD, Serup P, Hecksher-Sørensen J.** 2007. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev* 28(6):685-705
- Joshi CV, Enver T.** 2002. Plasticity revisited. *Curr Opin Cell Biol* 14(6):749-755
- Kahn SE.** 2000. The importance of the  $\beta$ -cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 108:2-8
- Kajahn J, Gorjup E, Tiede S, von Briesen H, Paus R, Kruse C, Danner S.** 2008. Skin-derived human adult stem cells surprisingly share many features with human pancreatic stem cells. *Eur J Cell Biol* 87(1):39-46
- Kanno S, Kim PK, Sallam K, Lei J, Billiar TR, Shears LL 2<sup>nd</sup>.** 2004. Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(33):12277-12281
- Kato S, Sekine K.** 1999. FGF-FGFR signalling in vertebrate organogenesis. *Cell Mol Biol* 45(5):631-638
- Kaufman CK, Zhou P, Pasolli HA, Rendl M, Bolotin D, Lim KC, Dai X, Alegre ML, Fuchs E.** 2003. GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin. *Genes Dev.* 17(17):2108-2122
- Keller GM.** 1995. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 7(6):862-869
- Kim SK, Hebrok M.** 2001. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev* 15(2):111-127
- Kim SK, Melton DA.** 1998. Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signalling inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(22):13036-13041

- Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, Park JS.** 2007. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci* 48(1):15-24
- Klassen H, Schwartz MR, Bailey AH, Young MJ.** 2001. Surface markers expressed by multipotent human and mouse neural progenitor cells include tetraspanins and non-protein epitopes. *Neurosci Lett* 312(3):180-182
- Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y.** 1993. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissae. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(15):7391-7395
- Kodama S, Kuhlreiber W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL.** 2003. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science* 302(5648):1223-1227
- Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE.** 2008. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26(4) :443-452
- Kuai XL, Cong XQ, Li XL, Xiao SD.** 2003. Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. *Liver Transpl* 9(10):1094-1099
- Kumamoto T, Shalhevet D, Matsue H, Mummert ME, Ward BR, Jester JV, Takashima A.** 2003. Hair follicles serve as local reservoirs of skin mast cell precursors. *Blood* 102(5):1654-1660
- Lane EB, Wilson CA, Hughes BR, Leigh IM.** 1991. Stem cells in hair follicles. *Cytoskeletal studies. Ann N Y Acad Sci* 642:197-213
- Lavker RM, Miller S, Wilson C, Cotsarelis G, Wei ZG, Yang JS, Sun TT.** 1993. Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation. *J Invest Dermatol* 101(1 Suppl):16S-26S
- Lechner A, Leech CA, Abraham EJ, Nolan AL, Habener JF.** 2002. Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 293(2):670-674
- Le Douarin NM.** 1988. On the origin of pancreatic endocrine cells. *Cell* 53(2):169-171
- Lee JC, Smith SB, Watada H, Lin J, Scheel D, Wang J, Mirmira RG, German MS.** 2001. Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* 50(5) :928-936
- Leon-Quinto T, Jones J, Skoudy A, Burcin M, Soria B.** 2004. In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia* 47(8):1442-1451
- Li A, Simmons PJ, Kaur P.** 1998. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(7):3902-3907
- Li L, Mignone J, Yang M, Matic M, Penman S, Enikolopov G, Hoffman RM.** 2003. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(17):9958-9961
- Li L, Yi Z, Seno M, Kojima I.** 2004. Activin A and betacellulin: effect on regeneration of pancreatic beta-cells in neonatal streptozotocin-treated rats. *Diabetes* 53(3):608-615
- Li J, Greco V, Guasch G, Fuchs E, Mombaerts P.** 2007. Mice cloned from skin cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(8):2738-2743
- Liebl A, Neiss A, Spannheimer A, Reitberger U, Wieseler B, Stammer H, Goertz A.** 2002. Complications, comorbidity, and blood glucose control in type 2 diabetes mellitus patients in Germany—results from the CODE-2 study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 110(1):10-16
- Lin L, Cui L, Zhou W, Dufort D, Zhang X, Cai CL, Bu L, Yang L, Martin J, Kemler R, Rosenfeld MG, Chen J, Evans SM.** 2007. Beta-catenin directly regulates Islet1 expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(22):9313-9318
- Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Ling G, van der Veen C, Paus R.** 1997. Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol* 151(6):1601-1617
- Liu Y, Lyle S, Yang Z, Cotsarelis G.** 2003. Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. *J Invest Dermatol* 121(5):963-968
- Lo Celso C, Berta MA, Braun KM, Frye M, Lyle S, Zouboulis CC, Watt FM.** 2008. Characterization of bipotential epidermal progenitors derived from human sebaceous gland: contrasting roles of c-Myc and beta-catenin. *Stem Cells* 26(5):1241-1252
- Lock LT, Tzanakakis ES.** 2007. Stem/Progenitor cell sources of insulin-producing cells for the treatment of diabetes. *Tissue Eng* 13(7):1399-1412
- Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R.** 2001. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292(5520):1389-1394

- Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, Elder DE, Albelda S, Cotsarelis G.** 1998. The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 21):3179-3188
- Marx N.** 2003. Diabetes und Arteriosklerose. *Diabetes Stoffwech*: 205–211
- Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, Mine T, Miyagawa J, Hanafusa T, Seno M, Yamada H, Kojima I.** 1996. Betacellulin and activin A signalling ly convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *J Clin Invest* 97(7):1647-1654
- Matsuzaki T, Inamatsu M, Yoshizato K.** 1996. The upper dermal sheath has a potential to regenerate the hair in the rat follicular epidermis. *Differentiation* 60(5):287-297
- McKiernan E, O'Driscoll L, Kasper M, Barron N, O'Sullivan F, Clynes M.** 2007. Directed differentiation of mouse embryonic stem cells into pancreatic-like or neuronal- and glial-like phenotypes. *Tissue Eng* 13(10):2419-2430
- McLean AB, D'Amour KA, Jones KL, Krishnamoorthy M, Kulik MJ, Reynolds DM, Sheppard AM, Liu H, Xu Y, Baetge EE, Dalton S.** 2007. Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signalling is suppressed. *Stem Cells* 25(1):29-38
- Medina V, Edmonds B, Young GP, James R, Appleton S, Zalewski PD.** 1997. Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res* 57(17):3697-3707
- Medina RJ, Kataoka K, Takaishi M, Miyazaki M, Huh NH.** 2006. Isolation of epithelial stem cells from dermis by a three-dimensional culture system. *J Cell Biochem* 98(1):174-184
- Meulemans D, Bronner-Fraser M.** 2004. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev Cell* 7(3):291-299
- Michel M, Torok N, Godbout MJ, Lussier M, Gaudreau P, Royal A, Germain L.** 1996. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 109(5) :1017-1028
- Miettinen PJ, Huotari M, Koivisto T, Ustinov J, Palgi J, Rasilainen S, Lehtonen E, Keski-Oja J, Otonkoski T.** 2000. Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors. *Development* 127(12):2617-2627
- Miralles F, Lamotte L, Couton D, Joshi RL.** 2006. Interplay between FGF10 and Notch signalling is required for the self-renewal of pancreatic progenitors. *Int J Dev Biol* 50(1):17-26
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R.** 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31(1):11-24
- Moore MA, Shieh JH, Lee G.** 2006. Hematopoietic cells. *Methods Enzymol* 418:208-242
- Morasso MI, Tomic-Canic M.** 2005. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biol Cell* 97(3):173-183
- Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA, Cotsarelis G.** 2004. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* 22(4):411-417
- Movassat J, Beattie GM, Lopez AD, Hayek A.** 2002. Exendin 4 up-regulates expression of PDX 1 and hastens differentiation and maturation of human fetal pancreatic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87(10):4775-4781
- Mullis KB, Faloona F.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350
- Murillas R, Larcher F, Conti CJ, Santos M, Ullrich A, Jorcano JL.** 1995. Expression of a dominant negative mutant of epidermal growth factor receptor in the epidermis of transgenic mice elicits striking alterations in hair follicle development and skin structure. *EMBO J* 14(21):5216-5223
- Murtaugh LC.** 2007. Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development* 134(3):427-438
- Narita Y, Yamawaki A, Kagami H, Ueda M, Ueda Y.** 2008. Effects of transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage. *Cell Tissue Res* 333(3):449-459
- Nath M, Offers M, Hummel M, Seissler J.** 2011. Isolation and in vitro expansion of Lgr6-positive multipotent hair follicle stem cells. *Cell Tissue Res*. Jun;344(3):435-44. Epub 2011 Apr 12.
- Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY et al.** 2005. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 353:2643-2653

- Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A.** 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95(3):379-391
- Ning H, Lin G, Fandel T, Banie L, Lue TF, Lin CS.** 2008. Insulin growth factor signalling mediates neuron-like differentiation of adipose-tissue-derived stem cells. *Differentiation* 76(5):488-494
- Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, Jackson IJ, Barrandon Y, Miyachi Y, Nishikawa S.** 2002. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 416(6883):854-860
- Nishizuka Y.** 1992. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258(5082):607-614
- Noguchi H, Kaneto H, Weir GC, Bonner-Weir S.** 2003. PDX-1 Protein Containing Its Own Antennapedia-Like Protein Transduction Domain Can Transduce Pancreatic Duct and Islet Cells. *Diabetes* 52(7):1732-1737
- Ohyama M, Terunuma A, Tock CL, Radonovich MF, Pise-Masison CA, Hopping SB, Brady JN, Udey MC, Vogel JC.** 2006. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J Clin Invest* 116(1):249-260
- Oka M, Tagoku K, Russell TL, Nakano Y, Hamazaki T, Meyer EM, Yokota T, Terada N.** 2002. CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 13(4):1274-1281
- St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P.** 1997. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing  $\beta$ -cells in mouse pancreas. *Nature* 387:406-409
- Ootani A, Li X, Sangiorgi E, Ho QT, Ueno H, Toda S, Sugihara H, Fujimoto K, Weissman IL, Capecchi MR, Kuo CJ.** 2009. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat Med* 15(6):701-706
- Orlic D.** 2003. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci* 996:152-157
- Osada A, Iwabuchi T, Kishimoto J, Hamazaki TS, Okochi H.** 2007. Long-term culture of mouse vibrissal dermal papilla cells and de novo hair follicle induction. *Tissue Eng* 13(5):975-982
- Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y.** 2001. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 104(2):233-245
- Patterson JM, Johnson MH, Zimonjic DB, Graubert TA.** 2000. Characterization of Ly-6M, a novel member of the Ly-6 family of hematopoietic proteins. *Blood* 95(10):3125-3132
- Paus R, Cotsarelis G.** 1999. The Biology of hair follicles. *N Engl J Med* 341:491-498
- Paus R, Foitzik K.** 2004. In search of the hair cycle clock: a guided tour. *Differentiation* 72:489-511
- Pearse AG.** 1982. Islet cell precursors are neurones. *Nature* 295(5845):96-97
- Popp FC, Slowik P, Eggenhofer E, Renner P, Lang SA, Stoeltzing O, Geissler EK, Piso P, Schlitt HJ, Dahlke MH.** 2007. No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury. *Stem Cells* 25(3):639-645
- Potten CS.** 1981. Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *Int Rev Cytol* 69 :271-318
- Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL.** 2002. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 30(7):783-791
- Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG.** 2000. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 6(3):278-282
- Rathmann W, Haastert B, Icks A, Loel H, Meisinger C, Holle R, Giani G.** 2000. High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologia* 46:182-189
- Rainer J, Sanchez-Cabo F, Stocker G, Sturn A, Trajanoski Z.** 2006. CARMAweb: Comprehensive R- and bioconductor-based web service for microarray data analysis. *Nucleic Acids Res* 34:498-503
- Reynolds A, Jahoda CA.** 1991. Hair follicle stem cells? A distinct germinative epidermal cell population is activated in vitro by the presence of hair dermal papilla cells. *J Cell Sci* 99:373-385
- Rhee H, Polak L, Fuchs E.** 2006. Lhx2 maintains stem cell character in hair follicles. *Science* 312(5782):1946-1949
- Roh C, Roche M, Guo Z, Photopoulos C, Tao Q, Lyle S.** 2008. Multi-potentiality of a new immortalized epithelial stem cell line derived from human hair follicles. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 44(7):236-244
- Roh C, Tao Q, Lyle S.** 2004. Dermal papilla-induced hair differentiation of adult epithelial stem cells from human skin. *Physiol Genomics* 19(2):207-217

