

Aus dem Institut für Physiologische Chemie  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. Guido Posern)

**Differenzierung von Wildtyp und GNE-defizienten murinen embryonalen  
Stammzellen in „Embryoid bodies“**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Jessica Hering  
geboren am 22. Januar 1988 in Karl-Marx-Stadt (jetzt Chemnitz)

Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte  
Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte  
Prof. Dr. Jürgen Dittmer  
Prof. Dr. Stephan Hinderlich (Berlin)

Eröffnung des Verfahrens: 29.01.2013  
Verteidigung: 25.06.2013

## Referat

Die UDP-N-Acetylglukosamin-2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase (GNE) ist das Schlüsselenzym im Biosyntheseweg der Sialinsäuren. Bei dem Versuch eine GNE-defiziente Maus zu generieren, stellte sich heraus, dass murine GNE-defiziente Embryonen am Tag 8.5 intrauterin versterben. Die Ursache für diese frühe Letalität ist nicht geklärt.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob ein Unterschied in der frühembryonalen Differenzierung in die drei Keimblätter zwischen Wildtyp- und GNE-defizienten Stammzellen besteht. Dazu wurden aus Wildtyp- und GNE-defizienten embryonalen Stammzellen sogenannte „hanging drops“ Embryoid bodies gebildet und an Tag 0, 3, 5 und 7 sowohl morphologisch als auch molekularbiologisch mittels quantitativer Realtime-Polymerasekettenreaktionen untersucht. Zudem erfolgte eine spontane Differenzierung der embryonalen Stammzellen in Herzmuskel-, Skelettmuskel- und neuronale Zellen. Die Versuche wurden jeweils in sialinsäure- und serumhaltigem Medium und in sialinsäurefreiem Serum-replacement-Medium durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl GNE-defiziente als auch Wildtyp-Embryoid bodies in alle 3 Keimblätter differenzieren können. Die Genexpression der Markergene für die 3 Keimblätter unterscheidet sich im sialinsäurehaltigem Serum kaum, während im sialinsäurefreien Medium die Expression von *Nkx2,5* (Gen für kardiales Vorläufergewebe), *Cdx2* (Gen für Trophektoderm) und *Nestin* (Gen für ektodermales Gewebe) während der Embryoid body-Entwicklung zwischen Wildtyp- und GNE-defizienten Zellen variiert. Morphologisch fällt auf, dass GNE-defiziente embryonale Stammzellen in beiden Medien verspätet und schlechter die typische Embryoid-body Form bilden. GNE-defiziente Embryoid bodies können spontan in Herzmuskel- und glatte Muskelzellen sowie in neuronale Zellen differenzieren.

Die frühe Letalität der GNE-defizienten Embryonen wird daher nicht durch die Unfähigkeit der Stammzellen zur Differenzierung in die 3 Keimblätter verursacht, könnte aber durch eine veränderte Bildung von kardialem oder neuronalem Gewebe bedingt sein.

# Inhaltsverzeichnis

<b>VERZEICHNIS ÜBER ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 <b>DIE UDP-N-ACETYLGLUKOSAMIN 2-EPIMERASE/N-ACETYLMANNOSAMIN- KINASE (GNE) .....</b>	<b>1</b>
1.2 <b>SIALINSÄUREN, SIALINSÄURE-ERKENNENDE STRUKTUREN UND IHRE FUNKTIONEN.....</b>	<b>3</b>
1.3 <b>PATHOLOGIE DER GNE .....</b>	<b>6</b>
1.4 <b>DIE BEDEUTUNG DER UDP-GLcNAC 2-EPIMERASE BEI DER EMBRYOGENESE DER MAUS .....</b>	<b>8</b>
1.5 <b>GNE- HETEROZYGOTE MÄUSE.....</b>	<b>9</b>
1.6 <b>WILD-TYP- UND UDP-GLcNAC-2-EPIMERASE-DEFIZIENTE EMBRYONALE STAMMZELLEN .....</b>	<b>9</b>
<b>2 ZIELSETZUNG.....</b>	<b>12</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 MATERIAL.....</b>	<b>13</b>
3.1.1 <i>Chemikalien und Zellkulturmaterialien .....</i>	<i>13</i>
3.1.2 <i>Zellen.....</i>	<i>13</i>
3.1.3 <i>Oligonucleotide.....</i>	<i>13</i>
3.1.4 <i>Enzyme.....</i>	<i>14</i>
3.1.5 <i>Medien und Medienzusätze .....</i>	<i>14</i>
3.1.6 <i>Antibiotika.....</i>	<i>15</i>
3.1.7 <i>Seren .....</i>	<i>15</i>
3.1.8 <i>Bestandteile der extrazellulären Matrix.....</i>	<i>15</i>
3.1.9 <i>Wachstumsfaktoren.....</i>	<i>15</i>
3.1.10 <i>Kits .....</i>	<i>15</i>
3.1.11 <i>DNA-Größenmarker .....</i>	<i>15</i>
3.1.12 <i>Agarose .....</i>	<i>15</i>
3.1.13 <i>Geräte .....</i>	<i>15</i>
<b>3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....</b>	<b>16</b>
3.2.1 <i>DNA-Grundtechniken .....</i>	<i>16</i>
3.2.2 <i>RNA-Grundtechniken .....</i>	<i>18</i>
3.2.3 <i>Transkription der mRNA in cDNA.....</i>	<i>20</i>
3.2.4 <i>Quantitative Real-time PCR .....</i>	<i>21</i>
<b>3.3 KULTURBIOLOGISCHE METHODEN.....</b>	<b>23</b>
3.3.1 <i>Nachweis der Pluripotenz der embryonalen Stammzellen.....</i>	<i>23</i>
3.3.2 <i>Kultivierung von Embryonalen Stammzellen .....</i>	<i>25</i>
3.3.3 <i>Generierung und Kultivierung von „Embryoid bodies“ .....</i>	<i>26</i>

3.3.4	<i>Spontane Differenzierung der Embryoid bodies.....</i>	27
3.3.5	<i>Ausschluss von Kontamination der Zellen – Mycoplasmentest.....</i>	27
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>GENOTYPISIERUNG DER EMBRYONALEN STAMMZELLEN .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>NACHWEIS DER STAMMZELLMARKER.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b>VERGLEICH DER DIFFERENZIERUNG DER ES-KO- UND ES-WT-ZELLEN IN FCS-HALTIGEM MEDIUM.....</b>	<b>31</b>
4.3.1	<i>Morphologische Unterschiede zwischen EB-KO und EB-WT .....</i>	31
4.3.2	<i>Nachweis der Expression der Markergene für die primären Keimblätter in den Embryoid bodies mittels qRT-PCR.....</i>	32
<b>4.4</b>	<b>VERGLEICH DER DIFFERENZIERUNG DER ES-KO UND ES-WT-ZELLEN IN SR-HALTIGEM MEDIUM .....</b>	<b>37</b>
4.4.1	<i>Morphologische Unterschiede zwischen EB-KO und EB-WT bei der Differenzierung aus ES-Zellen, die in SR-Medium kultiviert wurden .....</i>	37
4.4.2	<i>Morphologische Unterschiede zwischen EB-KO und EB-WT bei der Differenzierung aus ES-Zellen, die in FCS-Medium kultiviert wurden.....</i>	38
4.4.3	<i>Nachweis der Expression der Markergene für die primären Keimblätter in den Embryoid bodies mittels qRT-PCR.....</i>	39
4.4.4	<i>Spontane Differenzierung von WT- und KO-Embryoid bodies.....</i>	43
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DER STAMMZELLEN .....</b>	<b>45</b>
<b>5.2</b>	<b>VERGLEICH DER MORPHOLOGISCHEN DIFFERENZIERUNG DER ES-KO- UND ES-WT-ZELLEN ZU EMBRYOID BODIES.....</b>	<b>45</b>
<b>5.3</b>	<b>VERGLEICH DER DIFFERENZIERUNG DER ES-KO- UND ES-WT-ZELLEN ZU EMBRYOID BODIES ANHAND DER EXPRESSION DER VERSCHIEDENEN MARKERGENE .....</b>	<b>46</b>
<b>5.4</b>	<b>ÜBERLEGUNGEN ZUR ÜBERTRAGBARKEIT DER ERGEBNISSE AUF DIE EMBRYONALE ENTWICKLUNG .....</b>	<b>47</b>
5.4.1	<i>Embryoid bodies als Modell für embryonale Entwicklung .....</i>	47
5.4.2	<i>Mögliche Schlussfolgerungen auf die Embryonalentwicklung von GNE-KO-Mäusen .....</i>	48
<b>5.5</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>THESEN DER DISSERTATION .....</b>	<b>63</b>
	<b>TABELLARISCHER LEBENS LAUF</b>	
	<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b>	
	<b>ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE</b>	
	<b>DANKSAGUNG</b>	

## Verzeichnis über Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AP	Alkalische Phosphatase
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
C <sub>T</sub>	reshold cycle
cDNA	komplementäre DNA
CHO-Zellen	Chinese hamster ovary-Zellen
CMP	Cytidinmonophosphat
CRMP 1	Collapsin Response Mediator Protein 1
d	Tag
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
EB	Embryoid body
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
erk	extracellular-signal-regulated kinase
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fwd	Forward
G	Guanin

## Verzeichnis über Abkürzungen

---

Gal	D-Galaktose
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glukosamin
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GNE	UDP-N-Acetylglukosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin- Kinase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HIBM	Hereditary Inclusion Body Myopathy
ICM	Inner cell mass
Ig	Immunglobulin
JNK	c-Jun N-terminal Kinases
kDa	Kilo Dalton
KDN	2-Keto-3-Deoxy-D-Glycero-D-galactosaminsäure
KO	Knockout
LIF	Leukemia-inhibitory-factor
ManNAc	N-Acetylmannosamin
ManNProp	N-Propanonylmannosamin
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein- Kinase
Mid 1	Midline 1
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NEAA	Non Essential Amino Acids
NEU	Neuramidase
NeuAc	N-Acetylneuraminsäure
NGF	Neuronal Growth Factor
Oct-4	octamer-binding transcription factor 4
P	Phosphat
PBS	Phosphat-Buffered Saline
PC-12-Zellen	Pheochromocytoma-Zellen
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PLZF-1	promyelocytic leukemia zinc finger protein
rev	Reverse

## Verzeichnis über Abkürzungen

---

RNA	Ribonukleinsäure
qRT-PCR	quantitative Real-time Polymerase-Ketten-Reaktion
Sia	Sialinsäure
Siglecs	Sialic acid-recognizing immunoglobulin superfamily lectins
Sox-2	Sex determining region Y-box 2
SR	serum replacement
SSEA1	Stage-Specific Embryonic Antigen 1
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	Unit
u.a.	unter anderem
UDP	Uridin-Di-Phosphat
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

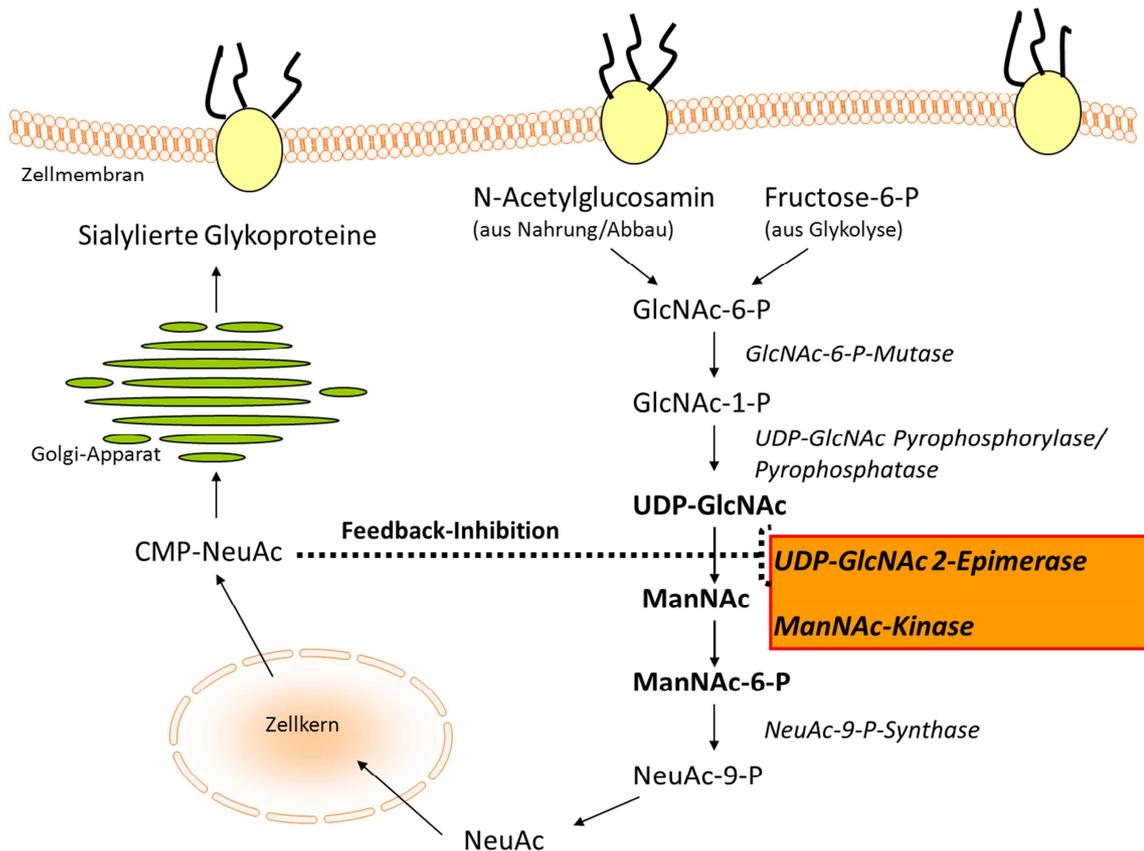
# 1 Einleitung

## 1.1 Die UDP-N-Acetylglucosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase (GNE)

Die UDP-N-Acetylglucosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase (GNE) ist ein 75 kDa schweres, 722 Aminosäuren langes bifunktionelles Enzym (Stäsche et al., 1997), welches eine N-terminale Kinase-Domäne und die C-terminale Epimerase-Domäne besitzt. Beide Domänen können *in vitro* unabhängig voneinander exprimiert werden (Effertz et al., 1999). Von der Epimerase- (Campbell et al., 2000) wie von der Kinase-Domäne ist die kristalline Struktur bekannt (Tong et al., 2009; Martinez et al., 2012). Die GNE ist das Schlüsselenzym für die Biosynthese von Sialinsäuren, da sie den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysiert und durch das Produkt des Biosynthesewegs, der CMP-Neuraminsäure (CMP-NeuAc), in einem Feedbackmechanismus gehemmt wird. Dadurch ist die GNE hauptverantwortlich für die Regulation der Sialylierung der Zelloberfläche (Keppler et al., 1999). Die de-novo-Biosynthese von Sialinsäuren geht von Fructose-6-Phosphat aus, was aus der Glykolyse abgezweigt werden kann. Durch eine Aminotransferase wird es in Glucosamin-6-Phosphat umgewandelt, die Aminogruppe wird anschließend durch Deacetylierung von Acetyl-CoA acetyliert. Die N-Acetylglucosamin-6-Phosphat-Mutase wandelt nun N-Acetylglucosamin-6-Phosphat (GlcNAc-6-P) in N-Acetylglucosamin-1-Phosphat (GlcNAc-1-P) um. Die UDP-GlcNAc-Pyrophosphorylase katalysiert die weitere Reaktion zu UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Die GNE als bifunktionelles Enzym in der Biosynthese von Sialinsäuren übernimmt nun die folgenden 2 Schritte, die Epimerase-Domäne katalysiert die Reaktion von UDP-GlcNAc zu N-Acetylmannosamin (ManNAc), während die Kinase-Domäne die anschließende Phosphorylierung zu N-Acetylmannosamin-6-Phosphat (ManNAc-6-P) katalysiert. Steht genügend freies N-Acetylmannosamin zur Verfügung, kann die Phosphorylierung neben der GNE auch von einer weiteren Zuckerkinase, der GlcNAc-Kinase, übernommen werden.

Die isolierte GNE aus Rattenleber kommt in 2 oligomeren Zuständen vor (Hinderlich et al., 1997). Als Hexamer/Tetramer ist sowohl Epimerase- als auch Kinase-Aktivität nachweisbar, als Dimer zeigt die GNE nur Kinase-Aktivität. Abhängig vom Vorhandensein des Substrats UDP-GlcNAc assoziieren oder dissoziieren die Monomere (Blume et al., 2004; Ghaderi et al., 2007). Aus N-Acetylmannosamin-6-Phosphat stellt die Zelle durch weitere enzymatische Reaktionen (u.a. über Synthese von N-Acetylneuraminsäure-9-Phosphat, welches dann durch eine Phosphatase wiederum die Phosphatgruppe verliert) N-Acetylneuraminsäure her. Die

abschließende Aktivierung von N-Acetylneuraminsäure zu CMP-Neuraminsäure findet im Gegensatz zu allen anderen Zuckern bei Vertebraten im Zellkern statt. Über einen CMP-Sialinsäuretransporter gelingt der Transfer der aktivierten Sialinsäuren in den Golgiapparat, wo sie an die entsprechenden Glycokonjugate (in der Regel an Galaktosereste) gekoppelt werden. N-Acetylglucosamine können auch aus Abbauprodukten des Oligosaccharidstoffwechsels oder aus der Nahrung aufgenommen werden und dann durch entsprechende Phosphorylierungen in den Sialinsäurestoffwechsel eingeschleust werden (siehe Abb. 1) (Angata et al., 2002).



**Abbildung 1: Der Biosyntheseweg der Sialinsäuren**

Dargestellt sind die enzymatischen Schritte im Syntheseweg der Sialinsäuren in der Zelle. Das bifunktionelle Enzym UDP-Glc-Nac2-Epimerase/ManNAc-Kinase ist orange unterlegt .

Die GNE kommt hauptsächlich im Zytosol vor. In einigen Arbeiten wurde die GNE auch im Golgiapparat und im Zellkern nachgewiesen. Die Präsenz der GNE im oder am Kern legt die Vermutung nahe, dass sie noch weitere Funktionen neben der Sialinsäurebiosynthese hat. Es wird zum Beispiel die Aufgabe der GNE als nuklear-zytoplasmatisches Shuttleprotein bzw. ein Einfluss auf Transkriptionsvorgänge diskutiert (Krause et al., 2005).

Die GNE wird *in vitro* von der Proteinkinase C phosphoryliert, wodurch ihre Aktivität hochreguliert wird (Horstkorte et al., 2000). Zudem ist die GNE auch epigenetisch reguliert (Oetke et al., 2003).

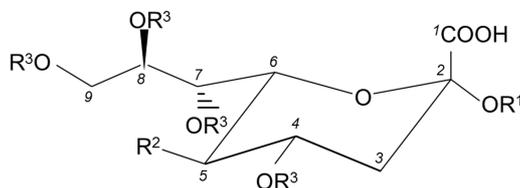
Wang et al. beschreiben, dass die Hoch- bzw. Herunterregulation der GNE in humanen embryonalen Nierenzellen das mRNA-Level von Sialyltransferasen sowie die Produktion der Ganglioside GM3 und GD3 beeinflusst. Auch exogene Ganglioside können die Aktivität der GNE verändern (Wang et al., 2006). GM3 und GD3 nehmen über verschiedene Mechanismen Einfluss auf Vorgänge der Apoptose und Zellstressauslösung und auf Proliferationsveränderungen (siehe Malisan und Testi, 2005). Auf weitere Funktionen der GNE neben der Sialinsäurebiosynthese weisen außerdem die nachgewiesenen Protein-Protein-Interaktionen der GNE mit collapsin response mediator protein 1 (CRMP-1) und promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) hin (Weidemann et al., 2006). Zudem interagiert die GNE mit  $\alpha$ -Actinin 1, welches als Aktinbindendes und verlinkendes Protein zur Spektrin-Familie gehört (Amsili et al., 2008).

Die mRNA der GNE konnte im Menschen in Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas nachgewiesen werden. Die höchste Aktivität fand sich in der Leber und in der Plazenta (Lucka et al., 1999). Im Skelettmuskel konnte eine Hochregulierung der GNE bei verletzten Myofibrillen festgestellt werden (Nakamura et al., 2010). In Pankreastumorzellen interagiert die GNE mit dem Tumorsuppressor p16, die Herunterregulierung der GNE führt zu Apoptosevorgängen in der Zelle (Kemner et al., 2012).

Zurzeit sind 8 verschiedene Isoformen der GNE im Menschen bekannt (Yardeni et al., 2011).

## 1.2 Sialinsäuren, Sialinsäure-erkennende Strukturen und ihre Funktionen

Die Familie der Sialinsäuren umfasst strukturell sehr viele Zuckermoleküle mit dem Grundbaustein eines 9-Kohlenstoff-Zucker-Grundgerüsts und jeweils unterschiedlichen Resten (siehe Abb. 2) (Comb und Roseman, 1960).



**Abbildung 2: Die Struktur der Sialinsäuren**

**R<sup>1</sup> repräsentiert einen anderen Zucker (Gal, GalNAc, Sia). Substituenten R<sup>2</sup> können sein -NH bei Neuraminsäure, -OH in KDN. R<sup>3</sup> stellen Modifikationen an der Hydroxylgruppe C4 und C7-9 dar.**

Bis heute sind über 50 verschiedene Sialinsäuren bekannt, die sich strukturell vor allem durch die unterschiedlichen Modifikationen der Hydroxylgruppen an C4 und C7-9 an den zwei

humanen Basissialinsäuren N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und 2-Keto-3-Deoxy-D-Glycero-D-galactosaminsäure (KDN) unterscheiden (Angata, 2006).

Die Sialinsäuren befinden sich vor allem terminal an den Glykokalix-Zuckerketten der Zellen, als Bestandteil von Glykoproteinen oder –lipiden oder in der Zuckerkette von Oligo- oder Polysacchariden. Unter physiologischen Bedingungen sind sie negativ geladen. Dadurch interagieren sie mit positiv geladenen Molekülen, negativ geladene Teilchen wie andere Sialinsäuren stoßen sie ab. Diese Effekte stabilisieren unter anderem die korrekte Formation von Glykoproteinen auf der Zelloberfläche. Zusätzlich profitieren die Glykoproteine vom antiproteolytischen Effekt der Sialinsäuren. Da die Sialinsäuren eine der äußersten Strukturen an der Zelle darstellen, haben sie auch eine bedeutende Funktion in der Zell- und Molekülerkennung. Beispielsweise unterscheidet das Immunsystem anhand des Sialylierungsmusters der Zellen zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen (Schauer, 2000). Sialinsäuren werden von 2 großen Gruppen von Lektinen erkannt, von Selektinen und von „Siglecs“ (Sialic acid recognizing immunoglobulin superfamily lectins). Selektine spielen eine bedeutende Rolle bei der Adhäsion, dem Rollen und des Drifts von weißen Blutkörperchen aus dem Blut in das Gewebe (Varki, 2007). „Siglecs“ sind Transmembranproteine mit einer extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne, die meist in die Signaltransduktion involviert ist (Angata, 2006; Crocker, 2002). Sie erkennen spezifisch Sialinsäuren an den Zelloberflächen. Zu den „Siglecs“ gehören spezifische Glycoproteine des Immunsystems, wie CD 22, Sialoadhäsine und CD 33 (Munday et al., 1999; Carlin et al., 2009). Sialinsäuren sind mit für die Antigenität von Zellen verantwortlich, als Beispiel seien hier die unterschiedlichen Blutgruppen-Antigene genannt (Cohen et al., 2009; Chen et al., 2010). Zudem sind sie selbst Bestandteile von verschiedenen Rezeptoren (Traving et al., 1998). Auch Pathogene wissen um die Sialinsäuren der Wirtszellen, sie erkennen dadurch ihre Wirtszellen, nutzen sie beispielsweise als Rezeptoren, um von ihren Wirtszellen endozytiert zu werden oder auch einfach als Energiespender (Vimr et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass eine *in vitro* reduzierte Sialylierung von Caco-2-Zellen die Adhäsion von *Salmonella typhi* an diese Zellen minimiert (Sakarya et al., 2010). Einige Pathogene, wie zum Beispiel das Influenzavirus, besitzen Neuaminidasen und Sialidasen, um Sialinsäuren nach der Infektion der Zellen zu entfernen (Colman, 1994). Es gibt Bakterien, wie Gruppe B –Streptokokken, die ihre Virulenz steigern indem sie auf ihrer Zelloberfläche ebenfalls human-ähnliche Sialinsäure-Expression zeigen, welche dann sowohl von Faktor H als auch von CD33rSiglecs als „selbst“ erkannt werden (Carlin et al., 2007, 2009).

Neben Funktionen in der Zellerkennung nutzt die Zelle Sialinsäuren auch für Maskierungszwecke. Beispielsweise tragen Erythrozyten an ihrer Oberfläche viele Sialinsäuren, die im Laufe der 120 Tage Lebenszeit mehr und mehr durch Serumsialidasen oder spontane Hydrolyse abgespalten werden, dadurch werden die nun terminalen Galaktosereste der Zuckerketten von Asialoglycoproteinrezeptoren der Makrophagen erkannt und die Erythrozyten abgebaut. Diese Maskierungseffekte nutzen auch Tumorzellen. Veränderte Oberflächensialylierung ist ein Merkmal von Krebszellen, dabei ist das Metastasierungsrisiko positiv mit der Oberflächensialylierung korreliert (Yogeeswaran und Salk, 1981). Vor allem die Expression von fucosylierten Glykanen wie das sialylierte Lewis<sup>x/a</sup> auf Tumorzellen geht mit einer schlechten Prognose und einem hohen Metastasierungsrisiko einher. Die sialylierten Lewis<sup>x/a</sup>-Glycane werden von P-, L- und E-Selektinen erkannt und ermöglichen eine Interaktion mit Thrombozyten, Leukozyten und dem Endothel. Im Blutsystem wird das Überleben der Tumorzellen durch die Interaktion mit Blutplättchen und Leukozyten erleichtert. Über P-Selektine adhären Thrombozyten an einige Tumorzellen. Durch die Inhibition dieser Interaktion wird die Metastasierungsrate gesenkt. Das Antikoagulum Heparin inhibiert P- und L-Selektine, genauso wie bekannt ist, dass es Tumorstadium und Metastasierung unterdrückt. Über das Binden von Tumorzellen an E-Selektine auf aktiviertem Endothel könnte das Verlassen der Tumorzellen aus dem Blutstrom und das Ansiedeln in neuem Gewebe erleichtert werden (Borsig et al., 2002). In einigen Tumorzellen lässt sich eine höhere Aktivität der Sialyltransferasen nachweisen, dadurch tragen die Zellen deutlich mehr Sialinsäuren an der Oberfläche als die entsprechenden normalen Gewebszellen. Entsprechend werden diese Zellen nicht vom Immunsystem erkannt. Zudem kommen dadurch weniger terminale Galaktosereste in der Glykokalix vor und das Zellwachstum wird weniger inhibiert. Außerdem könnte dieser Effekt dazu beitragen, dass bei Tumorzellen die Kontaktinhibition gestört ist (Traving et al., 1998). Polysialylierung von Tumorzellen erhöht ebenfalls das Metastasierungsrisiko, da durch die Polysialylierung die Kontakte zwischen den einzelnen Zellen weiter reduziert werden (Roth und Zuber, 1990).

Die Polysialylierung wird sowohl durch die Expression entsprechender Polysialyltransferasen als auch durch die intrazelluläre Konzentration von Sialinsäuren reguliert (Bork et al., 2005). Der Sialinsäuremetabolismus ist an Zellregulations- und Differenzierungsprozessen beteiligt. Kontou et al. konnten zeigen, dass bei Zugabe von ManNAc PC-12-Zellen neuronal differenzieren. Zudem führt eine Zugabe von ManNAc zu einer erhöhten Phosphorylierung von erk1/2 und dessen vermehrten Akkumulation im Kern, sowie zu einer höheren Expression von c-Jun. Diese Veränderungen erinnern an die Signaltransduktionskaskade des Neuronal Growth Factors (NGF), welche über Stimulation der MAP-Kinase und des JNK-Pathways zu einer

Aktivierung von erk1/2 und c-Jun führt und damit zu einer maximalen neuronalen Überexpression in PC-12-Zellen führen. Auch wenn es durch ManNAc nicht wie durch NGF zur Phosphorylierung von c-Jun kommt, scheinen die Vorläufer in der Lage zu sein, PC-12-Zellen in die neuronale Differenzierungsrichtung zu lenken. Außerdem inhibieren die Sialinsäurevorläufer die Proliferation von Zellen und schaffen damit die Voraussetzung für eine Differenzierung (Kontou et al., 2008).

Die Oberflächensialylierung wird in embryonalen Stammzellen durch L1 moduliert und ist mitverantwortlich für die Proliferation und das Überleben der Zellen (Li et al., 2009).

Zurzeit sind 4 Sialidasen (=Neuramidasen NEU) bekannt, die sialylierte Glycoproteine desialylieren (Tauber et al., 1983). NEU 1 ist ein lysosomales Enzym, NEU 2 ist im Zytosol lokalisiert (Monti et al., 1999), NEU 3 ist zellmembran-assoziiert und zudem in Prozesse der Zelldifferenzierung und des Transmembran-Signaling in neuronalen Zellen involviert (Proshin et al., 2002). NEU 4 kommt in Lysosomen und Mitochondrien vor (Monti et al., 2004). Die Halbwertszeit von den terminalen Sialinsäuren an den Glycoproteinen liegt zwischen 12 und 30 Stunden.

### 1.3 Pathologie der GNE

Zurzeit sind zwei erbliche Krankheiten bekannt, die mit Mutationen im *GNE*-Gen einhergehen, die Sialurie und die hereditäre Einschlusskörpermyopathie (engl. Hereditary Inclusion Body Myopathy, HIBM). Bei beiden Erkrankungen befinden sich Mutationen in den aktiven Anteilen bzw. in den strukturelevanten Abschnitten der Epimerase bzw. Kinase- Domäne der GNE (Kurochkina et al., 2010).

Die Ursache der sehr seltenen Sialurie ist das Fehlen der Feedback-Inhibierung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase durch die aktivierte Sialinsäure CMP-Neu5Ac (Seppala et al., 1991). Dadurch kommt es zu einer kontinuierlichen Überproduktion von freier N-Acetylneuraminsäure, was letztlich zu einer zytoplasmatischen Akkumulation und erhöhten Ausscheidung von Sialinsäuren im Urin führt. Klinisch sind eine variable Entwicklungsverzögerung, faziale Veränderungen und eine Hepatomegalie zu beobachten. Molekulare Ursache ist eine Punktmutation in der allosterischen Region der GNE. Ein heterozygotes Vorliegen dieser Mutationen reicht aus, um klinisch eine Sialurie diagnostizieren zu können (Seppala et al., 1999; Leroy, 2001).

Die HIBM ist eine neuromuskuläre Erkrankung, die sich histopathologisch in „rimmed“, eventuell autophagozytotischen, Vakuolen und filamentösen Einschlüssen äußert. In den Muskelbiopsien der Betroffenen ist kaum Entzündung nachweisbar. In Versuchen mit Zellen

von HIBM-Patienten gibt es unabhängig von der Enzymaktivität der GNE große Oberflächensialylierungsunterschiede (Nishino et al., 2005; Broccolini et al., 2008). Außerdem konnte in Muskelbiopsien eine verminderte Sialylierung von NCAM nachgewiesen werden (Ricci et al., 2006). Genauso wurde auch bei anderen Proteinen wie bei der Metallopeptidase Neprilysin eine Hyposialylierung sowie eine verminderte Expression und Aktivität nachgewiesen. Neprilysin spaltet dadurch weniger Amyloid  $\beta$ , wodurch dieses akkumuliert (Broccolini et al., 2008). Es sind sowohl autosomal dominante als auch (häufiger vorkommend) autosomal rezessive Formen beschrieben. Klinisch wird die HIBM durch eine langsame von distal nach proximal fortschreitende Muskelschwäche charakterisiert. Die autosomal-rezessive Form äußert sich in einer vor allem die Beinmuskeln betreffenden Myopathie, wobei der Musculus femoris quadrizeps nie betroffen ist. Es handelt sich um eine Myopathie des Erwachsenenalters. Zudem besteht bei den Betroffenen meist nur eine mäßige Erhöhung der Creatinkinase im Blut. Die molekularbiologische Ursache der autosomal rezessiven Krankheit ist eine Mutation auf Chromosom 9p 12 - 13 im *GNE*-Gen. Dabei wird der Phänotyp der HIBM unabhängig davon, ob sich die Mutation nur in der Epimerase- oder nur in der Kinasedomäne oder in beiden befindet, ausgebildet (Eisenberg et al., 2001; Penner et al., 2006). Allerdings sind Patienten mit homozygoter Mutation in der Kinasedomäne häufig stärker betroffen als Patienten, welche compound heterozygot für Mutationen in der Kinase- und Epimerasedomäne sind (Mori-Yoshimura et al., 2012). Bei gleicher Mutation sind unterschiedliche klinische Symptome beschrieben, was epigenetische Faktoren vermuten lässt (Broccolini et al., 2011). Phänotypisch zeigen sich bei gesicherter Mutation im *GNE*-Gen vereinzelt auch untypische Myopathien mit Beteiligung des Quadriceps oder Fehlen des distalen Beginns der Muskelerkrankung (Argov et al., 2003). Zusätzlich sind Fälle mit sehr langsamer Progression der klinischen Symptome mit Erhalt des Stehens und Laufens mehr als 30 Jahre nach Manifestation beschrieben (Ikeda-Sakai et al., 2012). Weiterhin wird von homozygoten Mutationsträgern, die keine klinischen Symptome zeigen, berichtet. Die therapeutischen Möglichkeiten sind noch sehr beschränkt (Argov und Mitrani-Rosenbaum, 2008). 60 verschiedene Mutationen sind zurzeit bekannt, dabei handelt es sich zu 82% um missense-Mutationen. Untersuchungen zeigen, dass bei den Patienten die Epimerase- und Kinase-Aktivität der GNE mutationsabhängig verringert ist. Ist durch eine Mutation in der Epimerase-Domäne die Aktivität kleiner als 35%, resultiert daraus auch eine geringere Sialylierung der Muskelzellen (Huizing et al., 2009).

## 1.4 Die Bedeutung der UDP-GlcNAc 2-Epimerase bei der Embryogenese der Maus

Am Tag 4 nach der Befruchtung implantiert sich bei der Maus die Blastozyste. Die Blastozyste entsteht aus dem vorangegangenen Morulastadium und besteht aus Trophektoderm und der Inneren Zellmasse (ICM). Ausgehend von der ICM bildet sich primitives Endoderm, was sich dann in viszerales und parietales Endoderm differenziert. Am Embryonaltag 5 entsteht der Epiblast aus der ICM. Aus ihm werden sich die 3 primären Keimblätter und ebenfalls einige extraembryonale Strukturen entwickeln. Dazu bildet sich am Tag 6 der frühe Primitivstreifen als Voraussetzung für die folgende Gastrulation. Bei der Gastrulation wandern Epiblastzellen auf den Primitivstreifen zu und migrieren darin. Da sich aus diesen Zellen das definitive Endoderm und Mesoderm entwickelt, wird der Zellverband auch Mesendoderm genannt. Die verbleibenden Epiblastzellen werden das definitive Ektoderm. Das Trophektoderm stellt das Ausgangsgewebe für die extraembryonalen Strukturen dar, welche eine entscheidende Rolle für die Embryonalentwicklung spielen (Tam et al., 2007). Nach der Gastrulation beginnt die Neurulation ausgehend vom Ektodermgewebe; aus dem Endoderm beginnt sich der Darmschlauch zu formen. Zwischen Embryonaltag 8,5 -9,5 findet die Inversion der Keimblätter statt, wodurch die Amnionhöhle entsteht. Bis zum 14. Tag nach Befruchtung bilden sich die einzelnen Organe aus. Aus den ehemaligen Ektodermzellen entsteht das neuronale Gewebe und die Haut; ausgehend vom Endoderm bilden sich der Darm, die Lungen, das Pankreas und die Schilddrüse. Andere Gewebe wie Muskulatur, Knochen oder das Blut entstehen durch die Differenzierung der Mesodermzellen. Die Geburt der Embryonen findet um den Tag 20 statt. Das Vorhandensein von mRNA der GNE bei Wildtyp-Mausembryonen wurde an Embryonaltag 7, 11, 15 und 17 untersucht und nachgewiesen, auch beim Embryo ist vergleichend mit der Expression der Gewebe der adulten Maus am meisten GNE-mRNA in Leber, Lunge, Niere und Gehirn. Es wurde keine entwicklungsabhängige Regulation der GNE gefunden (Horstkorte et al., 1999).

Kreuzt man 2 heterozygot GNE-defiziente Mäuse entsteht in etwa die nach Mendel zu erwartende Verteilung von Wildtyp-Mäusen: Heterozygoten-Mäusen = 1:2. Allerdings werden keine homozygot UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten Mäuse geboren. Am Embryonaltag 8,5 konnten 10 %, am Embryonaltag 9,5 6%, nach Tag 10,5 keine homozygoten Embryonen identifiziert werden. Die Abwesenheit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase ist also embryonal letal, die homozygoten UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Knock-out-Embryonen sterben zwischen Tag 8,5 und 9,5 (Schwarzkopf et al., 2002).

## 1.5 GNE- Heterozygote Mäuse

Heterozygote Mäuse für das UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Gen zeigen eine normale Entwicklung, sind fertil und zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten. Allerdings ist ihre organspezifische Sialylierung insgesamt um 25 % reduziert. In den normalerweise hoch-sialylierten Organen (Gehirn, Rückenmark, Lunge, Milz, Blutzellen, Submandibulardrüse) findet sich statt 40-60 nmol Sialinsäuren/mg Membran wie in den Organen der Wildtyp(WT)-Mäuse nur 30- 40 nmol Sialinsäuren/mg Membran. Eine Ausnahme stellt dabei die Milz dar, hier konnte ähnlich zu der Wildtyp-Niere eine Sialylierung von 55 nmol/mg Membran festgestellt werden. Bei der Untersuchung der niedrig-sialylierten Organe (Leber, Herz, Niere, Skelettmuskel), die auch bei den WT-Mäusen nur circa 10-25 nmol Sialinsäuren/mg Membran enthalten, ist ebenfalls bei den Organen der heterozygoten Mäuse eine reduzierte Sialylierung auf nur 9 – 13 nmol Sialinsäuren/mg Membran festzustellen. Die Niere ist das einzige Organ, in dem kein Unterschied der Sialylierung zwischen WT- und heterozygoten Mäusen festgestellt werden konnte (Gagiannis et al., 2007).

Die Konzentration von Serum-Transferrin ist in WT- und Heterozygoten GNE-defizienten Mäusen gleich. In der 2-dimensionalen Gel-Elektrophorese finden sich aber bei Transferrin aus den heterozygoten Tieren mehrere Spots mit einem höheren pI im Gegensatz zu dem Transferrin aus WT-Mäusen und außerdem ein geringfügig kleineres Gewicht des Transferrins, was für eine geringere posttranslationale Modifikation mit den negativ geladenen Sialinsäuren spricht. Auch NCAM wird in heterozygoten Mäusen deutlich weniger polysialyliert (Gagiannis et al., 2007).

## 1.6 Wildtyp- und UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defiziente embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden am Embryonaltag 3,5 aus der Inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen. Per Definition können sie sich nach Injektion in eine leere Blastozyste und Reimplantation zu einer lebensfähigen Maus entwickeln (Martin, 1981). Es konnte gezeigt werden, dass Stammzellen sich nach Differenzierungsinduktion auch *in vitro* in viele unterschiedliche Gewebezellen entwickeln können (Yamanaka et al., 2007).

Embryonale GNE-defiziente (KO) Stammzellen sind in Zellkulturen lebensfähig. Sie zeigen in Wachstum und Morphologie in serum- und sialinsäure-haltigem (FCS) Medium keinen nennenswerten Unterschied zu embryonalen Wildtyp (WT) Stammzellen. In den ES-WT-Zellen ist die Epimeraseaktivität bei Kultivierung in Serumersatz (SR)-haltigem Medium im Vergleich

zur Kultivierung in FCS-haltigem Medium hochreguliert, was dadurch zu erklären ist, dass SR-haltiges Medium viel weniger Sialinsäuren und sialylierte Glycoproteine sowie kein ManNAc im Gegensatz zu FCS-haltigem Medium enthält. Die Aufnahme von Sialinsäuren aus SR-haltigem Medium und deren Wiederverwendung durch die ES-WT-Zellen scheinen den Eigenbedarf nicht zu decken (Weidemann et al., 2010).

Bei Kultivierung der Stammzellen in SR-haltigem Medium exprimieren ES-KO-Zellen 70 % weniger Sialinsäuren auf ihren Zelloberflächen, im serumhaltigen Medium ist die Zelloberflächensialylierung nur um 28% reduziert (Schwarzkopf et al., 2002). Bei der Sublimierung des Sialinsäurevorläufermoleküls ManNAc zum SR-Medium steigt bei den ES-KO-Zellen die Zelloberflächensialylierung wieder an (Weidemann et al., 2010). ManNAc kann auch durch andere Zuckerkinasen der Zellen phosphoryliert werden, im Gegensatz zu der Epimerisierung von UDP-GlcNAc zu ManNAc, welche nur durch die UDP-GlcNAc-2-Epimerase möglich ist.

ES-KO-Zellen proliferieren in SR-haltigem Medium schneller als ES-WT-Zellen. Wird dem SR-haltigem Medium zusätzlich ManNAc zugegeben, reduziert sich die Wachstumsgeschwindigkeit der ES-KO-Zellen wieder auf das Niveau der ES-WT-Zellen.

Untersuchungen zur Genexpression auf mRNA-Ebene in ES-KO- und ES-WT-Zellen zeigten, dass beide Genotypen insgesamt 75 Gene unabhängig von Kulturbedingungen und Sialinsäuregehalt des Mediums in unterschiedlichem Ausmaß exprimieren. Besonders stark herunterreguliert ist in KO-Zellen die Expression von Midline I (in der quantitativen Real-time-PCR (qRT-PCR) 4-fach herunterreguliert) und Musculin/MyoR (in RT-PCR 10-fach herunterreguliert), demgegenüber exprimieren KO-Zellen viel stärker Core-1-beta1,3-Galactosyltransferase (C1GalT1) (in der qRT-PCR 3-fach hochreguliert). Durch die geringe Sialylierung der Zelloberfläche scheint die Zelle über die vermehrte Aktivität der Galaktosyltransferase mehr potentielle Galaktosereste für das Anhängen von Sialinsäuren bereitstellen zu wollen. In FCS-haltigem Medium ist in ES-KO-Zellen viel weniger mRNA von ST3-beta-Galactoside-alpha-2,3-Sialyltransferase 5 (ST3Gal5=GM3-Synthase) nachweisbar. Auch verschiedene Wachstumsfaktoren sind in den ES-KO-Zellen weniger exprimiert, als Beispiele seien hier Neurotrophin 5, der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 7 und 1, der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 und der TNF-Rezeptor-assoziierte Faktor zu nennen, welche alle in Differenzierungsprozessen eine Rolle spielen. Auch Gene, die wesentliche Rollen in der Zellzyklusregulation haben, werden von GNE-defizienten Stammzellen anders exprimiert als von ES-WT-Zellen. Transformation related protein 53 (Trp53) ist herunterreguliert, während das antiapoptotische Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1 (Mapk8ip1) und das die Zellmorphologie und Motilität beeinflussende p21/Cdc42/Rac-activated Kinase 1 (Pak-1)

in ES-KO-Zellen hochreguliert sind. Diese Ergebnisse decken sich mit der gesteigerten Proliferation der ES-KO-Zellen in SR-Medium. Im Zusammenhang mit dem Abbauweg von Proteinen sind 7 Gene in den ES-KO-Zellen herunterreguliert und nur 1 hochreguliert (Weidemann et al., 2010).