- Roh C, Tao Q, Photopoulos C, Lyle S.** 2005. In vitro differences between keratinocyte stem cells and transit-amplifying cells of the human hair follicle. *J Invest Dermatol* 125(6):1099-1105
- Rosenblum MD, Olasz EB, Yancey KB, Woodliff JE, Lazarova Z, Gerber KA, Truitt RL.** 2004. Expression of CD200 on epithelial cells of the murine hair follicle: a role in tissue-specific immune tolerance? *J Invest Dermatol* 123(5):880-887
- Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A, Martin F, Brulport M, Schormann W, Hengstler JG, Klapper W, Ulrichs K, Hutchinson JA, Soria B, Parwaresch RM, Heeckt P, Kremer B, Fändrich F.** 2005. Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* 128(7):1774-1786
- Rutter WJ, Kemp JD, Bradshaw WS, Clark WR, Ronzio RA, Sanders TG.** 1968. Regulation of specific protein synthesis in cytodifferentiation. *J Cell Physiol* 72(2):Suppl 1:1-18
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfidhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM.** 2005. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54:2060-2069
- Sangiorgi E, Capecchi MR.** 2009. Bmi1 lineage tracing identifies a self-renewing pancreatic acinar cell subpopulation capable of maintaining pancreatic organ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(17):7101-7106
- Schlake T.** 2005. FGF signals specifically regulate the structure of hair shaft medulla via IGF-binding protein 5. *Development* 132(13):2981-2990
- Schmidt-Ullrich R, Paus R.** 2005. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *Bioessays* 27(3):247-261
- Schneider MR, Antsiferova M, Feldmeyer L, Dahlhoff M, Bugnon P, Hasse S, Paus R, Wolf E, Werner S.** 2008. Betacellulin regulates hair follicle development and hair cycle induction and enhances angiogenesis in wounded skin. *J Invest Dermatol* 128(5):1256-1265
- Schultz SS, Abraham S, Lucas PA.** 2006. Stem cells isolated from adult rat muscle differentiate across all three dermal lineages. *Wound Repair Regen* 14(2):224-231
- Seissler J, Scherbaum WA.** 2002. Are we ready to predict and prevent endocrine/organ-specific autoimmune diseases? *Springer Semin Immunopathol* 24:273-295
- Seissler J, Scherbaum WA.** 2006. Autoimmune diagnostics in diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 44:133-137
- Selleri S, Arnaboldi F, Palazzo M, Hussein U, Balsari A, Rumio C.** 2005. Caveolin-1 is expressed on multipotent cells of hair follicles and might be involved in their resistance to chemotherapy. *Br J Dermatol* 153(3):506-513
- Seymour PA, Freude KK, Tran MN, Mayes EE, Jensen J, Kist R, Scherer G, Sander M.** 2007. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1865-1870
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV.** 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343(4):230-238
- Shimazaki T, Okazawa H, Fujii H, Ikeda M, Tamai K, McKay RD, Muramatsu M, Hamada H.** 1993. Hybrid cell extinction and re-expression of Oct-3 function correlates with differentiation potential. *EMBO J* 12(12):4489-4498
- Shimoda M, Kanai-Azuma M, Hara K, Miyazaki S, Kanai Y, Monden M, Miyazaki J.** 2007. Sox17 plays a substantial role in late-stage differentiation of the extraembryonic endoderm in vitro. *J Cell Sci* 120(Pt 21):3859-3869
- Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, Szeder V.** 2004. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn* 231(2):258-269
- Sieber-Blum M, Hu Y.** 2008. Epidermal neural crest stem cells (EPI-NCSC) and pluripotency. *Stem Cell Rev* 4(4):256-260
- Slominski A, Wortsman J, Plonka WM, Schallreuter KU, Paus R, Tobin DJ.** 2005. Hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol* 124:13-21
- Solter D.** 2006. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet* 7(4):319-327
- Sommer L, Ma Q, Anderson DJ.** 1996 Neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci* 8:221-241
- Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P.** 1997. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386(6623):399-402
- Spence JR, Wells JM.** 2007. Translational embryology: using embryonic principles to generate pancreatic endocrine cells from embryonic stem cells. *Dev Dyn* 236(12):3218-3227
- StemCell Technologies.** 2006. ES-Cult: Recommended Protocols for Neural Differentiation of Murine ES cells. Catalog #2876

- Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM.** 2000. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 49(5):741-748
- Stratton IM, Adler AI, Neil HA et al.** 2000. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 321:405-412
- Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH.** 2005. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54(3):132-141
- Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, Mao N.** 2003. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells* 21(5):527-535
- Sun TT, Cotsarelis G, Lavker RM.** 1991. Hair follicular stem cells: the bulge-activation hypothesis. *J Invest Dermatol* 96(5):77S-78S
- Sun Y, Dykes IM, Liang X, Eng SR, Evans SM, Turner EE.** 2008. A central role for Islet1 in sensory neuron development linking sensory and spinal gene regulatory programs. *Nat Neurosci* 11(11):1283-1293
- Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE.** 2005. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 26(2):495-502
- Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, Yang LJ.** 2004. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes* 53(7):1721-1732
- Tateishi K, He J, Taranova O, Liang G, D'Alessio AC, Zhang Y.** 2008. Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 283(46):31601-31607
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM.** 2000. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102(4):451-461
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.** 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145-1147
- Tiede S, Kloepper JE, Whiting DA, Paus R.** 2007. The 'follicular trochanter': an epithelial compartment of the human hair follicle bulge region in need of further characterization. *Br J Dermatol* 157(5):1013-1016
- Toeller M.** 2005. Evidenz-basierte Ernährungsempfehlungen zur Behandlung und Prävention des Diabetes mellitus. *Diabetes und Stoffwechsel* 14:75-94
- Toll R, Jacobi U, Richter H, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U.** 2004. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J Invest Dermatol* 123(1):168-176
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD.** 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3(9):778-784
- Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, Cotsarelis G, Faircloth RS, Reece JM, Tennant RW.** 2003. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol* 120(4):501-511
- Tulachan SS, Doi R, Kawaguchi Y, Tsuji S, Nakajima S, Masui T, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, Kami K, Fujimoto K, Imamura M.** 2003. All-trans retinoic acid induces differentiation of ducts and endocrine cells by mesenchymal/epithelial interactions in embryonic pancreas. *Diabetes* 52(1):76-84
- Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E.** 2004. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 303(5656):359-363
- Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR.** 1999. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). *JAMA* 281:2005-2012
- UK Prospective Diabetes Study Group.** 1998. Intensive blood-glucose control with sulfonureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type II diabetes. *Lancet* 352:837-853
- van der Kooy D, Weiss S.** 2000. Why stem cells? *Science* 287(5457):1439-1441
- Vanhoose AM, Samaras S, Artner I, Henderson E, Hang Y, Stein R.** 2008. MafA and MafB regulate Pdx1 transcription through the Area II control region in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 283(33):22612-22619
- Vidal VP, Chaboissier MC, Lutzkendorf S, Cotsarelis G, Mill P, Hui CC, Ortonne N, Ortonne JP, Schedl A.** 2005. Sox9 is essential for outer root sheath differentiation and the formation of the hair stem cell compartment. *Curr Biol* 15(15):1340-1351
- Wang H, Brun T, Kataoka K, Sharma AJ, Wollheim CB.** 2007. MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion. *Diabetologia* 50(2):348-358
- Waters JM, Richardson GD, Jahoda CA.** 2007. Hair follicle stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 18(2):245-254