## 2 Zielsetzung

Die frühe Letalität (am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung) der GNE-defizienten Mäuse ist nicht geklärt. Zum einen könnte das Fehlen der Sialinsäuren der Grund sein, wobei die Embryonen auch fehlende Sialinsäuren über die Plazenta aus dem Blut der Mutter aufnehmen könnten. Zum anderen könnte die nicht funktionsfähige GNE selbst zum Absterben der Embryonen führen.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob ein Unterschied in der frühembryonalen Differenzierung in die drei Keimblätter zwischen Wildtyp- und GNE-defizienten Zellen, als mögliche Ursache für die frühe Letalität, besteht.

Embryonale Stammzellen werden am Tag 3,5 aus der inneren Zellmasse der noch nicht eingesteten Blastozyste gewonnen. Embryonale Stammzellen bilden unter bestimmten Voraussetzungen sogenannte Embryoid bodies, diese bestehen aus ersten differenzierten Zellen und spiegeln unter experimentellen Bedingungen die Embryogenese wieder.

Die Differenzierung von ES-WT und ES-KO-Zellen soll sowohl morphologisch als auch mittels quantitativer Real-Time-PCR anhand von spezifischen Markergenen verglichen werden. Die Zellen sollen in serum- und sialinsäurehaltigem (FCS-) Medium und in sialinsäurefreiem Serumersatz (SR)-Medium kultiviert und analysiert werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Zellkulturmaterialien

Laborchemikalien wurden von den Firmen ICN (Eschwege), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Boehringer Mannheim, Biochrom (Berlin), Serotech (Berlin), Gibco (Detroit, USA) und Sigma (München) bezogen. Bei den entsprechenden Methoden sind weitere Chemikalien und Reagenzien anderer Hersteller ausgewiesen. Sterile Einmal-Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Falcon (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

##### 3.1.2 Zellen

###### a) Embryonale Stammzellen der Maus

Murine embryonale Stammzellen wurden aus Blastozyten von heterozygoten C57BL/6-Weibchen (Schwarzkopf et al., 2002) nach Verpaarung mit heterozygoten Männchen isoliert. Für Vergleiche zwischen beiden Genotypen ist es notwendig, dass die Zellen aus einer Maus als Schwesterblastozysten isoliert wurden. Die Zellen wurden mir von der AG Horstkorte bereitgestellt.

###### b) CHO-Zellen

Als Negativkontrolle für den Nachweis der Stammzellmarker wurden CHO-(Chinese hamster ovary) Zellen verwendet. Auch diese Zellen wurden mir von der AG Horstkorte bereitgestellt.

##### 3.1.3 Oligonucleotide

###### a) Primer für die Genotypisierung der Embryonalen Stammzellen

**Tabelle 1** Sequenzen der spezifischen Primer und Größe der Produkte im DNA-Gel

Wildtyp-Allel 1	5' – GAT TGA AAT ATG CCC AAT ACT TTG – 3' 5' – CAC ATA CCG CAT GAT TGA GC – 3'	550 bp
Wildtyp-Allel 2	5' – GCT GCT AAT AGA ATA CTG TGT CC – 3' 5' – CAC CAG GCT CCA CAC GAT TG – 3'	500 bp
Knockout-Allel 1	5' – CGA AGG AGC AAA GCT GCT ATT GGC – 3' 5' – GCC ACA TCC GAA TGA TGC TC – 3'	700 bp

Knockout-Allel 2	5' – CGA AGG AGC AAA GCT GCT ATT GGC - 3'	750 bp
	5' – GAT TGA AAT ATG CCC AAT ACT TTG – 3'	

**b) Primer für die Real-time-PCR**

**Tabelle 2 Sequenzen der spezifischen Primer und Größe der Produkte im DNA-Gel**

GAPDH fwd	5'- CCT TCA TTG ACC TCA ACT AC - 3'	259 bp
GAPDH rev	5'- GAG ATG ATG ACC CTT TTG GC - 3'	
Sox-2 fwd	5'- AAG GGT TCT TGC TGG GTT TT - 3'	150 bp
Sox-2 rev	5'- AGA CCA CGA AAA CGG TCT TG - 3'	
Oct-4 fwd	5'- GGC GTT CTC TTT GGA AAG GTG TTC - 3'	312 bp
Oct-4 rev	5'- CTC GAA CCA CAT CCT TCT CT - 3'	
Nestin fwd	5'- GAG AAG ACA GTG AGG CAG ATG AGG TTA - 3'	113 bp
Nestin rev	5'- GCC TCT GTT CTC CAG CTT GCT - 3'	
Nodal fwd	5'- GGA GTT TCA TCC TAC CAA CC - 3'	386 bp
Nodal rev	5'- TCC TGC CAT GCC ACG GTA GC - 3'	
Nkx-2,5 fwd	5'- CGA CGG AAG CCA CGC GTG CT - 3'	181 bp
Nkx-2,5 rev	5'- CCG CTG TCG CTT GCA CTT G - 3'	
Cdx-2 fwd	5'- GCA GTC CCT AGG AAG CCA AGT GA - 3'	162 bp
Cdx-2 rev	5'- CTC TCG GAG AGC CCA AGT GTG - 3'	

**c) Primer für den Test auf Mycoplasmenkontamination**

**Tabelle 3 Sequenzen der verwendeten Myco-Primer und Größe des Produkts im DNA-Gel**

Myco fwd	5' – GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG - 3'	500 bp
Myco rev	5' – CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT – 3'	

**3.1.4 Enzyme**

DNase	Roche, Mannheim
TaqPolymerase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Trypsin (2,5%)	Viralex, PAA Laboratories

**3.1.5 Medien und Medienzusätze**

DMEM (Dulbecos Modified Eagle Medium)	PAN
NEAA, Non Essential Amino Acids	Gibco
β-Mercaptoethanol	Gibco

L-Glutamin	Gibco
Adenosin	Sigma
Guanosin	Sigma
Uridin	Sigma
Cytidin	Sigma
Thymidin	Sigma

### **3.1.6 Antibiotika**

Penicillin	PAA
Streptomycin	PAA

### **3.1.7 Seren**

FCS	PAA
SR	Gibco

### **3.1.8 Bestandteile der extrazellulären Matrix**

Gelatine	Sigma
----------	-------

### **3.1.9 Wachstumsfaktoren**

ESGRO, Leukemia Inhibitory Factor	Chemicon
-----------------------------------	----------

### **3.1.10 Kits**

SuperScript	Invitrogen
-------------	------------

### **3.1.11 DNA-Größenmarker**

Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder-Plus	Fermentas
----------------------------------	-----------

### **3.1.12 Agarose**

Agarose NEE0	Carl-Roth-GmbH (Karlsruhe)
--------------	----------------------------

### **3.1.13 Geräte**

Brutschrank	Heraeus 6000, Kendro Laboratory Products
Digitalkamera	Nikon
Feinwaage	Adventure, Ohaus

Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200, Zeiss
Kühlzentrifuge	Sorvall RC-5B Kendro Laboratory Products
Mikroskop	Diavert, Leica
Multicolor- Real-time-PCR	Bio-Rad
PCR-Cycler	Robo-Cycler Gradient 96, Stratagene
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf
Pipetten	Eppendorf Research, Eppendorf
Sterilbank	Gelaire Class 100, Gelman Inst.
Thermomixer compact	Eppendorf
UV-Transilluminator	Bio-Rad
Waage	CP622, Sartorius
Wasserbad	GFL®1003 Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifuge	Kendro Laboratory Products

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 DNA-Grundtechniken

#### a) DNA-Isolierung nach AquaGenomic™ Cell Protocol

DNA wurde zur Genotypisierung aus Embryonalen Stammzellen isoliert. Die Zellen wurden als Pellet in 100 µl AquaGenomic™ Solution (MoBiTec) aufgenommen und resuspendiert. Durch Vortexen konnten die Zellen lysiert werden und bei der Zentrifugation (15 000 g, 2 min) setzten sich die Proteine und andere Zellbestandteile als Pellet ab. Die genomische DNA verblieb im Überstand, der in ein neues Eppendorf-Tube überführt wurde. Mittels Isopropanol (gleiches Volumen wie der überführte Überstand) wurde die DNA nun gefällt und durch Zentrifugation (15 000 g, 2 min) setzte sie sich als Pellet am Boden des Tubes ab. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet 3-malig mit 70% Ethanol gewaschen (je mit ca. 1 ml). Nach dem Lufttrocknen wurde die DNA in 100 µl Aqua dest. aufgenommen.

#### b) Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde mittels Ultraviolettabsorptionsspektrometrie gemessen, dabei besteht eine direkte Proportionalität zwischen dem absorbierten UV-Licht und der Menge der gelösten DNA in der Probe. Die Absorption wurde bei 260 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Um den Reinheitsgrad der isolierten DNA zu bestimmen wurde das Verhältnis des Absorptionswertes von 260 nm zu 280 nm bestimmt. A260/A280-Werte zwischen 1,8 und 2,0 sprechen für eine proteinfreie DNA-Isolierung.

### c) Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Knockout-DNA unterscheidet sich von der Wildtyp-DNA durch das Vorhandensein eines Neomycinresistenz-Gens im 2. Exon des *GNE*-Gens. Um die embryonalen Stammzellen zu genotypisieren wurde mittels spezifischer Primer jeweils eine Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) in einem Thermocycler durchgeführt.

Dieser heizt im ersten Schritt der PCR auf 95°C, dadurch denaturiert die DNA in 2 Einzelstränge. Bei anschließenden 60°C lagern sich die Oligonucleotid-Primer komplementär an. Die *Taq*-Polymerase, eine hitzestabile DNA-Polymerase I vom Bakterium *Thermus aquaticus*, synthetisiert nun bei 72°C mit Hilfe von Desoxyribonucleotiden die Einzelstränge zu neuen DNA-Doppelsträngen. Dieser Zyklus aus Auftrennen der Doppelstränge, Anlagern der Primer, jetzt auch an die bereits neusynthetisierten Stränge, und Verlängerung zum Doppelstrang wiederholte sich insgesamt 30 mal, sodass am Ende der gewünschte Genabschnitt in mehreren hundert Millionen Kopien vorlag.

PCR-Ansatz (50 µl)	100-400 ng DNA
	1 µl Desoxynucleotide (dNTPs) (10 mM)
	je 1 µl Primer forward und reward (10 pmol)
	0,5 µl <i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)
	4 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
	5 µl 10-fach Puffer (+ NH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> )) Fermentas
	x µl H <sub>2</sub> O bidest.

PCR-Programm	3 min 95°C	
	15 s 95°C	} 30 Zyklen
	30 s 60°C	
	2 min 72°C	
	10 min 72°C	
	hold 4°C	

### d) Auftrennen der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese

DNA ist durch die Phosphatgruppen bei pH = 7 polyanionisch, also negativ geladen. Bei Anlegen von elektrischer Spannung wandern die DNA-Fragmente also in Richtung Pluspol

(Anode). Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe und der Ladung des Fragments ab. Im Agarosegel wird die DNA nach ihrer Größe aufgetrennt. Je kleiner die molare Masse, desto schneller laufen die Fragmente. Durch die umgekehrte Korrelation von Fragmentgröße und Laufgeschwindigkeit und durch Mitlaufen eines Größenmarkers können unterschiedlich große DNA-Abschnitte aufgetrennt und in ihrer Größe beurteilt werden. Die Trennschärfe ist außerdem von der Porengröße des Agarosegels abhängig. Je höherprozentig das Gel ist, desto besser trennen sich kleinere Fragmente auf.

Um die DNA-Banden sichtbar zu machen wurden die Gele in einer Ethidiumbromid-Lösung inkubiert. Ethidiumbromid ist ein aromatisches Kation, welches mit der anionischen DNA interkaliert, mittels UV-Licht kann es zum Fluoreszieren angeregt werden.

Für die Analyse der WT- und KO-Allele wurde 1,5 %-iges Agarosegel verwendet. Dazu wurde die Agarose in einem Tris-Acetat-EDTA-Puffer aufgeköcht und nach Abkühlen auf circa 65°C in einen Gelschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Elektrophoresekammer mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer aufgefüllt. Zu den zu analysierenden Proben wurde 10-fach DNA-Probenpuffer gegeben, anschließend wurden die Proben in die Geltaschen gegeben. Es wurden 100-120 V Spannung angelegt, bis die Farbmarker die gewünschte Länge zurückgelegt hatten. Nach 20-30 min Inkubation in der Ethidiumbromid-Lösung wurden die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl, pH 8,5	
	0,1 % Essigsäure	
	2 mM EDTA	
10-fach DNA-Probenpuffer	Glycerin (50%)	25 ml
	EDTA 50 mM	5 ml
	Xylencyanol 0,05 %	0,025 g
	Bromphenolblau	0,025 g
	Aqua dest.	add to 50 ml

### 3.2.2 RNA-Grundtechniken

#### a) RNA-Isolierung mit Trizol (Invitrogen)

Das Pellet aus Zellen wurde in 1 ml Trizol gegeben und durch Schwenken gelöst. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension mit 0,2 ml Chloroform versetzt und 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Die Probe wurde nach 3 min Stehen bei Raumtemperatur bei 4°C zentrifugiert (10000 upm, 15 min). In der oberen wässrigen Phase befand sich nun die RNA, in der Interphase und der unteren rosa Phase war die DNA der Zellen

zu finden. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein vorgekühltes Eppendorf-Tube überführt. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol wurde die RNA gefällt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe bei 4°C zentrifugiert (10000 upm, 10 min), dadurch setzt sich die RNA als Pellet am Boden des Eppendorf-Gefäßes ab. Der Überstand wurde nun verworfen und das RNA-Pellet durch Zugabe einer Mischung aus 75%- Ethanol und Diethylpyrocarbonat(DEPC)-H<sub>2</sub>O mit anschließender Zentrifugation (5000 upm, 5 min, 4°C) gewaschen. Nach Abgießen des Überstands und Trocknen des Pellets wurde die RNA in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Diethylpyrocarbonat reagiert mit den Histidinresten in Proteinen, dadurch kommt es zur Hemmung von Enzymen wie RNasen.

DEPC- H<sub>2</sub>O (0,1 %)      1 ml DEPC  
   1 l Aqua bidest.  
   anschließend autoklaviert

### **b) Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA**

Die RNA-Konzentration wurde ebenfalls photometrisch bei einer Absorption von 260 nm gemessen. Ein bei 260 nm gemessener Absorptionswert von 1,0 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

### **c) Test der gewonnenen RNA auf DNA-Verunreinigung**

Die *Taq* Polymerase ist ein DNA-abhängiges Enzym und eignet sich daher für den Nachweis noch vorhandener DNA. Um zu testen, ob noch DNA in der Probe ist, wurde eine PCR mit Primern für das *GAPDH*-Gen durchgeführt. Glyceral-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) ist ein Enzym der Glykolyse und wird daher von jeder Zelle exprimiert. Ist die Probe noch durch DNA verunreinigt, wird in der PCR ein DNA-Abschnitt des *GAPDH*-Gens amplifiziert; liegt keine DNA mehr vor, findet keine Reaktion statt. Durch eine anschließende Gelelektrophorese auf einem 1,5%-igen Agarosegel wurden gegebenenfalls entstandene DNA-Produkte aufgetrennt, die nach 20-30 min in Ethidiumbromid-Lösung unter UV-Licht sichtbar gemacht werden konnten. Liegt keine DNA-Verunreinigung vor, entstand in der PCR kein Produkt und es war später unter UV-Licht keine Bande auszumachen. Als Positivkontrolle wurde bei jeder PCR eine Probe mit genomischer DNA mitgeführt.

PCR-Ansatz (50 µl):                      5 µl 10fach Puffer (+NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>) – MgCl<sub>2</sub>) (Fermentas)  
   4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
   1 µl dNTPs (10 mM)  
   je 1 µl Primer forward und reverse *GAPDH* (10 pmol)

	1 µl Taq-Polymerase (1 U/µl)
	200-500 ng RNA
	x µl H <sub>2</sub> O
PCR-Programm	3 min 95°C
	15 s 95°C
	30 s 60°C
	2 min 72°C
	10 min 72°C
	hold 4°C

} 30 Zyklen

#### d) DNase-Verdau

Bei Nachweis von DNA nach der RNA-Isolierung wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurden 10-50 µg RNA eingesetzt. Es wurden 5 µl 10-fach Puffer, 10 units DNase I (Roche) und 50 µl H<sub>2</sub>O eingesetzt. Für 15 min konnte nun das Enzym DNase bei seinem Temperaturoptimum 37°C die verbleibende DNA in der Probe verdauen. Anschließend wurde 2 µl 0,2 M EDTA zur Inhibierung der DNase zur Probe dazupipettiert. Für 10 min wurden die Proben bei 75°C inkubiert.

Um den Erfolg des DNase-Verdau zu überprüfen wurde noch einmal eine PCR mit GAPDH-Primern durchgeführt. Dabei wurde im PCR-Ansatz doppelt so viel MgCl<sub>2</sub> (bei einem PCR-Ansatz von 50 µl also 8 µl MgCl<sub>2</sub>) eingesetzt, da das EDTA aus dem vorangegangenen DNase-Verdau Mg<sup>2+</sup>-Ionen bindet. Durch die doppelte Menge an MgCl<sub>2</sub> konnte trotzdem eine optimale Bedingung für die *Taq*Polymerase hergestellt werden.

#### 3.2.3 Transkription der mRNA in cDNA

Die DNA enthält das gesamte Genom einer Zelle. Wird ein Gen exprimiert, so wird es mit Hilfe einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase transkribiert, das heißt es wird eine einzelsträngige Kopie, die sogenannte prä-mRNA, des Gens hergestellt. Nach Modifikation, also Anhängen eines methylierten Guaninnucleotids am 5'-Ende und Generieren eines Poly-A-Schwanzes am 3'-Ende der prä-mRNA, und nach Herausschneiden der nicht-codierenden Sequenzen, dem Spleißen, ist die fertige mRNA des Gens entstanden. Diese kann durch Translation in das entsprechende Protein umgeschrieben werden. Die mRNA macht nur einen sehr kleinen Teil der Gesamt-RNA in einer Zelle aus (Löffler, 2008). Um nur die mRNA in cDNA umzuschreiben wurden oligo-dT-Primer verwendet, sie binden komplementär an den Poly-A-Schwanz der mRNA. Die Reverse Transkriptase aus Retroviren ist in der Lage mit Hilfe von dideoxy-

Nucleosid-Triphosphaten (dNTPs) die Einzelstrang-mRNA in doppelsträngige DNA umzuschreiben, die dann für eine PCR genutzt werden kann. Dazu wurden die Proben für 50 min in einen Thermocycler mit 42°C, dem Temperaturoptimum der Reversen Transkriptase (SuperScript), gestellt. Anschließend wurde die Enzymaktivität bei 70°C inaktiviert. Zur Stabilisierung des Enzyms Reverse Transkriptase in seiner funktionellen Form wurde Dithiothreitol (DTT) zum Transkriptionsansatz dazugegeben.

Ansatz für Transkription

- 5 µg RNA
- 1 µl oligo-dT (0,5 µg/µl)
- 1 µl 10 mM dNTPs
- add to 12 µl Aqua dest.
- 4 µl 5-fach Puffer (Invitrogen)
- 2 µl DTT
- 1 µl Super Script (Invitrogen)

### 3.2.4 Quantitative Real-time PCR

Um die Expression eines Gens zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit das Vorhandensein der spezifischen messenger-RNAs der Gene nachgewiesen. Dabei wird angenommen, dass je mehr ein Gen in einer Zelle exprimiert wird, desto mehr Kopien der entsprechenden mRNA liegen in den Zellen vor. Die Konzentration von spezifischen mRNAs in jeder Zelle ist einzeln nicht messbar. In einer quantitativen Real-time PCR (qRT-PCR) kann auf die Ausgangsmenge an DNA im PCR-Ansatz zurückgeschlossen werden. Über das 1:1 Umschreiben der mRNA der Zellen in cDNA (siehe 3.2.3) gelingt eine Quantifizierung der Ausgangsmenge an mRNA in den lysierten Zellen. Es kann nicht angenommen werden, dass die Anzahl der Zellen in jedem Experiment genau gleich ist, zudem ist die Gesamtaktivität der Zellen unterschiedlich. Daher soll nicht der Absolutwert der spezifischen mRNAs verglichen werden, sondern die Expression der spezifischen Gene soll jeweils mit der Expression von Genen verglichen werden, die jede Zelle praktisch immer exprimiert. Solche Gene werden auch house-keeping-Gene genannt. Beispiele für solche Gene sind die Gene für Glykolyse-Enzyme oder Zytoskelettbestandteile. In dieser Arbeit wurde dazu das Gen für die Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. GAPDH ist ein Enzym in der Glykolyse.

In einer herkömmlichen PCR ist es nicht möglich die Ausgangskonzentration der cDNA zu quantifizieren. Im Gegensatz dazu liefert die quantitative Real-time PCR die Möglichkeit, während der Vervielfältigung die jeweils vorliegende Menge an Kopien zu detektieren. Dabei wird angenommen, dass die Ausgangskonzentration an cDNA proportional zu der Konzentration an entstandenen Kopien nach jedem Zyklus ist.

Zur Detektion der Menge der entstandenen Kopien werden der Probe an Doppelstrang-DNA-bindende fluoreszierende Moleküle zugegeben. Auch ungebundene Moleküle werden in freier Lösung geringfügig zum Fluoreszieren angeregt, eine gewisse Hintergrundstrahlung ist also bei den Versuchen vorhanden.

Bei an DNA-gebundenen Molekülen ist die Fluoreszenz-Intensität aber um das 1000-fache erhöht. Bei der quantitativen Real-time-PCR wird in jedem Zyklus die Fluoreszenz gemessen. Stellt man die Fluoreszenz-Intensität in Abhängigkeit von der Zykluszahl dar, kann man 3 Phasen unterscheiden. Anfänglich ist die Fluoreszenzintensität auf einem sehr niedrigen Level; obwohl pro Zyklus die Anzahl der Kopien verdoppelt wird, sind die Fluoreszenzunterschiede vom Gerät noch nicht detektierbar. In der folgenden exponentiellen Phase ist der Anstieg des Fluoreszenzsignals proportional zum Anstieg der Menge der kopierten DNA. Ab einer gewissen Zykluszahl werden zunehmend aufgebrauchte Bestandteile des Ansatzes limitierend für die PCR, die Reaktion wird verlangsamt und die entstehende Kopienzahl pro Zyklus wird weniger bis die Plateauphase erreicht ist.

Der Zyklus, ab dem das Fluoreszenzsignal mit steigender Zykluszahl ebenfalls steigt, ist der so genannte threshold cycle ( $C_T$ ). Welcher Zyklus der  $C_T$  ist, ist in erster Linie abhängig von der cDNA-Anzahl zu Beginn der Real-time-PCR.

Die an Doppelstrang-DNA-bindenden „fluoreszierenden“ Moleküle binden nicht spezifisch nur an das gewünschte zu amplifizierende Produkt. Entsteht gleichzeitig noch ein unspezifisches DNA-Produkt, wird auch dieses von den fluoreszierenden Molekülen gebunden. Das Fluoreszenzsignal wäre in diesem Fall nicht spezifisch für das gewünschte Produkt.

Im Anschluss an die PCR wird daher eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, das heißt in kleinen Schritten wird die Temperatur erhöht und parallel dazu wird das Fluoreszenzsignal aufgezeichnet. Erreicht also das Gerät die Denaturierungstemperatur des amplifizierten Doppelstrang-DNA-Abschnitts, verschwindet das Fluoreszenzsignal. Haben sich ebenfalls nicht-spezifische Produkte in der PCR gebildet, wird auch hier bei Überschreiten deren Denaturierungstemperatur ein Abfall des Fluoreszenzsignals beobachtet.

Im Anschluss an die Real-time-PCR werden die Produkte außerdem auf ein Agarosegel aufgetragen und durch Gelelektrophorese aufgetrennt, nach anschließender Inkubation in Ethidiumbromidlösung können die Produkte der PCR unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Dies stellt eine weitere Möglichkeit dar sicherzugehen, dass nur das gewünschte DNA-Produkt amplifiziert wurde.

Für jede cDNA und für jedes Gen wurde der Einzelansatz in je 3 wells pipettiert, außerdem gab es für jedes Gen einen Ansatz mit Wasser ohne cDNA in ebenfalls 3 wells. Die Auswertung der Versuche und Erstellung der Diagramme erfolgte mit Microsoft Excel 2010. Der Mittelwert des

$C_T$ - Zyklus sowie die Standardabweichungen für jeden Versuch wurden aus den 3  $C_T$ - Einzelwerten berechnet. Für jedes Differenzierungsgen wurde jeweils die Differenz zwischen dem  $C_T$ - GAPDH-Wert der cDNA und dem  $C_T$ - Wert für das jeweilige Differenzierungsgen gebildet, dieser Wert verdeutlicht also um wie viele Zyklen später das Markergen im Vergleich zu dem Houskeeping-Gen GAPDH den  $C_T$ - Zyklus erreicht hat. Die gesamten Versuche wurden insgesamt ca. 2- bis 3-mal wiederholt, so dass in der Regel 2 -3 Differenzen zwischen dem  $C_T$ - Wert des jeweiligen Gen und dem  $C_T$ -Wert des dazugehörigen GAPDH gebildet werden konnten. Aus diesen 2 - 3 Werten wurde der Mittelwert berechnet. Um einen Unterschied zwischen der Differenzierung der Gene in WT- und KO-Zellen feststellen zu können, wurde nun die Differenz zwischen dem Mittelwert aus den WT-Zellen und dem Mittelwert der KO-Zellen gebildet. Potenziert man diese Differenz zur Basis 2, erhält man eine Zahl, die wiedergibt, wieviel-fach die KO-Zellen das Gen im Vergleich zu den WT-Zellen exprimieren. Ist diese Zahl kleiner als 1 wurde der Kehrwert der Zahl gebildet. Die errechneten Werte wurden nun in einem Diagramm dargestellt.

Einzelansatz RT-PCR (20  $\mu$ l):

- 5  $\mu$ l SuperMix qPCR Green Bioscience Jena
- 0,4  $\mu$ l Primer fwd 10 pmol
- 0,4  $\mu$ l Primer rev 10 pmol
- 5  $\mu$ l 1:5 Verdünnung cDNA
- 10,2  $\mu$ l Aqua dest.

PCR-Protokoll

95°C	3 min	} 40 Zyklen
10 s	95°C	
30 s	60°C	
30 s	72°C	
Fluoreszenzmessung		
60°C – 95°C je 1°C 10 s,		
dann Fluoreszenzmessung (Schmelzkurve)		
12°C hold		

### 3.3 Kulturbioologische Methoden

#### 3.3.1 Nachweis der Pluripotenz der embryonalen Stammzellen

##### a) Alkalische-Phosphatase-Assay

Es wurden circa 100 000 embryonale Stammzellen in mit 0,1 % Gelatine vorbeschichteten 24-wells in ES-Medium ausplattiert. Nach 2 Tagen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit

PBS-Puffer gewaschen und 20 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Nach 3-maligem Waschen mit Tris-Maleat-Puffer wurden die fixierten Zellen 20 min mit der Färbelösung versetzt. Unterm Mikroskop kann die Rotfärbung, die für das Expressieren der Alkalischen Phosphatase steht, beurteilt werden.

Tris-Maleat-Puffer                    3,6 g Tris-Base mit 1 M Maleinsäure auf pH 9,0 einstellen  
mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Färbelösung                            8 ml Tris-Maleat-Puffer  
64 µl 10% MgCl<sub>2</sub>-Lösung  
3,2 mg Naphtol AS-MX Phosphat (Sigma: N5000)  
8 mg Fast Red TR Salz (Sigma: F2768)

### **b) SSEA-1 Antikörperfärbung**

Es wurden circa 30 000 Zellen pro Kammer auf einem mit 0,1%-iger Gelatine beschichteten Objektträger in ES-Medium ausplattiert. Nach 2 Tagen wurde das Medium abgesaugt, die gewachsenen Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und 20 min zur Fixierung mit 4% Paraformaldehyd versetzt. Nun wurden die Zellen im Objektträger mit einem für SSEA-1 spezifischen Maus-Antikörper für 2 h auf Eis inkubiert. Mittels PBS-Puffer wurden nicht spezifisch gebundene Antikörper gewaschen. Anschließend wurde ein sekundärer Antikörper, der spezifisch an den F<sub>c</sub>-Teil von Maus-IgM-Antikörper bindet und an ein fluoreszierendes Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Molekül gekoppelt ist, dazugegeben. Daher musste der Objektträger nun lichtgeschützt für 2 h auf Eis gestellt werden. Nicht gebundene Antikörper wurden nun durch Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Nach dem Trocknen und dem Entfernen der Kammern wurde der Objektträger mit etwa 10 µl Mowiol (Calbiochem) luftblasenfrei eingedeckt.

FITC-Moleküle werden bei 488 nm angeregt und emittieren bei 530 nm Photonen, durch einen Filter konnte so unter dem Mikroskop die Expression des SSEA-1-Antigens beurteilt werden.

Mowiol                                    2,4 g Mowiol 4-88  
6 g Glycerol  
6 ml Aqua dest.  
12 ml Tris (pH 8,5)  
0,1 % DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)

### **c) Nachweis der Oct-4-Expression**

Die Expression des *Oct-4*-Gens in embryonalen Stammzellen wurde durch das Vorhandensein der entsprechenden mRNA nachgewiesen. Dazu wurde zuerst RNA aus den Zellen isoliert,

anschließend durch Einsetzen eines oligo-dT-Primers nur die mRNA in cDNA umgeschrieben. Mittels einer PCR mit spezifischen Primern konnte nun die Oct-4-DNA amplifiziert werden. Durch eine anschließende Gelelektrophorese (2%-iges Agarosegel) und Färbung der DNA-Banden in der Ethidiumbromid-Lösung konnte auf das Vorhandensein der Oct-4-mRNA und damit auf die Expression des *Oct-4*-Gens in den embryonalen Stammzellen rückgeschlossen werden.

### 3.3.2 Kultivierung von Embryonalen Stammzellen

Die murinen embryonalen Stammzellen wurden in mit 0,1%-iger Gelatine- beschichteten Zellkulturflaschen kultiviert. Alle 1-2 Tage wurden sie umgesetzt, dazu wurde das Medium in Falcons überführt und die adhären gewachsenen Zellen mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von Trypsin/EDTA konnten die Zellen vom Boden gelöst werden. EDTA fängt dabei 2-wertige Ionen ab und lockert damit den Zellverband, während Trypsin die Zellen enzymatisch ablöst. Die Reaktion wurde gestoppt indem die Zell-Trypsin-EDTA-Lösung in das vorher abgenommene Medium überführt wurde. Durch Zentrifugieren (1100 rpm, 3 min) setzen sich die Zellen als Pellet am Boden des Falcons ab. Das alte Medium wurde abgesaugt. In neuem Medium wurde das Zellpellet resuspendiert und die Zellen dann 1:5 in neue Kulturflaschen ausplattiert.

Die embryonalen Stammzellen wurden „feeder-frei“ kultiviert, um trotzdem eine Differenzierung zu verhindern wurde dem Medium Leukemia-inhibitory-factor (LIF) zugesetzt (Williams et al., 1988; Pease et al., 1990). Die Expression der Transkriptionsfaktoren, die essentiell für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz der Stammzellen sind, wie Oct-4 und Nanog, werden in Kultur durch Bestandteile des FCS und LIF reguliert. Dem Medium sind weiterhin das Antioxidanz  $\beta$ -Mercaptoethanol und die Antibiotika Penicillin, welches das Wachstum von gram-positiven Bakterien, und Streptomycin, das das Wachstum von gram-negativen Bakterien verhindert, zugegeben.

Zur Herstellung des Mediums wurden bis auf das DMEM und das FCS bzw. SR die Bestandteile des Mediums steril filtriert (Porengröße 0,2  $\mu$ m). Die Bestandteile wurden bei 37 °C gelöst und das Medium bei 4°C aufbewahrt.

Embryonale Stammzellen lassen sich sowohl in FCS-haltigem Medium als auch in Serumersatz-haltigem Medium kultivieren.

Als pH-Indikator ist dem Medium Phenolrot zugegeben.

ES-Zell-Medium (500 ml)	409 ml DMEM
	75 ml fötales Kälberserum (FCS) / Serumreplacement (SR)
	1 ml LIF (ESGRO, Leukemia Inhibitory Factor, 2000 U/ml Endkonzentration)

6 ml	Nucleoside
1 ml	$\beta$ -Mercaptoethanol (0,1 mM)
5 ml	Nicht-essentielle-Aminosäuren (NEAA) (0,2 mM)
5 ml	Glutamin (2 mM)
5 ml	Penicillin (10 000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)

Zusammensetzung der Nucleosidlösung:

80 mg	Adenosin
85 mg	Guanosin
73 mg	Uridin
73 mg	Cytidin
24 mg	Thymidin
add 100 ml H <sub>2</sub> O bidest.	

### 3.3.3 Generierung und Kultivierung von „Embryoid bodies“

Embryonale Stammzellen bilden sogenannte „Embryoid bodies“, wenn ihre Differenzierung nicht durch LIF gehemmt wird. In Embryoid bodies entstehen dabei Zellen aller 3 primären Keimblätter (Ektoderm, Endoderm, Mesoderm) (Guan et al., 1999).

Zur Generierung von Embryoid bodies wurde die Hanging-drops Methode angewendet (Kurosawa, 2007), dabei wurden jeweils 1000 Embryonale Stammzellen pro 20  $\mu$ l Tropfen eingesetzt. Ein 10 cm-Bakterienplattendeckel wurde mit circa 100 Tropfen versetzt. An Tag 3 wurden die Embryoid bodies in Suspension genommen. Jeweils an Tag 0, 3, 5 und 7 wurden die Embryoid bodies von 3 Platten gepoolt und abzentrifugiert. Aus dem Pellet wurde RNA gewonnen und davon je 5  $\mu$ g in cDNA transkribiert. Eine 1:5-Verdünnung der cDNA wurde für die quantitative Realtime-PCR eingesetzt.

Das EB-Medium wurde je nach Versuch entweder mit 20% FCS oder mit 20% SR hergestellt.

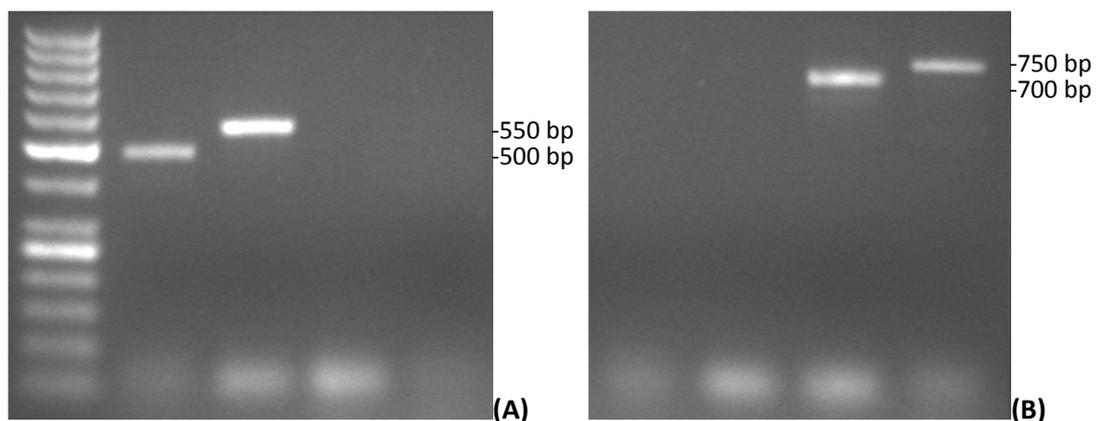
EB-Medium (500 ml)	308 ml DMEM
	100 ml fötales Kälberserum (FCS)/ Serumersatz (SR) = 20 %
	1 ml $\beta$ -Mercaptoethanol (0,1 mM)
	5 ml 0,2 mM Nicht-essentielle-Aminosäuren (NEAA)
	5 ml Glutamin (2 mM)
	5 ml Penicillin (10 000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Genotypisierung der Embryonalen Stammzellen

Um ES-WT- und ES-KO-Zellen in der Expression zu vergleichen, müssen beide Zelllinien aus einer Maus isoliert werden, das heißt es müssen Schwesterzelllinien vorliegen. Alle kultivierten Zellen wurden daher genotypisiert. Bei den KO-Zellen ist das Gen für die GNE durch ein Neomycinresistenzgen unterbrochen. Dadurch ist es möglich, mittels spezifischer Primer die WT- und KO-Zellen durch eine PCR zu unterscheiden. Die Wildtypspezifischen Primer amplifizieren Fragmente der Größe 500 bp und 550 bp. Die Knockoutfragmente sind 700 und 750 bp groß (siehe Abb. 3).



**Abbildung 3: Genotypisierung der embryonalen Stammzellen**

Es wurde für jede DNA eine PCR mit allen 4 Primerkonstellationen (DNA mit WT-spezifischen Primern jeweils in den beiden linken Taschen, DNA mit KO-spezifischen Primern jeweils in beiden rechten Taschen) durchgeführt. Die WT-spezifischen Fragmente konnten nur mit der DNA der ES-WT-Zellen (A), die KO-spezifischen Fragmenten nur mit der DNA der ES-KO-Zellen (B) amplifiziert werden. Gezeigt sind Bilder des DNA-Gels unter UV-Licht.

### 4.2 Nachweis der Stammzellmarker

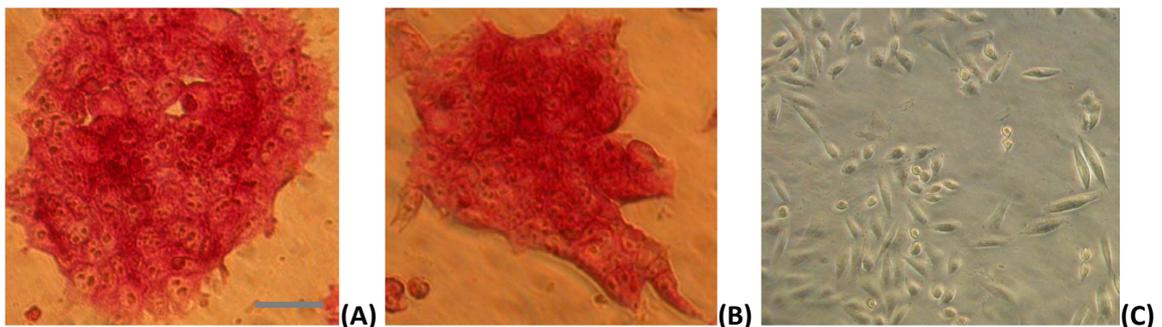
Embryonale Stammzellen sind pluripotent, das heißt sie sind fähig in die unterschiedlichen Zellen der 3 primären Keimblätter differenzieren. Sie bleiben theoretisch lebenslang teilungsfähig, was aber praktisch von den Kultivierungsbedingungen abhängig ist (Amit et al., 2000). Zum Nachweis des Vorliegens des undifferenzierten Zustandes der Stammzellen wurden 3 spezifische Eigenschaften überprüft: die hohe Expression der Alkalischen

Phosphatase, das Vorhandensein des Stage-spezifischen Antigen 1 (SSEA-1) und die Expression des Octamer-binding transcription factor 3/4 (Oct-4) (Guan et al., 1999; Saito et al., 2004).

#### **Alkalische-Phosphatase-Assay**

Die Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das charakteristischerweise sehr aktiv in embryonalen Stammzellen ist. Allerdings exprimieren auch viele andere Zellen Alkalische Phosphatase (Hahnel et al., 1990). Dieser Nachweis ist also ein Ausschlusskriterium; lässt sich keine Alkalische Phosphatase-Aktivität nachweisen, liegen keine embryonalen Stammzellen (mehr) vor.

Die Alkalische Phosphatase ist in der Lage verschiedenste Moleküle zu dephosphorylieren. Um die Aktivität nachzuweisen werden die Zellen mit Naphthol-AS-MX-Phosphat versetzt. Bei Vorhandensein der Alkalischen Phosphatase spaltet diese den Phosphatrest ab, es entsteht Naphthol, welches mit Fast Red TR Salz zu einem roten Produkt umgesetzt wird. In den verwendeten ES-WT- und ES-KO-Zellen ist die Alkalische Phosphatase aktiv (siehe Abb. 4).

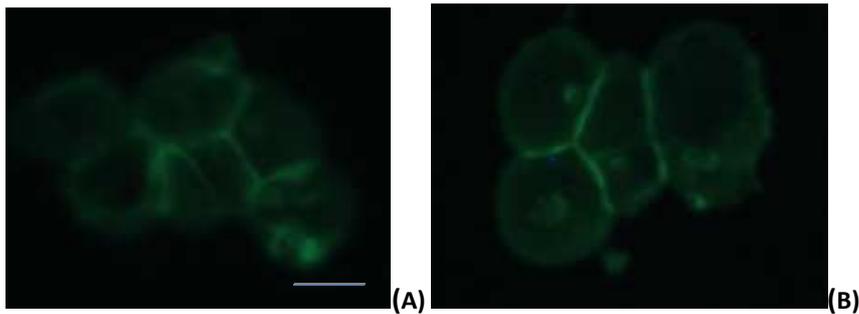


**Abbildung 4: Alkalische-Phosphatase-Assay**

Den embryonalen Stammzellen sowie den CHO-Zellen (Kontrolle) wurde Naphthol-AS-MX-Phosphat mit Fast Red TR Salz zugestetzt. Die ES-WT- (A) und ES-KO-Zellen (B) färbten sich rot, was die Aktivität der Alkalischen Phosphatase nachweist. Die CHO-Zellen als Negativ-Kontrolle (C) zeigten keine Farbreaktion, die Alkalische Phosphatase ist nicht aktiv in den CHO-Zellen. Die eingekreiste Längeneinheit entspricht 75 µm.

#### **Nachweis der Expression von SSEA-1**

Das Stage-Specific Embryonic Antigen-1 (SSEA-1) ist ein Oberflächenantigen, welches pluripotente murine embryonale Stammzellen exprimieren, nicht aber differenzierte Zellen (Solter und Knowles, 1978). Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte die SSEA-1-Expression sowohl auf ES-WT- als auch auf ES-KO-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 5).

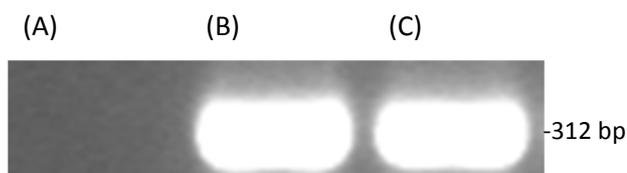


**Abbildung 5: SSEA-1-Nachweis**

Embryonale Stammzellen und CHO-Zellen (Kontrolle, kein Foto abgebildet) wurden mit SSEA-1-spezifischem Maus-Antikörper inkubiert. Weiterhin wurden sekundäre Maus-IgM-Ak, die mit einem FITC-Molekül gekoppelt ist, zugegeben. Unter dem Mikroskop kann man das Fluoreszieren der Zell-Zell-Kontakte, wo SSEA-1 exprimiert ist, sehen. Sowohl ES-WT- (A) als auch ES-KO-Zellen (B) exprimieren SSEA-1 an ihren Zelloberflächen. Die eingezeichnete Längeneinheit entspricht 25  $\mu\text{m}$ .