- Watt FM, Hogan BL.** 2000. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287(5457):1427-1430
- Weissman IL.** 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100(1):157-168
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H.** 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053
- Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM.** 2004. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61(19-20):2510-2522
- Wilson C, Cotsarelis G, Wei ZG, Fryer E, Margolis-Fryer J, Ostead M, Tokarek R, Sun TT, Lavker RM.** 1994. Cells within the bulge region of mouse hair follicle transiently proliferate during early anagen: heterogeneity and functional differences of various hair cycles. *Differentiation* 55(2):127-136
- Wilson ME, Scheel D, German MS.** 2003. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev* 120(1):65-80
- Wolnicka-Glubisz A, King W, Noonan FP.** 2005. SCA-1+ cells with an adipocyte phenotype in neonatal mouse skin. *J Invest Dermatol* 125(2):383-385
- Wu XH, Liu CP, Xu KF, Mao XD, Zhu J, Jiang JJ, Cui D, Zhang M, Xu Y, Liu C.** 2007. Reversal of hyperglycemia in diabetic rats by portal vein transplantation of islet-like cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 13(24):3342-3349
- Yang DH, Smith ER, Cai KQ, Xu XX.** 2009. C-Fos elimination compensates for disabled-2 requirement in mouse extraembryonic endoderm development. *Dev Dyn* 238(3):514-523
- Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB.** 2002. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(12):8078-8083
- Yang X, Qu L, Wang X, Zhao M, Li W, Hua J, Shi M, Moldovan N, Wang H, Dou Z.** 2007. Plasticity of epidermal adult stem cells derived from adult goat ear skin. *Mol Reprod Dev* 74(3):386-396
- Yano S, Ito Y, Fujimoto M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H.** 2005. Characterization and localization of side population cells in mouse skin. *Stem Cells* 23(6):834-841
- Yoshida S, Kajimoto Y, Yasuda T, Watada H, Fujitani Y, Kosaka H, Gotow T, Miyatsuka T, Umayahara Y, Yamasaki Y, Hori M.** 2002. PDX-1 induces differentiation of intestinal epithelioid IEC-6 into insulin-producing cells. *Diabetes* 51(8):2505-2513
- Yu H, Fang D, Kumar SM, Li L, Nguyen TK, Acs G, Herlyn M, Xu X.** 2006. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* 168(6):1879-1888
- Zertal-Zidani S, Bounacer A, Scharfmann R.** 2007. Regulation of pancreatic endocrine cell differentiation by sulphated proteoglycans. *Diabetologia* 50(3):585-595
- Zhang YQ, Kritzik M, Sarvetnick N.** 2005. Identification and expansion of pancreatic stem/progenitor cells. *J Cell Mol Med* 9(2):331-344
- Zhang Y, Xiang M, Wang Y, Yan J, Zeng Y, Yu J, Yang T.** 2006. Bulge cells of human hair follicles: segregation, cultivation and properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 47(1):50-56
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP.** 2001. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7(9):1028-1034
- Zhou Q, Law AC, Rajagopal J, Anderson WJ, Gray PA, Melton DA.** 2007. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell* 13(1):103-114
- Zouboulis CC, Adjaye J, Akamatsu H, Moe-Behrens G, Niemann C.** 2008. Human skin stem cells and the ageing process. *Exp Gerontol* 43(11):986-997
- Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF.** 2001. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50(3):521-533

---

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Mein erster und ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Jochen Seißler für die interessante Aufgabenstellung und die Möglichkeit diese Arbeit in der Diabetologie der Medizinischen Klinik - Innenstadt durchzuführen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. habil. Johannes Beckers und seinem Mitarbeiter Dr. Martin Irmeler für die Durchführung der Array Analyse und die damit verbundene statistische Analyse, sowie die Erstellung der Heatmaps.

Für die Sortierung der transfizierten Zellen bedanke ich mich vielmals beim Zellsortier-Service Dr. Joachim W. Ellwart des Instituts für Molekulare Immunologie im HelmholtzZentrum münchen.

Meinen Kollegen aus dem Labor, besonders Constanze Hantel, Monika Offers und Christine Sattler möchte ich für die nette Arbeitsatmosphäre, Unterstützung und Hilfe danken.

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die hier angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution vorgelegt.

München, 05. Dezember 2011