#### **Nachweis der Oct-4-Expression**

Oct-4 ist ein Transkriptionsfaktor, der essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Pluripotenz in der Inneren Zellmasse der Blastozyste ist. In Mausembryonen wird er vom 4- bis 8-Zellstadium bis zum Differenzierungsbeginn des Epiblasts exprimiert (Schöler et al., 1990; Yamanaka et al., 2008). Zum Nachweis wurde isolierte RNA in cDNA umgeschrieben, mittels spezifischer Primer für das *Oct-4*-Gen wurde in einer PCR die Expression dieses Stammzellmarkers nachgewiesen. Auch hier konnte in beiden Zelllinien die Oct-4-Expression nachgewiesen werden (siehe Abb. 6).



**Abbildung 6: Nachweis der Oct-4-Expression**

Es wurde mRNA der embryonalen Stammzellen in cDNA umgeschrieben. Eine PCR der cDNA mit spezifischen Primern beweist die Expression von Oct-4 (312 bp) bei ES-WT- (B) und ES-KO-Zellen (C). Als Negativ-Kontrolle wurde eine Probe mit H<sub>2</sub>O (A) mitgeführt. Dargestellt ist ein Ausschnitt des cDNA-Gels unter UV-Licht.

### **4.3 Vergleich der Differenzierung der ES-KO- und ES-WT-Zellen in FCS-haltigem Medium**

Bisher gelang es nicht eine lebensfähige GNE-KO-Maus zu generieren. Das lässt den Schluss zu, dass entweder das Fehlen der GNE als Enzym an sich das frühe Absterben in der Embryonalphase bedingt oder dass für die Embryogenese essentielle Sialinsäuren den KO-Embryonen für die weitere Entwicklung fehlen. Ab Tag 8,5 müssen die Embryonen selber mRNA vom eigenen Genom ablesen, da die maternalen mRNAs aus der Eizelle zunehmend abgebaut wurden. Theoretisch können Embryonen Sialinsäuren oder ManNAc als Vorstufe von Sialinsäuren aus dem Blut der Mutter über die Plazenta aufnehmen. Gezeigt werden konnte dies an einem HIBM-Mausmodell mit einer M712T-Mutation im GNE-Gen. Durch Zugabe von ManNAc zu dem Trinkwasser während der Paarung zweier heterozygoter Tiere und in der Schwangerschaft und Stillzeit überlebten signifikant mehr homozygot defiziente Embryonen als ohne ManNAc-Fütterung (ein M712T-homozygoter Embryo von 101 ohne ManNAc-Fütterung verglichen mit 12 homozygoten von 102 Gesamtneugeborenen bei ManNAc-Fütterung der Mutter mit 5 mg/ml ManNAc) (Galeano et al., 2007).

Nicht geklärt ist, ob die GNE in der Entwicklung noch weitere nicht bekannte Funktionen, neben der des Schlüsselenzyms in der Sialinsäurebiosynthese, hat. Weidemann et al. (2006) konnten Interaktionspartner der GNE identifizieren.

Anhand von Untersuchungen der Differenzierung von ES-Zellen in FCS-Medium soll geprüft werden, ob bei genügend Sialinsäuren im Medium die Differenzierung von ES-KO- und ES-WT-Zellen in Embryoid bodies gleich gut gelingt.

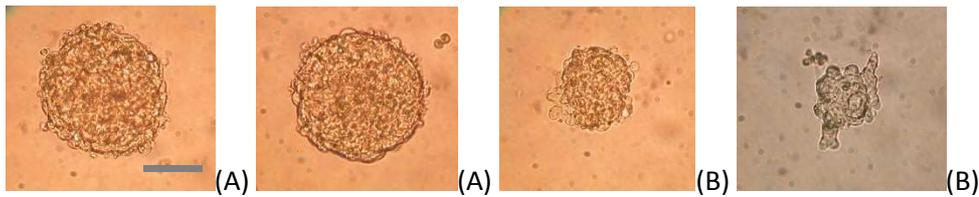
In FCS-Medium sind Sialinsäuren vorhanden, die die Zellen aufnehmen können. Außerdem sind im fötalen Kälberserum viele Wachstumsfaktoren.

Murine ES-Zellen sind in der Lage sich spontan zu vermehren und sich in verschiedene Gewebe zu differenzieren (Wobus et al., 2002).

#### **4.3.1 Morphologische Unterschiede zwischen EB-KO und EB-WT**

Sowohl ES-WT- als auch ES-KO-Zellen bilden in der „hanging drop“-Methode Embryoid bodies. Morphologische Unterschiede fallen vor allem an Tag 1 auf.

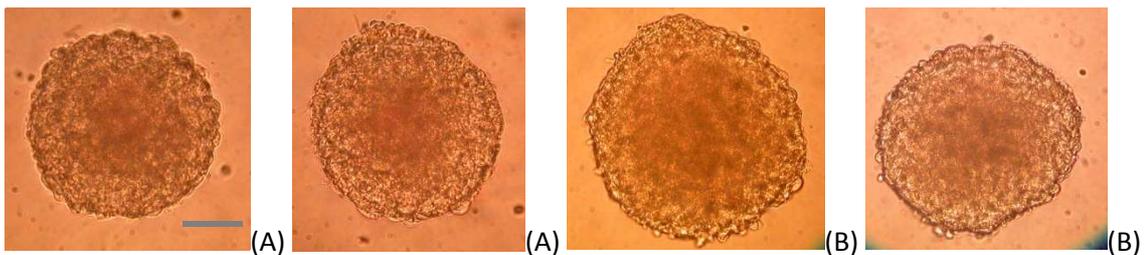
Während ES-WT-Zellen am ersten Tag nahezu alle eine kuglige Formation gebildet haben, bilden ES-KO-Zellen nur Zellhaufenäquivalente, die zum größten Teil kleiner sind als die WT-Embryoid bodies (siehe Abb. 7).



**Abbildung 7: Embryoid bodies an Tag 1 in FCS-haltigem Medium**

Dargestellt sind Fotos der Mikroskopie von Embryoid bodies EB-WT (A) und EB-KO (B) an Tag 1. Die Embryoid bodies wurden aus je 1000 ES-WT bzw. ES-KO-Zellen mittels „hanging drops“ in FCS-haltigem Medium generiert. Die eingezeichnete Längeneinheit entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Am Tag 2 und auch an den darauf folgenden Tagen kann im Wesentlichen kein morphologischer Unterschied mehr zwischen WT- und KO-Embryoid bodies (EBs) festgestellt werden. Außerdem haben die KO-EBs in der Größe aufgeholt und sind nun ungefähr genauso groß wie die entsprechenden WT-EBs. Exemplarisch sind hier Bilder von Tag 2 gezeigt (siehe Abb. 8).



**Abbildung 8: Embryoid bodies an Tag 2 in FCS-haltigem Medium**

Dargestellt sind Fotos der Mikroskopie von Embryoid bodies EB-WT (A) und EB-KO (B) an Tag 2. Die Embryoid bodies wurden aus je 1000 ES-WT bzw. ES-KO-Zellen mittels „hanging drops“ in FCS-haltigem Medium generiert. Die eingezeichnete Längeneinheit entspricht 100  $\mu\text{m}$

#### **4.3.2 Nachweis der Expression der Markergene für die primären Keimblätter in den Embryoid bodies mittels qRT-PCR**

An Tag 4-5 der Differenzierung von Embryonalen Stammzellen in Embryoid bodies entsteht der innerer Epiblast und eine äußere Endoderm-ähnliche Struktur, zwischen beiden Schichten bildet sich Mesodermgewebe. Der *in-vitro*-Differenzierungsprozess verläuft somit ähnlich zu der *in-vivo*-Gastrulation der Mausembryonalentwicklung. Mit Hilfe spezifischer Markergene für die verschiedenen Gewebe der Keimblätter wurde die Fähigkeit der ES-Zellen zu differenzieren untersucht (Yamanaka et al., 2007).

Untersucht wurden die Pluripotenzgene SRY-related HMG-box 2 (Sox-2) und Oct-4 und die Differenzierungsgene Nestin, Nodal, NK2 homeobox 5 (Nkx-2,5) und Caudal type homeobox 2 (Cdx-2). Oct-4 ist ein Kernprotein und besitzt als Transkriptionsfaktor eine POU-DNA-Bindungsdomäne. Normalerweise wird es in den pluripotenten Stammzellen der Embryonen vor der Gastrulation exprimiert. Oct-4 reduziert die Aktivität des p21-Promotors. Das Herunterregulieren der Oct-4-Expression bei der Differenzierung der Stammzellen geht einher mit der Inhibierung des Zellzykluses in der G0/G1-Phase. Oct-4 ist somit maßgeblich an der Erhaltung des undifferenzierten Zustandes von Stammzellen und an der Regulation des Zellzyklus in embryonalen Stammzellen beteiligt. Mit zunehmender Differenzierung wird Oct-4 langsam herunterreguliert und damit gleichzeitig die Bildung von Trophektodermzellen induziert (Lee et al., 2010). Darüber hinaus reguliert Oct-4 weitere Faktoren der frühen Entwicklung in Oozyten (siehe Zuccotti et al., 2009). Sox-2 ist ein Gen, dessen mRNA ebenfalls in der Inneren Zellmasse, im Epiblast und in den Keimblättern des frühen Embryos detektiert werden kann, außerdem wird es in Trophoblast-Stammzellen und im sich entwickelnden Zentralnervensystem exprimiert, unter anderem auch in neuronalen Stammzellen (Miyagi et al., 2004). Die Expression von Sox-2 wird von 2 regulatorischen Einheiten (SRR1 und SRR2) kontrolliert. Die Transkriptionsaktivität von SRR2 wird beispielsweise von dem Octamer-Komplex Oct-4-Sox-2 beeinflusst (Tomioka, 2002). Die Transkriptionsfaktoren Oct-4, Sox-2 und Nanog interagieren und regulieren sich untereinander (Masui et al., 2007), darüber hinaus assoziiert Sox-2 noch mit ca. 70 anderen Proteinen (Gao et al., 2012).

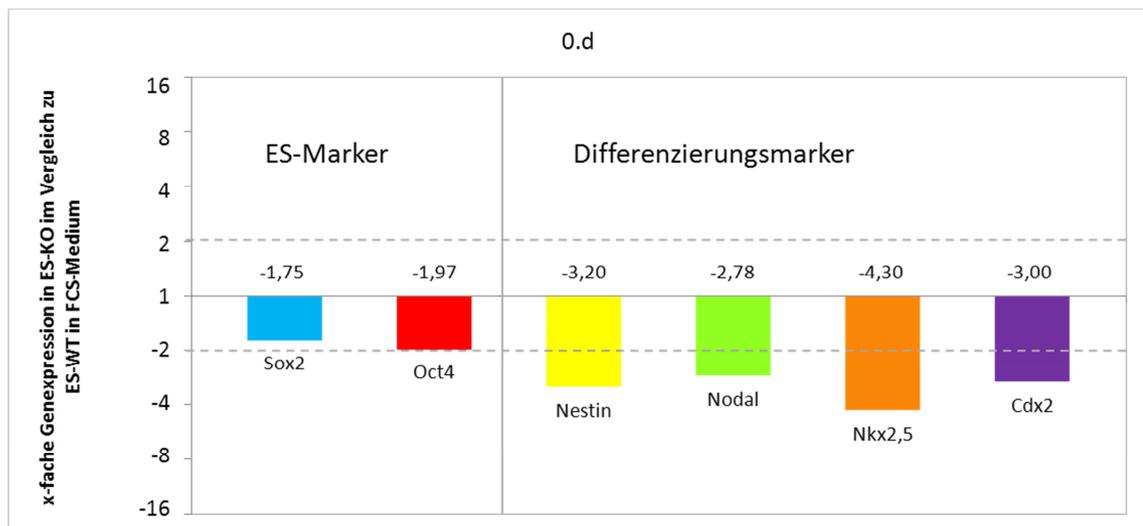
*Nestin* ist ein Markergen für Ektodermgewebe und wird in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert (Li et al., 2009), dabei ist es in den multipotenten neuronalen Stammzellen mit verantwortlich für die Fähigkeit des Überlebens und der Selbsterneuerung (Park et al., 2010). Nodal gehört zur Gruppe der TGF- $\beta$ -Superfamilie und spielt eine Rolle bei der Differenzierung des Primitivstreifen und der Entwicklung von mesendodermalem Gewebe. Aktivierung des Nodal-Signalwegs unterdrückt bei murinen ES-Zellen die neuronale Differenzierung (Watabe et al., 2009). Nkx-2,5 ist ein aktivierender Transkriptionsfaktor. Die Expression von Nkx-2,5 spricht für das Vorhandensein von Vorstufen der kardialen Differenzierung, in der Embryonalentwicklung ist es wichtig für die Differenzierung und Reifung von kardialen Zellen zu ventrikulären Kardiomyozyten und die korrekte Ausbildung der Herzkammern (Lyons et al., 1995; David et al., 2009). Extraembryonales Gewebe kann mittels Cdx-2 detektiert werden, durch Down-regulierung von Oct-3/4 und Hochregulierung von Cdx-2 entsteht Trophektoderm (Niwa et al., 2005), welches zum ersten Mal an Tag 3,5 der Embryonalentwicklung in der Blastozyste nachgewiesen werden kann. Ab Embryonaltag 8,5 lässt sich Cdx-2 ebenfalls in

embryonalem Gewebe wie dem Epithel des unteren Darmabschnitts und dem kaudalen Teil des Neuralrohrs nachweisen (Beck et al., 1995).

Für jedes Gen wurden jeweils 2-3 Proben ausgemessen und  $C_T$ -Werte bestimmt, daraus wurde ein Mittelwert gebildet, mit dem weitergerechnet wurde. Das Maximum der Standardabweichung der  $C_T$ -Werte vom Mittelwert war 0,82, das Minimum 0 (Durchschnittsstandardabweichung 0,183) bei einem maximalen  $C_T$ -Wert von 39,32 und einem minimalen  $C_T$ -Wert von 12,6.

Die Abbildungen zeigen jeweils, wieviel -fach die KO-Zellen das Gen im Vergleich zu den WT-Zellen exprimieren. Ist der Wert kleiner als -1, bedeutet dies, dass die Expression des Gens in den KO-Zellen herunterreguliert ist, ist der Wert größer als 1, exprimieren die KO-Zellen das Gen stärker. Bei dem Wert 1 besteht kein Unterschied in der Expression.

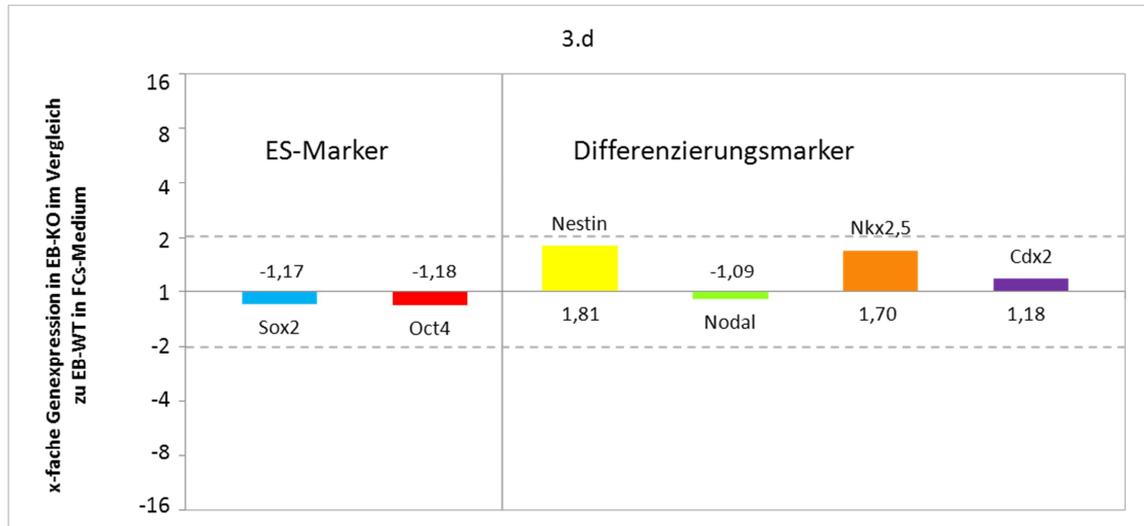
In GNE-defizienten embryonalen Stammzellen werden im Vergleich zu den ES-WT-Zellen alle untersuchten Gene deutlich weniger exprimiert, dabei sind die Stammzellmarker Sox-2 und Oct-4 nicht so stark herunterreguliert wie die Expression der Markergene für die Keimblattdifferenzierung. Insgesamt sind die ES-KO-Zellen also in einem geringeren Differenzierungszustand als die WT-Zellen (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Expression der Markergene an Tag 0 im FCS-Medium**

Dargestellt ist die Genexpression von undifferenzierten (Tag 0) GNE-defizienten (KO)-Stammzellen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Stammzellen, welche in sialinsäurehaltigem FCS-Medium kultiviert wurden. Die Werte sind aus Mittelwerten von 2 Einzelmessungen berechnet. Links sind die Marker der embryonalen Stamm-(ES)-Zellen dargestellt (Oct4 und Sox2) und rechts die Differenzierungsmarker (Nestin, Nodal, Nkx2,5 und Cdx2). Die Zahlen über den Balken entsprechen den dargestellten Werten. Die gestrichelten Linien geben jeweils eine 2-fache Hoch- oder Herunterregulation an.

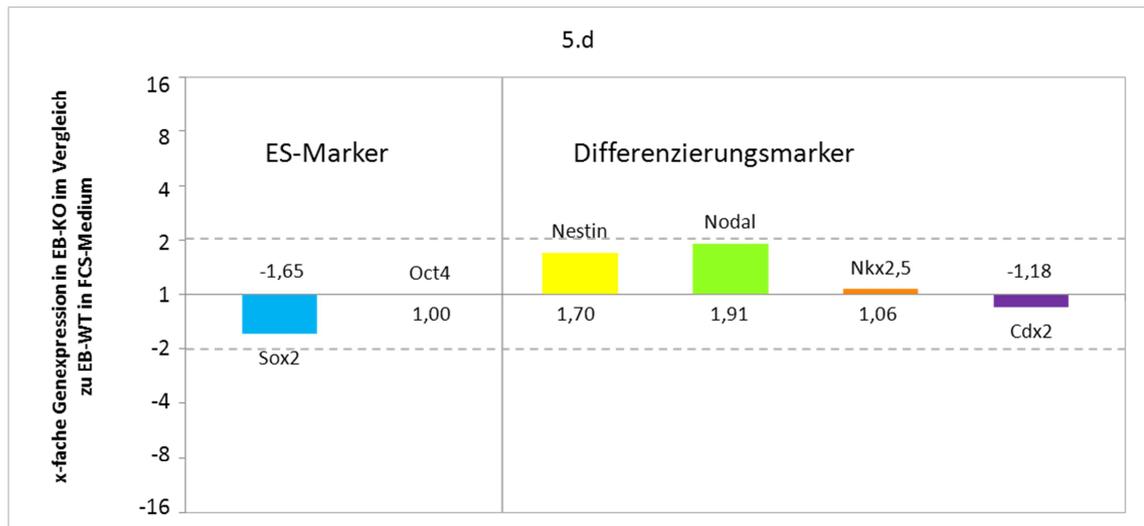
An Tag 3 sind annähernd gleichviel mRNAs für die Stammzellmarkergene *Sox-2*, *Oct-4*, das Mesendodermmarker *Nodal* und *Cdx-2*, ein Trophektodermmarker, in WT- und KO-Zellen vorhanden. Die Gene *Nestin* und *Nkx-2,5* sind in den KO-Embryoid bodies etwas stärker exprimiert als in den WT-Embryoid bodies, allerdings beträgt der Unterschied weniger als das 2-fache (siehe Abb. 10).



**Abbildung 10: Expression der Markergene an Tag 3 im FCS-Medium**

Dargestellt ist die Genexpression von differenzierten (Tag 3) GNE-defizienten (KO)-Stammzellen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Stammzellen, welche in sialinsäurehaltigem FCS-Medium kultiviert wurden. Die Werte sind aus Mittelwerten von 3 Einzelmessungen berechnet. Links sind die Marker der embryonalen Stamm-(ES)-Zellen dargestellt (Oct4 und Sox2) und rechts die Differenzierungsmarker (Nestin, Nodal, Nkx2,5 und Cdx2). Die Zahlen über den Balken entsprechen den dargestellten Werten. Die gestrichelten Linien geben jeweils eine 2-fache Hoch- oder Herunterregulation an.

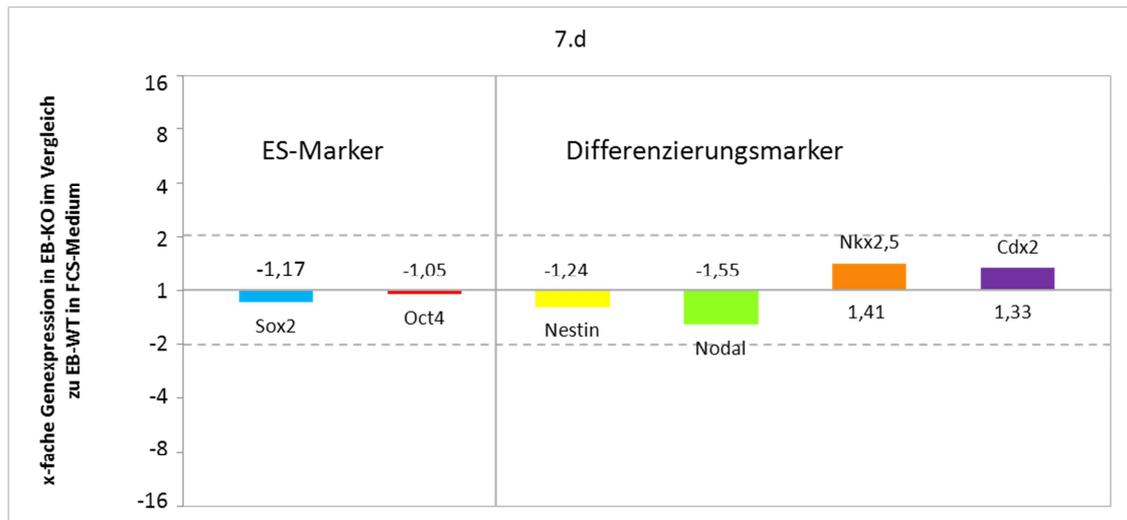
An Tag 5 konnte keine Hoch- oder Herunterregulation um mehr als das 2-fache festgestellt werden (siehe Abb. 11).



**Abbildung 11: Expression der Markergene an Tag 5 im FCS-Medium**

Dargestellt ist die Genexpression von differenzierten (Tag 5) GNE-defizienten (KO)-Stammzellen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Stammzellen, welche in sialinsäurehaltigem FCS-Medium kultiviert wurden. Die Werte sind aus Mittelwerten von 2 Einzelmessungen berechnet. Links sind die Marker der embryonalen Stamm-(ES)-Zellen dargestellt (Oct4 und Sox2) und rechts die Differenzierungsmarker (Nestin, Nodal, Nkx2,5 und Cdx2). Die Zahlen über den Balken entsprechen den dargestellten Werten. Die gestrichelten Linien geben jeweils eine 2-fache Hoch- oder Herunterregulation an.

Auch an Tag 7 wurden die Unterschiede in der Expression der oben gezeigten Gene zwischen EB-WT und EB-KO verglichen. Im Vergleich zwischen WT und KO konnte aber kein Unterschied größer 2 oder kleiner -2 ausgemacht werden (siehe Abb. 12).



**Abbildung 12: Expression der Markergene an Tag 7 im FCS-Medium**

Dargestellt ist die Genexpression von differenzierten (Tag 7) GNE-defizienten (KO)-Stammzellen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Stammzellen, welche in sialinsäurehaltigem FCS-Medium kultiviert wurden. Die Werte sind aus den Mittelwerten von 1 Einzelmessung berechnet. Links sind die Marker der embryonalen Stamm-(ES)-Zellen dargestellt (Oct4 und Sox2) und rechts die Differenzierungsmarker (Nestin, Nodal, Nkx2,5 und Cdx2). Die Zahlen über den Balken entsprechen den dargestellten Werten. Die gestrichelten Linien geben jeweils eine 2-fache Hoch- oder Herunterregulation an.

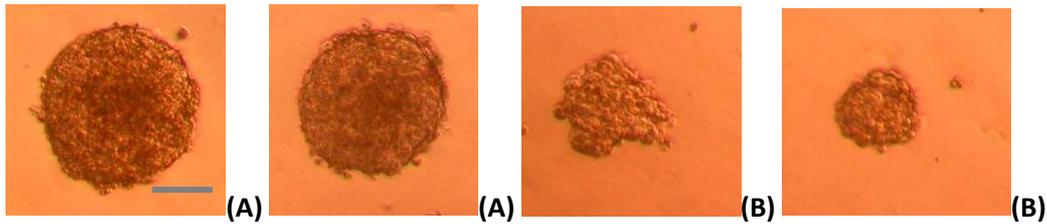
#### 4.4 Vergleich der Differenzierung der ES-KO und ES-WT-Zellen in SR-haltigem Medium

Der Hersteller des Serumersatzmediums veröffentlicht leider nicht die genaue Zusammensetzung des Serumreplacements. Über ein Sialinsäureassay konnte aber nachgewiesen werden, dass in SR-Medium deutlich weniger Sialinsäuren vorhanden sind als in FCS-Medium (Weidemann et al., 2010). Fehlende Sialinsäuren könnten ein Grund für das Absterben der Embryonen an Tag 8,5 in der Embryonalentwicklung sein. Zwar können Sialinsäuren aus dem Blut der Mutter durch den Embryo aufgenommen werden, ob der spezifische Bedarf der embryonalen Zellen an Sialinsäuren dadurch gedeckt wird, ist aber nicht bekannt.

##### 4.4.1 Morphologische Unterschiede zwischen EB-KO und EB-WT bei der Differenzierung aus ES-Zellen, die in SR-Medium kultiviert wurden

Die Bildung von Embryoid bodies gelingt ES-KO-Zellen, die zuvor in Serumersatzhaltigem ES-Zellmedium kultiviert wurden, sehr viel schlechter im Vergleich zu ES-WT-Zellen. Embryoid

bodies bilden sich nur vereinzelt aus den ES-KO-Zellen in den Hanging drops. Die wenigen entstandenen EBs sind deutlich kleiner (siehe Abb. 13).

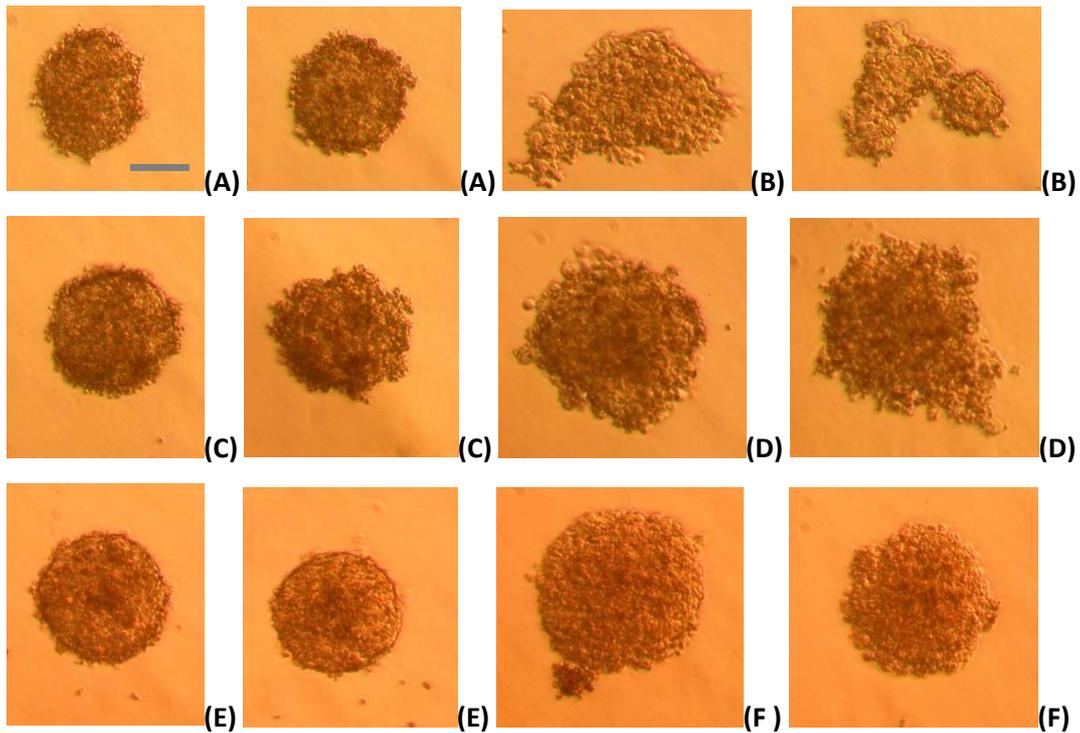


**Abbildung 13: Embryoid bodies an Tag 3 in SR-haltigem Medium**

Dargestellt sind Fotos der Mikroskopie von Embryoid bodies EB-WT (A) und EB-KO (B) an Tag 3. Die Embryoid bodies wurden aus je 1000 ES-WT bzw. ES-KO-Zellen mittels „hanging drops“ in SR-Medium generiert. Bereits die embryonalen Stammzellen wurden in SR-Medium kultiviert, bevor aus ihnen EBs generiert wurden. Die eingezeichnete Längeneinheit entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

#### **4.4.2 Morphologische Unterschiede zwischen EB-KO und EB-WT bei der Differenzierung aus ES-Zellen, die in FCS-Medium kultiviert wurden**

Werden die ES-Zellen zuvor in FCS-haltigem Medium kultiviert, gelingt beiden Genotypen eine morphologisch ähnlich gute Differenzierung in Embryoid bodies. Es ist aber festzustellen, dass vergleichbar mit der Differenzierung der ES-Zellen in FCS-haltigem-EB-Medium auch in SR-EB-Medium die KO-EBs in den ersten 2 Tagen morphologisch im Gegensatz zu den WT-EBs eher einem Zellhaufen ähneln als kugligen Gebilden. Allerdings bilden auch die ES-WT-Zellen in den ersten beiden Tagen in SR-haltigem Medium nicht so schöne Embryoid bodies wie im FCS-Medium. Außerdem sind die KO-EBs im Verhältnis zu den WT-EBs im Durchschnitt in den ersten 2 Tagen größer (siehe Abb. 14).



**Abbildung 14: Embryoid bodies an Tag 1, 2 und 3 in SR-haltigem Medium**

Dargestellt sind Fotos der Mikroskopie von Embryoid bodies an Tag 1 EB-WT (A) und EB-KO (B), an Tag 2 EB-WT (C) und EB-KO (D) und an Tag 3 EB-WT (E) und EB-KO (F). Die Embryoid bodies wurden aus jeweils 1000 ES-WT bzw. ES-KO-Zellen mittels „hanging drops“ in SR-Medium generiert. Die embryonalen Stammzellen wurden zuvor in FCS-Medium kultiviert. Die eingezeichnete Längeneinheit entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.3 Nachweis der Expression der Markergene für die primären Keimblätter in den Embryoid bodies mittels qRT-PCR

Die Expression der Gene *Sox-2* und *Oct-4* ist in den undifferenzierten ES-KO-Zellen, die in SR-haltigem Medium kultiviert wurden, leicht erhöht im Vergleich zu den ES-WT-Zellen, während Nestin und Nodal leicht herunterreguliert sind (jeweils weniger als 2-fach). *Nkx-2,5* ist in den KO-Zellen mehr als das 2-fache herunterreguliert (siehe Abb. 15).

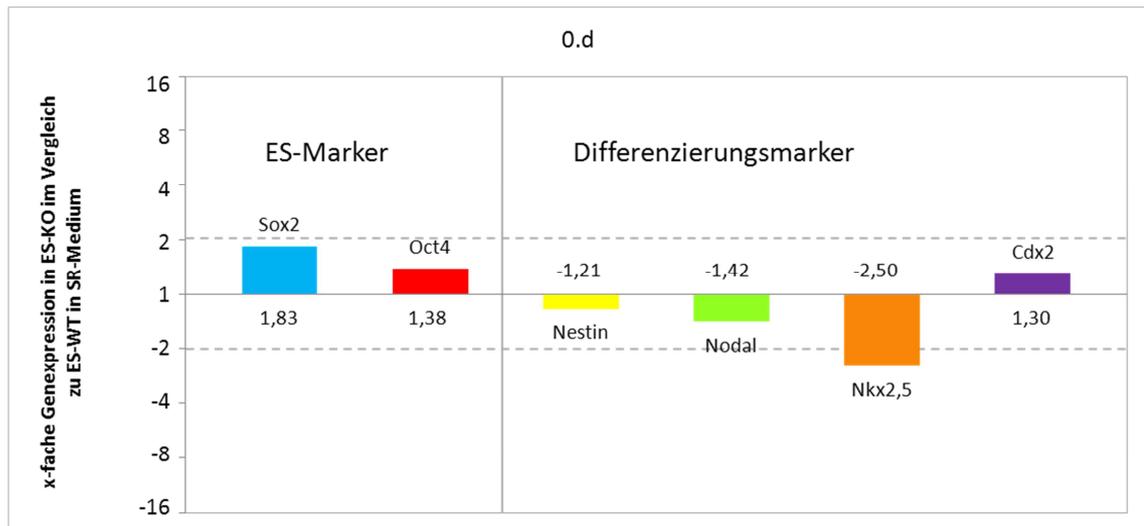
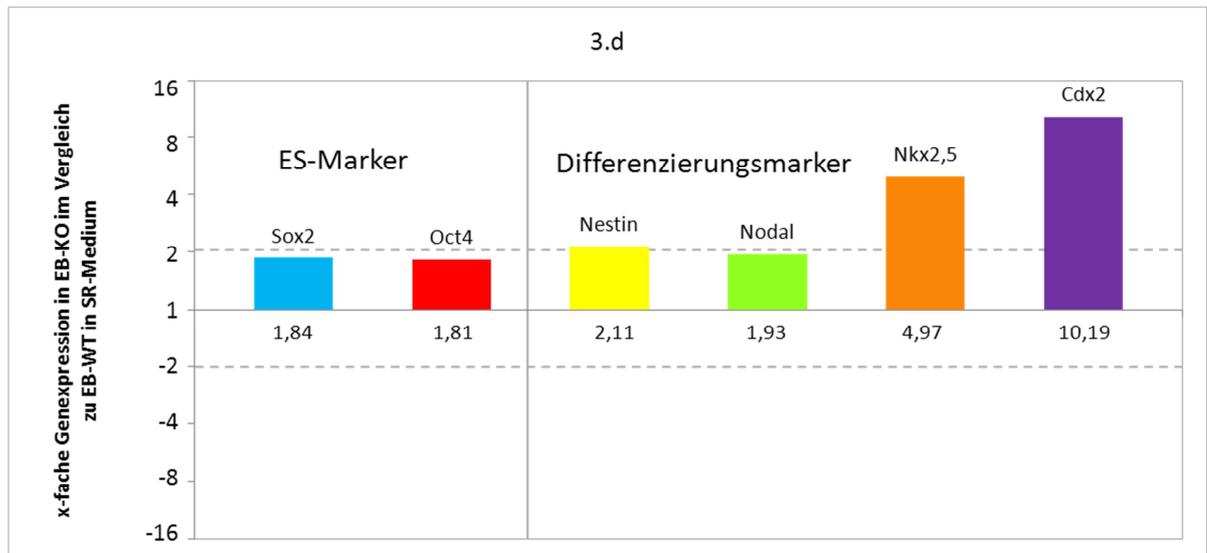


Abbildung 15: Expression der Markergene an Tag 0 im SR-Medium

Dargestellt ist die Genexpression von undifferenzierten (Tag 0) GNE-defizienten (KO)-Stammzellen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Stammzellen, welche in sialinsäurefreiem SR-Medium kultiviert wurden. Die Werte sind aus Mittelwerten von 3 Einzelmessungen berechnet. Links sind die Marker der embryonalen Stamm-(ES)-Zellen dargestellt (Oct4 und Sox2) und rechts die Differenzierungsmarker (Nestin, Nodal, Nkx2,5 und Cdx2). Die Zahlen über den Balken entsprechen den dargestellten Werten. Die gestrichelten Linien geben jeweils eine 2-fache Hoch- oder Herunterregulation an.

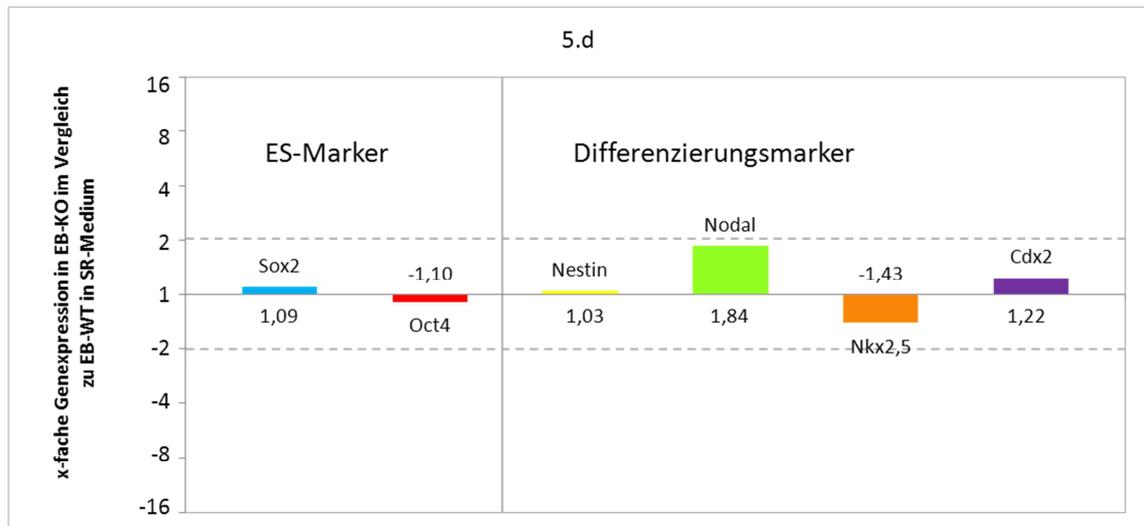
An Tag 3 lesen die KO-EB-Zellen alle untersuchten Gene im Vergleich zu den EB-WT vermehrt ab. Besonders *Cdx-2*, ein Markergen für Trophektoderm, ist mehr als das 10-fache hochreguliert in EB-KOs. *Nkx-2,5* wird ebenfalls in den KO-EBs etwa 5-fach mehr als in WT-EBs exprimiert. *Nestin* ist um etwa das 2-fache in KO-EB-Zellen hochreguliert (siehe Abb. 16).



**Abbildung 16: Expression der Markergene an Tag 3 im SR-Medium**

Dargestellt ist die Genexpression von differenzierten (Tag 3) GNE-defizienten (KO)-Stammzellen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Stammzellen, welche in sialinsäurefreiem SR-Medium kultiviert wurden. Die Werte sind aus Mittelwerten von 3 Einzelmessungen berechnet. Links sind die Marker der embryonalen Stamm-(ES)-Zellen dargestellt (Oct4 und Sox2) und rechts die Differenzierungsmarker (Nestin, Nodal, Nkx2,5 und Cdx2). Die Zahlen über den Balken entsprechen den dargestellten Werten. Die gestrichelten Linien geben jeweils eine 2-fache Hoch- oder Herunterregulation an.

An Tag 5 ist die Expression von Cdx-2 von den KO-EBs wieder auf einem ähnlichen Level wie bei den WT-EBs. Die anderen Differenzierungsmarkergene sowie die Markergene für embryonale Stammzellen sind jeweils weniger als 2-fach Hoch- oder Herunterreguliert (siehe Abb. 17).



**Abbildung 17: Expression der Markergene an Tag 5 im SR-Medium**

Dargestellt ist die Genexpression von differenzierten (Tag 5) GNE-defizienten (KO)-Stammzellen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Stammzellen, welche in sialinsäurefreiem SR-Medium kultiviert wurden. Die Werte sind aus Mittelwerten von 2 Einzelmessungen berechnet. Links sind die Marker der embryonalen Stamm-(ES)-Zellen dargestellt (Oct4 und Sox2) und rechts die Differenzierungsmarker (Nestin, Nodal, Nkx2,5 und Cdx2). Die Zahlen über den Balken entsprechen den dargestellten Werten. Die gestrichelten Linien geben jeweils eine 2-fache Hoch- oder Herunterregulation an.

An Tag 7 regulieren die Zellen der KO-Embryoid bodies *Nestin*, ein Markergen für die ektodermale Differenzierung, und *Nkx-2,5*, ein Markergen für Vorläufergewebe für kardiale Differenzierung, hoch, während die anderen Gene sich in der Expression um weniger als das 2-fach zwischen EB-WT und EB-KO unterscheiden (siehe Abb. 18).

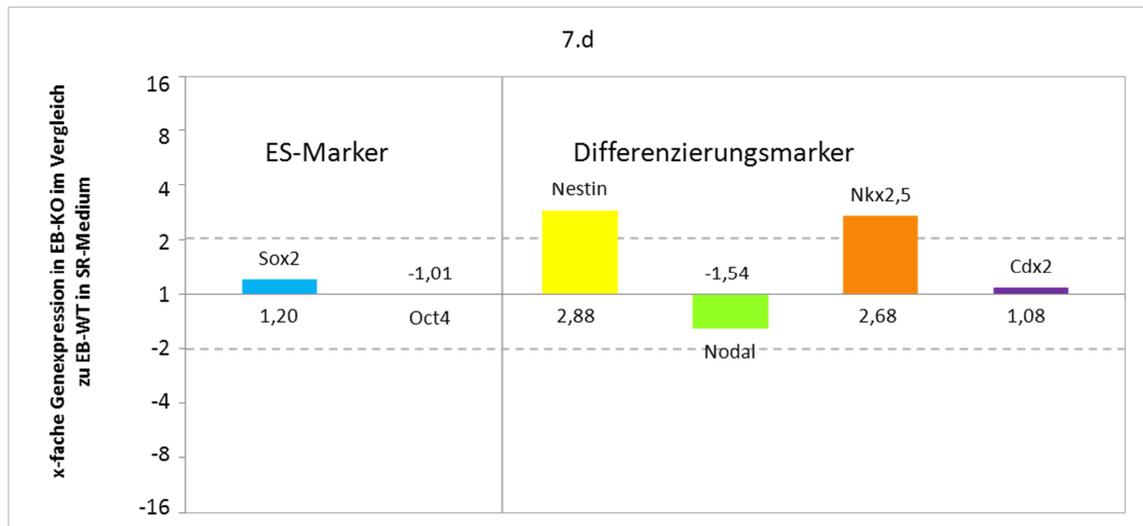


Abbildung 18: Expression der Markergene an Tag 7 im SR-Medium

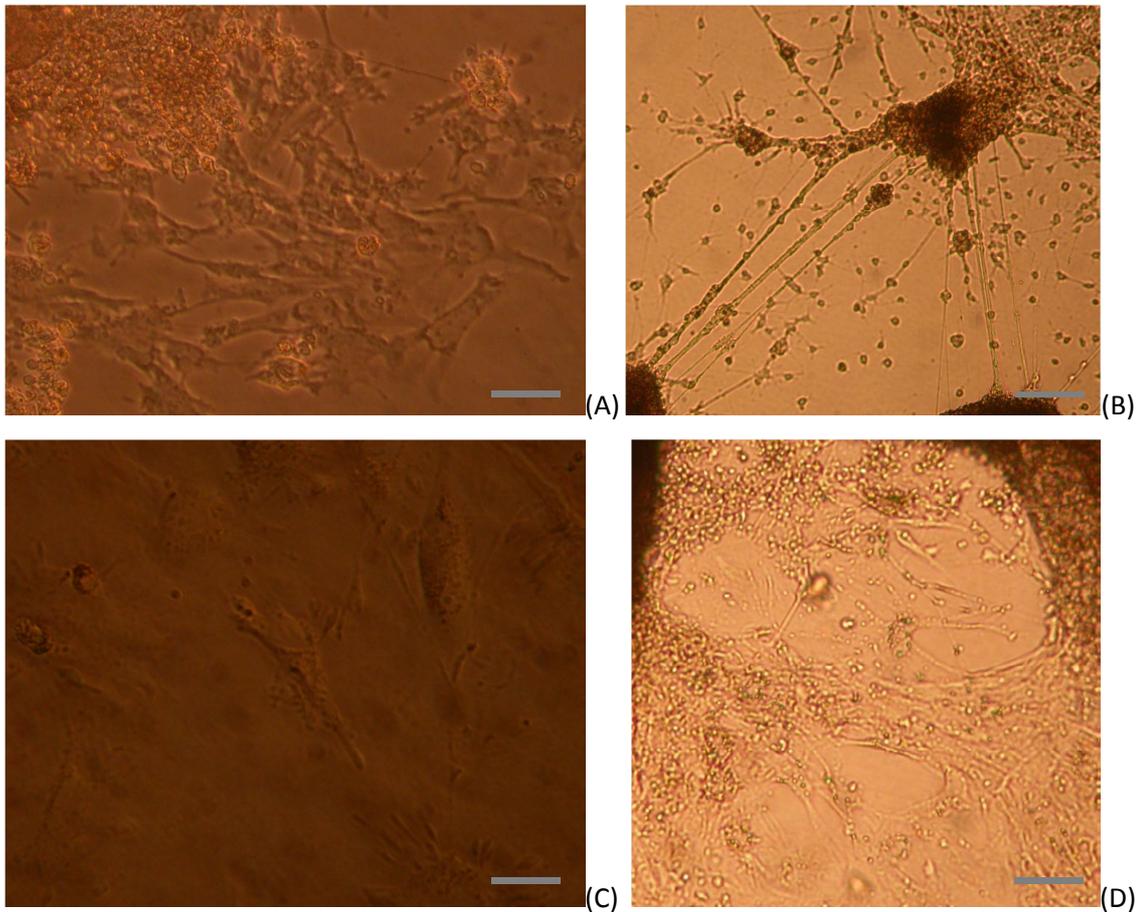
Dargestellt ist die Genexpression von differenzierten (Tag 7) GNE-defizienten (KO)-Stammzellen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Stammzellen, welche in sialinsäurefreiem SR-Medium kultiviert wurden. Die Werte sind aus Mittelwerten von 3 Einzelmessungen berechnet. Links sind die Marker der embryonalen Stamm-(ES)-Zellen dargestellt (Oct4 und Sox2) und rechts die Differenzierungsmarker (Nestin, Nodal, Nkx2,5 und Cdx2). Die Zahlen über den Balken entsprechen den dargestellten Werten. Die gestrichelten Linien geben jeweils eine 2-fache Hoch- oder Herunterregulation an.

#### 4.4.4 Spontane Differenzierung von WT- und KO-Embryoid bodies

Jeweils ein KO-Embryoid body wurde nach 3 Tagen in hanging drops und anschließend 7 Tagen in FCS-EB-Medium generiert und dann am Tag 10 in 24-well-Platten ausplattiert.

Bei der Kultivierung der EB-KO in FCS-haltigem Medium konnte morphologisch nachgewiesen werden, dass sich die EB-KO spontan in Herzmuskelzellen differenzieren können, 3 Tage nach Ausplattierung hatten sich in 25 % der wells schlagende Herzmuskelzellen gebildet, nach 5 Tagen waren in 33 % der wells schlagende Herzmuskelzellen zu sehen. Ab dem 12. Tag nach Ausplattierung konnte eine Differenzierung in glatte Muskelzellen bei einzelnen Embryoid bodies beobachtet werden.

Im SR-Medium neigen sowohl EB-WT- als auch EB-KO-Zellen dazu neuronal zu differenzieren. EB-KO-Zellen differenzieren schneller in die neuronale Richtung. So sind EB-KO-Zellen im SR-Medium bereits am Tag 5 formiert und erste Zellen haben Neuriten ausgebildet, am Tag 28 überbrücken die Neuriten weite Strecken. EB-WT-Zellen gelingt am Tag 5 noch keine Zellformierung, am Tag 28 haben die nun formierten Zellen ebenfalls Neuriten ausgebildet, allerdings überbrücken diese eine deutlich geringere Distanz (siehe Abb. 19).



**Abbildung 19: Spontane Differenzierung in SR-Medium**

Die spontane Differenzierung erfolgte nach Ausplattierung jeweils eines Embryoid Bodies an Tag 10. Die Emryoid Bodies wuchsen in SR-haltigem Medium in Gelatine-beschichteten wells. Dargestellt sind Fotos der Mikroskopie von jeweils einem differenzierten EB-KO in SR-haltigem Medium an Tag 5 (A) (eingezeichnete Längeneinheit entspricht 100  $\mu\text{m}$ ) und an Tag 28 (B) nach Ausplattierung (eingezeichnete Längeneinheit entspricht 1mm), sowie Fotos von einem EB-WT in SR-haltigem Medium an Tag 5 (C) (eingezeichnete Längeneinheit entspricht 100  $\mu\text{m}$ ) und an Tag 28 (D) nach Ausplattierung (eingezeichnete Längeneinheit entspricht 200  $\mu\text{m}$ ).

## 5 Diskussion

### 5.1 Charakterisierung der Stammzellen

In dieser Arbeit wurde mit embryonalen Stammzellen der Maus gearbeitet. Die beiden verwendeten Schwesterzelllinien, zum einen GNE-defiziente embryonale Stammzellen, zum anderen embryonale Wildtyp-Stammzellen, exprimieren beide die murinen Stammzellmarker Alkalische Phosphatase, SSEA-1 und Oct-4, so dass man von einem undifferenzierten Stadium ausgehen kann.

### 5.2 Vergleich der morphologischen Differenzierung der ES-KO- und ES-WT-Zellen zu Embryoid bodies

ES-KO- und ES-WT-Zellen zeigen morphologisch und im Wachstum keinen Unterschied bei Kultivierung im FCS-Medium. Die Embryoid bodies aus ES-WT- und ES-KO-Zellen unterschieden sich am ersten Tag voneinander. ES-KO-Zellen gelingt es schlechter sich zu Embryoid bodies zu formieren. Voraussetzung für die Bildung von Embryoid bodies ist eine gelingende Zell-Zellerkennung und Adhäsion, hierfür sind unter anderem die endterminalen Sialinsäuren der Glykokalyx verantwortlich. Es ist allerdings davon auszugehen, dass KO-Zellen aus dem FCS-Medium die benötigten Sialinsäuren bzw. deren Vorstufen aufnehmen können und damit das Fehlen der GNE kompensieren können. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Oberflächensialylierung bei ES-KO-Zellen in FCS-haltigem Medium um 28% reduziert ist (Schwarzkopf et al., 2002). Diese Reduktion kann ein Grund sein, warum ES-KO-Zellen länger brauchen, um die typische Kugelformation von Embryoid bodies zu erlangen als ES-WT-Zellen. EBs wurden außerdem in SR-haltigem Medium generiert.

Als Ausgangszellen wurden einmal ES-Zellen verwendet, die zuvor in FCS-haltigem Medium kultiviert waren und einmal ES-Zellen, die zuvor in SR-haltigem Medium wuchsen.

ES-KO-Zellen, die vorher in FCS-haltigem ES-Medium kultiviert wurden, formieren genauso wie ES-WT-Zellen auch in SR-haltigem-EB-Medium Embryoid bodies. Allerdings sind ähnliche morphologische Unterschiede zwischen EB-KO und EB-WT in den ersten Tagen feststellbar wie bei der Generierung der Embryoid bodies in FCS-haltigem-EB-Medium. In SR-haltigem EB-Medium sind die sich bildenden EBs in den ersten Tagen größer verglichen mit den WT-EBs. Diese Größendifferenz zeigt, dass die KO-Zellen im SR-Medium stärker proliferieren als WT-Zellen. Eine gesteigerte Proliferation von KO-ES-Zellen in SR-haltigem Medium konnte bereits von Weidemann et. al. (2010) gezeigt werden.

ES-KO-Zellen, die zuvor in SR-ES-Medium kultiviert wurden, gelingt eine Embryoid body-Generierung deutlich schlechter. Ursache könnte die um 70% geringere Oberflächensialylierung der KO-ES-Zellen in SR-haltigem Medium sein (Schwartzkopf et al., 2002). Mangelnde Zell-Zell-Interaktion durch zu wenige Sialinsäuren in der Glykokalyx lässt vermutlich nur eine geringere Verbindung zwischen den Zellen zu. Letztendlich schlägt sich das in einer mengen- und größenmäßig kleineren Masse an Embryoid bodies nieder.

### **5.3 Vergleich der Differenzierung der ES-KO- und ES-WT-Zellen zu Embryoid bodies anhand der Expression der verschiedenen Markergene**

In den Ergebnissen der quantitativen Real-time-PCRs ist ein Unterschied der Genexpression in ES-KO-Zellen im Gegensatz zu ES-WT-Zellen bei Kultivierung der Zellen in FCS-haltigem Medium zu sehen. Die KO-Stammzellen exprimieren alle Gene geringer, auch die Stammzellmarker *Oct-4* und *Sox-2*, noch stärker herunterreguliert sind allerdings die Differenzierungsgene aller 3 Keimblätter. Die ES-KO-Zellen starten also mit einem geringeren Differenzierungsgrad in die Embryoid body-Formationen im FCS-Medium. Im SR-Medium besteht keine, mit Ausnahme von *Nkx-2,5*, mehr als 2-fache Hoch- oder Herunterregulation der verschiedenen Gene in den ES-KO-Zellen. Bereits Bryja et al. (2006) konnten bei der Kultivierung von ES-Zellen in SR-Medium unterschiedliches Wachstum und eine veränderte *Oct-4*-Expression zeigen im Vergleich zu ES-Zellen in FCS-Medium. Auffällig ist, dass sowohl in FCS-Medium als auch in SR-Medium *Nkx-2.5* jeweils in KO-ES-Zellen mehr als 2-fach herunterreguliert ist. In den folgenden Differenzierungstagen ist der Unterschied aber zumindest bei den Zellen, die in FCS-haltigem Medium kultiviert wurden, nicht mehr auszumachen.

Insgesamt ist aus den quantitativen Real-time-PCR-Ergebnissen der folgenden Differenzierungstage sowohl in SR-haltigem und in FCS-haltigem Medium festzustellen, dass WT- und KO-EBs alle untersuchten Gene exprimieren. EB-KO-Zellen scheinen also ähnlich wie die EB-WT-Zellen fähig zu sein, in alle drei Keimblätter zu differenzieren.

Bei Kultivierung im FCS-Medium zeigen die quantitativen Real-time-PCR-Ergebnisse keinen Unterschied der Expression der in dieser Arbeit untersuchten Differenzierungsmarker zwischen EB-WT- und EB-KO-Zellen (Unterschiede im Durchschnitt meist kleiner als eine 2-fache Herunter- oder Hochregulation).

Auffällig ist, dass am Tag 3 im SR-Medium alle Gene von den KO-EBs verstärkt exprimiert werden, insbesondere *Nkx-2,5* und *Cdx-2*. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass KO-EBs mit

einem verminderten Expressionsgrad aller Gene starten (siehe Ergebnisse für ES-Zellen) und nun nach 3 Tagen mit einer überschießenden Expression wieder aufholen. Nestin, ein Markergen für die ektodermale Differenzierung, wird an Tag 3 und 7 in den KO-EBs vermehrt abgelesen. Eine vermehrte Expression von Nkx-2.5 bei EB-KO-Zellen konnte an Tag 3 und 7 nachgewiesen werden. Dazu passen die Ergebnisse der spontanen Differenzierung. EB-KO können sowohl in die neuronale Richtung differenzieren (SR-Medium) als auch Herzmuskelzellen und glatte Muskelzellen (FCS-Medium) bilden. Auch Milman Krentis et al. konnten eine Differenzierung von KO-EB in Herzmuskelzellen und neuronale Zellen beobachten, allerdings stellten sie eine verlangsamte Differenzierung und Proliferation fest (Milman Krentis et al., 2011). Da die Unterschiede der Expression der Gene vor allem bei der Kultivierung in SR-haltigem Medium auffallen, ist vermutlich das Fehlen der Sialinsäuren bzw. die andere Zusammensetzung des SR-Medium dafür verantwortlich.

## **5.4 Überlegungen zur Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die embryonale Entwicklung**

### **5.4.1 Embryoid bodies als Modell für embryonale Entwicklung**

1985 präsentierte Doetschman et al. zum ersten Mal, dass embryonale Stammzellen spontan in Suspension oder „hanging drops“ zu Embryoid bodies differenzieren. Schnell entdeckte man, dass Zellen in Embryoid bodies das Potenzial haben sich in die verschiedensten Zelltypen wie Kardiomyozyten, Skelettmuskelzellen, endotheliale und neuronale Zellen, Adipozyten und hämatopoetische Vorläuferzellen zu entwickeln. Mittels Embryoid bodies konnten nun unterschiedliche Aspekte der Entwicklung in der Embryogenese experimentell untersucht werden (Guan et al., 1999). Zum Teil wurden Ergebnisse, die durch Untersuchungen an entsprechenden Embryoid bodies gefunden wurden, *in vivo* bestätigt. So wurde in Cripto-1 defizienten Embryoid bodies ein Defekt in der frühen Kardiomyoztendifferenzierung gefunden, was sich in der fehlenden Expression von der kardial-spezifischen leichten und schweren Kette des Myosins in der Entwicklung zeigte. *In-vivo*-Versuche zeigten, dass Cripto-1-defiziente Föten im Mutterleib an Tag 8,5 sterben und eine Bildung von kardialem Myosin ausblieb (Desbaillets et al., 2000).

Die *In-vitro*-Untersuchung von Embryoid bodies lässt also Schlüsse auf ähnliche *In-vivo*-Vorgänge während der Embryonalentwicklung zu.

Mansergh et al. (2009) zeigten auf, dass die Genexpression in Embryoid bodies aus murinen Stammzellen von EB zu EB sehr stark variiert, sogar wenn diese mit der gleichen Start-Stammzellanzahl generiert wurden und in der gleichen Kulturschale kultiviert wurden. Die

Differenzierung scheint also sehr zufällig zu verlaufen, daher ist die Reproduzierbarkeit von Genexpressionsmustern schwierig.

Auch in dieser Arbeit variierte bei den Versuchen die Größe und das Aussehen von den Embryoid bodies in einer Kulturschale. Da aber RNA aus einer großen Masse an Embryoid bodies isoliert wurde und diese morphologische Variabilität sowohl bei KO- als auch bei WT-Embryoid bodies zu beobachten war, kann trotzdem von nicht-zufälligen Ergebnissen ausgegangen werden.

#### **5.4.2 Mögliche Schlussfolgerungen auf die Embryonalentwicklung von GNE-KO-Mäusen**

Aufgrund der Ergebnisse scheint klar zu sein, dass bei der Generierung von Embryoid bodies keine großen Differenzierungsunterschiede zwischen WT- und KO-Genotyp feststellbar sind. Die Ergebnisse der spontanen Differenzierung weisen darauf hin, dass die GNE nicht essentiell für die neuronale Differenzierung, die kardiale Entwicklung und die Entwicklung von glattem Muskelgewebe ist, denn dies gelingt den KO-Embryoid bodies in der spontanen Differenzierung. Die Untersuchungen von Kontou et al. (2008) wiesen nach, dass in PC-12-Zellen Sialinsäurevorläufer ebenfalls neuronale Differenzierung induzieren. In den qRT-PCR-Ergebnissen fällt am Tag 7 im SR-Medium eine etwa 2,5-fache Hochregulierung der Genexpression von *Nestin*, einem Marker für ektodermales Gewebe, auf. Milman-Krentsis et al. (2011) beschreiben in ihren Versuchen eine im Gegensatz zu den WT-EB verzögerte Differenzierung der KO-EBs in kardiale und neuronale Zellen. Diese Versuche wurden allerdings mit Sialinsäure-reichem Medium durchgeführt. Bei den spontanen Differenzierungen von KO-Embryoid bodies in sialinsäurefreiem SR-haltigem-EB-Medium fallen in dieser Arbeit eine verstärkte und eine zeitigere Differenzierung in die neuronale Richtung auf. Gezeigt werden konnte bereits, dass die Oberflächensialylierung von neuronalen Zellen das Wachstum der Neuriten sowie Zellüberleben und -migration beeinflusst (Li et al., 2008). Fraglich bleibt darüber hinaus, ob die GNE selbst oder als Interaktionspartner beispielsweise mit CRMP-1 (Weidemann et al., 2006) eine weitere regulierende Funktion in der neuronalen Entwicklung innehat.

In den qRT-PCR-Ergebnissen fällt eine veränderte *Nkx-2.5*-Expression der KO-EBs an Tag 0, 3 und 7 in SR-haltigem Medium auf, was u.a. an einer veränderten kardialen Entwicklung liegen könnte. An Tag 8,5 – 9,5 hat sich bereits die Neuralplatte bei den Embryonen gebildet und das Herz beginnt zu schlagen. Der *in-vitro* Nachweis der *Nkx-2.5*-Expression und das Vorhandensein von myokardialen Zellen bei den Versuchen der spontanen Differenzierung lässt darauf schließen, dass auch *in vivo* die Entwicklung des Herzens stattfindet. Auch Milman-

Krentsis et al. (2011) konnten in ihren Versuchen eine Differenzierung in Herzmuskelzellen zeigen, in der weiteren Differenzierung beschreiben sie aber eine geringere Schlagfrequenz und Differenzierung der Zellen. In den Versuchen dieser Arbeit fällt eine deutliche Herunterregulierung des *Nkx-2,5*-Gens an Tag 0 in beiden Kulturmedien und eine verstärkte Expression an Tag 3 und 7 im SR-Medium in den KO-im Vergleich zu den WT-Stammzellen auf. Weiterhin fällt auf, dass die KO-EBs am Tag 3 in SR-Medium mehr als das 10-fache an *Cdx-2* exprimieren im Vergleich zu WT-EBs. *Cdx-2* wird in Trophektoderm exprimiert. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Balance zwischen der Bildung von embryonalem und extraembryonalem Gewebe verändert ist. Die Expression der GNE ist in der Plazenta im Vergleich zu anderen Organen sehr hoch (Lucka et al., 1999).

Es ist davon auszugehen, dass die Versuche in FCS-Medium am ehesten die *in-vivo*-Bedingung intrauterin wiedergeben können, wobei ungeklärt bleibt, wie viel Sialinsäuren tatsächlich über die Plazenta transportiert und von Embryonen aufgenommen werden.

## 5.5 Ausblick

Die Bildung von Embryoid bodies in SR-Medium aus ES-KO-Zellen, die zuvor in SR-Medium kultiviert wurden, gelingt nur schlecht. Eine geringe Oberflächensialylierung der KO-ES-Zellen konnte bereits gezeigt werden (Schwarzkopf et al., 2002). Sinnvoll wäre es sicherlich, experimentell ebenfalls die Oberflächensialylierung der WT- und KO-Embryoid bodies mittels spezifischer Lectine und Antikörper zu überprüfen. Voraussetzung für jede Entwicklung ist die richtige Erkennung und Interaktion unter den wachsenden und sich teilenden Zellen, wofür die Oberflächensialylierung der Glykokalix zum Großteil verantwortlich ist.

In Experimenten wurde eine verbesserte Oberflächensialylierung bei Zugabe bzw. Zufütterung von N-Acetylmannosamin (ManNAc) beobachtet (Weidemann et al., 2010, Schwarzkopf et al., 2002). Die Entstehung von ManNAc wird in den Zellen durch die Epimerase-Funktion der GNE katalysiert und kann neben der GNE auch durch andere Kinasen zu N-Acetylmannosamin-6-Phosphat phosphoryliert werden. Bei Zusatz von ManNAc zum SR-Medium kann die Zelle ManNAc aufnehmen. Zu untersuchen wäre also, ob bei Zugabe von ManNAc zum EB-SR-Medium die Bildung von Embryoid bodies wieder besser gelingt.

Für die Formation von Embryoid bodies ist neben dem gelingenden Informationsaustausch zwischen den Zellen auch eine gelungene Zelladhäsion Voraussetzung. Es ist daher sinnvoll, die Fähigkeit von KO- im Vergleich zu WT-ES-Zellen an gewisse Substrate wie Gelatine, Kollagene oder Lamine zu adhären zu prüfen.

In dieser Arbeit konnte nur morphologisch gezeigt werden, dass sich GNE-defiziente Embryoid bodies spontan in Herz-, Nerven- und glatte Muskelzellen differenzieren. Mittels quantitativer Real-time PCR könnte auch im differenzierten Stadium ein Expressionsvergleich anhand verschiedener gewebetypischer Gene durchgeführt werden.

Es gibt sehr unterschiedliche Protokolle zur Formation von Embryoid bodies, die Ergebnisse sind u.a. auch abhängig von der gewählten Methode (Koike et al., 2007). Rungarunlert et al. (2009) beschreiben eine standardisierte Embryoid body-Bildung in Bioreaktor-Kultursystemen, hierdurch könnte die Varianz der Embryoid bodies in dieser Arbeit minimiert werden.

## 6 Zusammenfassung

Die UDP-N-Acetylglukosamin-2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase (GNE) ist das Schlüsselenzym in der Biosynthese der Sialinsäuren, allerdings werden auch weitere Funktionen diskutiert. Es ist nicht möglich eine GNE-defiziente Maus zu generieren, da die murinen GNE-defizienten Embryonen am Tag 8.5 intrauterin versterben. Die Ursache für diese frühe Letalität ist nicht geklärt.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die frühembryonale Differenzierung in die drei Keimblätter aus Wildtyp- und GNE-defizienten Stammzellen unterscheidet. Dazu wurden aus Wildtyp- und GNE-defizienten embryonalen Stammzellen sogenannte „hanging drops“ Embryoid bodies gebildet und an Tag 0, 3, 5 und 7 sowohl morphologisch als auch molekularbiologisch mittels quantitativer Realtime-Polymerasekettenreaktionen untersucht. Zudem erfolgte eine spontane Differenzierung der embryonalen Stammzellen in Herzmuskel-, glatte Muskel- und neuronale Zellen. Die Versuche wurden jeweils in sialinsäure- und serumhaltigem (FCS) Medium und in sialinsäurefreiem Serum-replacement (SR)-Medium durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl GNE-defiziente als auch Wildtyp-Embryoid bodies in alle 3 Keimblätter differenzieren können. Die Genexpression der Markergene für die 3 Keimblätter unterscheidet sich in sialinsäurehaltigem FCS-Medium kaum, während im sialinsäurefreien SR-Medium die Expression von *Nkx2,5* (Gen für kardiales Vorläufergewebe), *Cdx2* (Gen für Trophektoderm) und *Nestin* (Gen für ektodermales Gewebe) während der Embryoid body-Entwicklung zwischen Wildtyp- und GNE-defizienten-Zellen variiert. Morphologisch fällt auf, dass GNE-defiziente embryonale Stammzellen in beiden Medien verspätet und schlechter die typische Embryoid body Form bilden. GNE-defiziente Embryoid bodies können spontan in Herzmuskel- und glatte Muskelzellen sowie in neuronale Zellen differenzieren.

Die Versuche im FCS-Medium legen nahe, dass die frühe Letalität der GNE-defizienten Embryonen nicht durch die Unfähigkeit der Differenzierung in die 3 Keimblätter verursacht ist. Die Versuche im SR-Medium machen eine veränderte Bildung von vor allem kardialem und neuronalem Gewebe wahrscheinlich.

## 7 Literaturverzeichnis

Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA (2000) Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227 (2): 271-278.

Amsili S, Zer H, Hinderlich S, Krause S, Becker-Cohen M, MacArthur DG, North KN, Mitrani-Rosenbaum S (2008) UDP-N-Acetylglucosamine 2-Epimerase/N-Acetylmannosamine Kinase (GNE) Binds to Alpha-Actinin 1: Novel Pathways in Skeletal Muscle. *PLoS ONE* 3 (6): e2477.

Angata T (2006) Molecular diversity and evolution of the Siglec family of cell-surface lectins. *Mol Divers* 10 (4): 555-566.

Angata T, Varki A (2002) Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related r-Keto Acids: An Evolutionary Perspective. *Chem Rev* 102 (2): 439-469.

Argov Z, Eisenberg I, Grabov-Nardini G, Sadeh M, Wirguin I, Soffer D, Mitrani-Rosenbaum S. (2003) Hereditary inclusion body myopathy: the Middle Eastern genetic cluster. *Neurology* 60 (9): 1519–23.

Argov Z, Mitrani-Rosenbaum S. (2008) The hereditary inclusion body myopathy enigma and its future therapy. *Neurotherapeutics* 5 (4): 633-637.

Beck F, Eler T, Russell A, James R. (1995) Expression of *Cdx-2* in the Mouse Embryo and Placenta: Possible Role in Patterning of the Extra-Embryonic Membranes. *Dev Dynamics* 204 (3): 219–227.

Blume A, Weidemann W, Stelzl U, Wanker EE, Lucka L, Donner P, Reutter W, Horstkorte R, Hinderlich S (2004) Domain-specific characteristics of the bifunctional key enzyme of sialic acid biosynthesis, UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *Biochem J* 384 (3): 599-607.

Bork K, Reutter W, Gerardy-Schahn R, Horstkorte R (2005) The intracellular concentration of sialic acid regulates the polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *FEBS Lett* 579 (22): 5079-83.

Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A (2002) Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *PNAS* 99 (4): 2193–2198.

Broccolini A, Gidaro T, De Cristofaro R, Morosetti R, Gliubizzi C, Ricci E, Tonali PA, Mirabella M (2008) Hyposialylation of neprilysin possibly affects its expression and enzymatic activity in hereditary inclusion-body myopathy muscle. *J Neurochem* 105 (3): 971-981.

Bryja V, Bonilla S, Cajánek L, Parish CL, Schwartz CM, Luo Y, Rao MS, Arenas E (2006) An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 24 (4): 844-849.

Campbell RE, Mosimann SC, Tanner ME, Strynadka NC (2000) The structure of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase reveals homology to phosphoglycosyl transferases. *Biochemistry* 39 (49): 14993-15001.

Carlin AF, Uchiyama S, Chang Y-C, Lewis AL, Nizet V, Varki A (2009) Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* 113 (14): 3333-3336.

Carlin AF, Lewis AL, Varki A, Nizet V (2007) Group B Streptococcal Capsular Sialic Acids Interact with Siglecs (Immunoglobulin-Like Lectins) on Human Leukocytes. *J Bacteriol* 189 (4): 1231–1237.

Chen X, Varki A (2010) Advances in the Biology and Chemistry of Sialic Acids. *ACS Chemical Biology* 5 (2): 163-176.

Cohen M, Hurtado-Ziola N, Varki A (2009) ABO blood group glycans modulate sialic acid recognition on erythrocytes. *Blood* 114 (17): 3668-3676.

Colman, PM (1994) Influenza virus neuraminidase: Structure, antibodies and inhibitors. *Protein Sci* 3: 1687-1696.

Comb DG, Roseman S (1960) The Sialic Acids. *J Biological Chemistr* 235 (9): 2529-2537.

Crocker PR (2002) Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr Opin Struct Biol* 12 (5): 609-615.

David R, Stieber J, Fischer E, Brunner S, Brenner C, Pfeiler S, Schwarz F, Franz W-M (2009) Forward programming of pluripotent stem cells towards distinct cardiovascular cell types. *Cardiovasc Res* 84: 263–272.

Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M (2000) Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 85 (6): 645—651.

Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87: 27-45.

Effertz K, Hinderlich S, Reutter W (1999) Selective Loss of either the Epimerase or Kinase Activity of UDP-*N*-acetylglucosamine 2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamine Kinase due to Site-directed Mutagenesis Based on Sequence Alignments. *J Biol Chem* 274 (40): 28771–28778.

Eisenberg I, Avidan N, Potikha T, Hochner H, Chen M, Olender T, Barash M, Shemesh M, Sadeh M, Grabov-Nardini G, Shmilevich I, Friedmann A, Karpati G, Bradley WG, Baumbach L, Lancet D, Ben Asher E, Beckmann JS, Argov Z, Mitrani-Rosenbaum S (2001) The UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet* 29 (1): 83-87.

Gagiannis D, Orthmann A, Danßmann I, Schwarzkopf M, Weidemann W, Horstkorte R (2007) Reduced sialylation status in UDP-*N*-acetylglucosamine-2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase (GNE)-deficient mice. *Glycoconj J* 24 (2-3): 125–130.

Galeano B, Klootwijk R, Manoli I, Sun M, Ciccone C, Darvish D, Starost MF, Zerfas PM, Hoffmann VJ, Hoogstraten-Miller S, Krasnewich DM, Gahl WA, Huizing M (2007) Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by *N*-acetylmannosamine. *J Clin Invest* 117 (6): 1585-1594.

Gao Z, Cox JL, Gilmore JM, Ormsbee BD, Mallanna SK, Washburn MP, Rizzino A (2012) Determination of the protein interactome of the transcription factor Sox2 in embryonic stem cells engineered for inducible expression of four reprogramming factors. *J Biol Chem* 287 (14): 11384-11397.

Ghaderi D, Strauss HM, Reinke S, Cirak S, Reutter W, Lucka L, Hinderlich S (2007) Evidence for dynamic interplay of different oligomeric states of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase by biophysical methods. *J Mol Biol* 369 (3):746-758.

Guan K, Rohwedel J, Wobus AM (1999) Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation *in vitro*. *Cytotechnology* 30 (1-3): 211–226.

Hahnel AC, Rappolee DA, Millan JL, Manes T, Ziomek CA, Theodosiou NG, Werb Z, Pedersen RA, Schultz GA (1990) Two alkaline phosphates genes are expressed during early development in the mouse embryo. *Development* 110 (2): 555-564.

Hinderlich S, Stäsche R, Zeitler R, Reutter W (1997) A Bifunctional Enzyme Catalyzes the First Two Steps in N-Acetylneuraminic Acid Biosynthesis of Rat Liver. *J Biol Chem* 272 (39): 24313–24318.

Horstkorte R, Nöhring S, Danker K, Effertz K, Reutter W, Lucka L (2000) Protein kinase C phosphorylates and regulates UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *FEBS Lett* 470 (3): 315-318.

Horstkorte R, Nöhring S, Wiechens N (1999) Tissue expression and amino acid sequence of murine UDP N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *Eur J Biochem* 260 (3): 923-927.

Huizing M, Krasnewich DM (2010) Hereditary Inclusion Body Myopathy: A decade of progress. *Biochim Biophys Acta* 1792 (9): 881–887.

Ikeda-Sakai Y, Manabe Y, Fujii D, Kono S, Narai H, Omori N, Nishino I, Abe K (2012) Novel Mutations of the GNE Gene in Distal Myopathy with Rimmed Vacuoles Presenting with Very Slow Progression. *Case Rep Neurol* 4 (2): 120–125.

Kemmner W, Kessel P, Sanchez-Ruderisch H, Möller H, Hinderlich S, Schlag PM, Detjen K (2012) Loss of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) induces apoptotic processes in pancreatic carcinoma cells. *FASEB J* 26 (2): 938-946.

Keppler OT, Hinderlich S, Langner J, Schwartz-Albiez R, Reutter W, Pawlita M (1999) UDP-GlcNAc 2-epimerase: a regulator of cell surface sialylation. *Science* 284 (5418): 1372-1376.

Koike M, Sakaki S, Amano Y, Kurosawa H (2007) Characterization of embryoid bodies of mouse embryonic stem cells formed under various culture conditions and estimation of differentiation status of such bodies. *J Biosci Bioeng* 104 (4): 294-299.

Kontou M, Bauer C, Reutter W, Horstkorte R (2008) Sialic acid metabolism is involved in the regulation of gene expression during neuronal differentiation of PC12 cells. *Glycoconj J* 25 (3): 237-244.

Kurochkina N, Yardeni T, Huizing M (2010) Molecular modelling of the bifunctional enzyme UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase and predictions of the structural effects of mutations associated with HIBM and sialuria. *Glycobiology* 20 (3): 322-337.

Kurosawa H (2007) Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 103 (5): 389-398.

Krause S, Hinderlich S, Amsili S, Horstkorte R, Wiendl H, Argov Z, Mitrani-Rosenbaum S, Lochmüller H (2005) Localization of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc kinase (GNE) in the Golgi complex and the nucleus of mammalian cells. *Exp Cell Res* 304 (2): 365-379.

Lee J, Go Y, Kang I, Han Y-M, Kim J (2010) Oct-4 controls cell-cycle progression of embryonic stem cells. *Biochem J* 426 (2): 171-181.

Leroy JG., Seppala R., Huizing M, Dacremont G, De Simpel H, Van Coster RN, Orvisky E, Krasnewich DM, Gahl WA (2001) Dominant inheritance of sialuria, an inborn error of feedback inhibition. *Am J Hum Genet* 68 (6): 1419-1427.

Li H, Liu H, Corrales CE, Risner JR, Forrester J, Holt JR, Heller S, Edge ASB (2009) Differentiation of neurons from neural precursors generated in floating spheres from embryonic stem cells. *BMC Neurosci* 10: 122.

Li YL, Wu GZ, Dawe GS, Zeng L, Cui SS, Loers G, Tilling T, Sun L, Schachner M, Xiao ZC (2008) Cell Surface Sialylation and Fucosylation Are Regulated by L1 via Phospholipase C $\gamma$  and Cooperate to Modulate Neurite Outgrowth, Cell Survival and Migration. *PLoS One* 3 (12): e3841.

Li YL, Wu GZ, Zeng L, Dawe GS, Sun L, Loers G, Tilling T, Cui SS, Schachner M, Xiao ZC (2009) Cell surface sialylation and fucosylation are regulated by the cell recognition molecule L1 via PLC $\gamma$  and cooperate to modulate embryonic stem cell survival and proliferation. *FEBS Lett* 583 (4): 703-710.

Löffler G: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 7. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2008, S. 243-263.

Lucka L, Krause M, Danker K, Reutter W, Horstkorte R (1999) Primary structure and expression analysis of human UDP-N-acetyl-glucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase, the bifunctional enzyme in neuraminic acid biosynthesis. *FEBS Lett* 454 (3): 341-344.

Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP (1995) Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev* 9 (13): 1654-1666.

Mailsan F, Testi R (2005) The ganglioside GD3 as the Greek goddess Hecate: several faces turned towards as many directions. *IUBMB Life* 57 (7): 477-482.

Mansergh FC, Daly SC, Hurley AL, Wride MA, Susan M Hunter SM, Evans MJ (2009) Gene expression profiles during early differentiation of mouse embryonic stem cells. *BMC Dev Biol* 9: 5.

Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (12): 7634-7638.

Martinez J, Nguyen LD, Hinderlich S, Zimmer R, Tauberger E, Reutter W, Saenger W, Fan H, Moniot S (2012) Crystal structures of N-acetylmannosamine kinase provide insights into enzyme activity and inhibition. *J Biol Chem* 287 (17): 13656-13665.

Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H (2007) Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stemcells. *Nat Cell Biol* 9 (6): 625-635.

Milman Krentsis I, Sela I, Eiges R, Blanchard V, Berger M, Becker C, Mitrani-Rosenbaum S (2011) GNE Is Involved in the Early Development of Skeletal and Cardiac Muscle. *PLoS One* 6 (6): e21389

Miyagi S, Saito T, Mizutani K, Masuyama N, Gotoh Y, Iwama A, Nakauchi H, Masui S, Niwa H, Nishimoto M, Muramatsu M, Okuda A (2004) The Sox-2 Regulatory Regions Display Their Activities in Two Distinct Types of Multipotent Stem Cells. *Mol Cell Biol* 24 (10): 4207–4220.

Mori-Yoshimura M, Monma K, Suzuki N, Aoki M, Kumamoto T, Tanaka K, Tomimitsu H, Nakano S, Sonoo M, Shimizu J, Sugie K, Nakamura H, Oya Y, Hayashi YK, Malicdan MC, Noguchi S, Murata M, Nishino I (2012) Heterozygous UDP-GlcNAc 2-epimerase and N-acetylmannosamine kinase domain mutations in the GNE gene result in a less severe GNE myopathy phenotype compared to homozygous N-acetylmannosamine kinase domain mutations. *J Neurol Sci* 318 (1-2): 100-105.

Monti E, Preti A, Nesti C, Ballabio A, Borsani G (1999) Expression of a novel human sialidase encoded by the NEU2 gene. *Glycobiology* 9 (12): 1313–1321.

Monti E, Bassi MT, Bresciani R, Civini S, Croci GL, Papini N, Riboni M, Zanchetti G, Ballabio A, Preti A, Tettamanti G, Venerando B, Borsani G (2004): Molecular cloning and characterization of NEU4, the fourth member of the human sialidase gene family. *Genomics* 83 (3): 445–453.

Munday J, Floyd H, Crocker PR (1999) Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages. *J Leukoc Biol* 66 (5): 705-711.

Nakamura K, Tsukamoto Y, Hijiya N, Higuchi Y, Yano S, Yokoyama S, Kumamoto T, Moriyama M (2010) Induction of GNE in myofibers after muscle injury. *Pathobiology* 77 (4): 191-199.

Nishino I, Malicdan MC, Murayama K, Nonaka I, Hayashi YK, Noguchi S (2005) Molecular pathomechanism of distal myopathy with rimmed vacuoles. *Acta Myol* 24 (2): 80-83.

Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J (2005) Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123 (5): 917-929.

Oetke C, Hinderlich S, Reutter W, Pawlita M (2003) Epigenetically mediated loss of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase expression in hyposialylated cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 308 (4): 892–898.

Park D, Xiang AP, Mao FF, Zhang L, Di CG, Liu XM, Shao Y, Ma BF, Lee JH, Ha KS, Walton N, Lahn BT (2010) Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells* 28 (12): 2162-2171.

Pease S, Braghetta P, Gearing D, Grail D, Williams RL (1990) Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukaemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol* 141 (2): 344-352.

Penner J, Mantey LR, Elgavish S, Ghaderi D, Cirak S, Berger M, Krause S, Lucka L, Voit T, Mitrani-Rosenbaum S (2006) Influence of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase mutant proteins on hereditary inclusion body myopathy. *Biochemistry* 45 (9): 2968-2977.

Proshin S, Yamaguchi K, Wada T, Miyagi T (2002) Modulation of neuritogenesis by ganglioside-specific sialidase (Neu 3) in human neuroblastoma NB-1 cells. *Neurochem Res* 27 (7-8): 841–846.

Ricci E, Broccolini A, Gidaro T, Morosetti R, Gliubizzi C, Frusciante R, Di Lella GM, Tonali PA, Mirabella M (2006) NCAM is hyposialylated in hereditary inclusion body myopathy due to GNE mutations. *Neurology* 66 (5): 755-758.

Roth J, Zuber C (1990) Immunoelectron microscopic investigation of surface coat of Wilms tumor cells. Dense lamina is composed of highly sialylated neural cell adhesion molecule. *Lab Invest* 62 (1): 55-60.

Rungarunlert S, Techakumphu M, Pirity MK, Dinnyes A (2009) Embryoid body formation from embryonic and induced pluripotent stem cells: Benefits of bioreactors. *World J Stem Cells* 1 (1): 11-21.

Saito S, Liu B, Yokoyama K (2004) Animal embryonic stem (ES) cells: self-renewal, pluripotency, transgenesis and nuclear transfer. *Hum Cell* 17 (3): 107-115.

Sakarya S, Göktürk C, Öztürk T, Ertugrul MB (2010) Sialic acid is required for nonspecific adherence of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhi on Caco-2 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58 (3): 330-335.

Schauer R (2009) Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol* 19 (5): 507-514.

Schauer R (2000) Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj J* 17 (7-9): 485-99.

Schöler HR, Dressler GR, Balling R, Rohdewohld H, Gruss P (1990) Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 9 (7): 2185-2195.

Schwarzkopf M, Knoblauch KP, Horstkorte R (2002) Sialylation is essential for early development in mice. *PNAS* 99 (8): 5267–5270.

Seppala R, Lehto V-P, Gahl WA (1999) Mutations in the Human UDP-N-Acetylglucosamine 2-Epimerase Gene Define the Disease Sialuria and the Allosteric Site of the Enzyme. *Am J Hum Genet* 64 (6): 1563–1569.

Seppala R, Tietze F, Krasnewich D, Weiss P, Ashwell G, Barsh G, Thomas GH, Packman S, Gahl WA (1991) Sialic acid metabolism in sialuria fibroblasts. *J Biol Chem* 266 (12): 7456-7461.

Solter D, Knowles BB (1978) Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (11): 5565-5569.

Stäsche R, Hinderlich S, Weise C, Effertz K, Lucka L, Moormann P, Reutter W (1997) A Bifunctional Enzyme Catalyzes the First Two Steps in *N*-Acetylneuraminic Acid Biosynthesis of Rat Liver. *J Biol Chem* 272 (39): 24319–24324.

Tam PPL, Loebel DAF (2007) Gene function in mouse embryogenesis: get set for the gastrulation. *Nat Rev Genet* 8 (5): 368-81.

Tauber R, Park CS, Reutter W (1983) Intramolecular heterogeneity of degradation in plasma membrane glycoproteins: evidence for a general characteristic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (13): 4026-4029.

Tomioka M, Nishimoto M, Miyagi S, Katayanagi T, Fukui N, Niwa H, Muramatsu M, Okuda A (2002) Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res* 30 (14): 3202-3213.

Tong Y, Tempel W, Nedyalkova L, Mackenzie F, Park HW (2009) Crystal structure of the *N*-acetylmannosamine kinase domain of GNE. *PLoS One* 4 (10): e7165.

Traving C, Schauer R (1998) Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci* 54 (12): 1330–1349.

Van Den Veyver IB, Cormier TA, Jurecic V, Baldini A, Zoghbi HY (1998) Characterization and physical mapping in human and mouse of a novel RING finger gene in Xp22. *Genomics* 51 (2): 251-261.

Varki A (2007) Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature* 446 (7139): 1023-1029.

Vimr ER, Kalivoda KA, Deszo EL, Steenbergen SM (2004) Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiol Mol Biol Rev* 68 (1): 132-153.

Wang Z, Sun Z, Li AV, Yarema KJ (2006) Roles for UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc 6-Kinase outside of Sialic Acid Biosynthesis. *J Biol Chem* 281 (37): 27016–27028.

Watabe T, Miyazono K (2009) Roles of TGF- $\beta$  family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res* 19 (1): 103-115.

Weidemann W, Klukas C, Klein A, Simm A, Schreiber F, Horstkorte R (2010) Lessons from GNE-deficient embryonic stem cells: sialic acid biosynthesis is involved in proliferation and gene expression. *Glycobiology* 20 (1): 107–117.

Weidemann W, Stelzl U, Lisewski U, Bork K, Wanker EE, Hinderlich S, Horstkorte R (2006) The collapsin response mediator protein 1 (CRMP-1) and the promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) bind to UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase (GNE), the key enzyme of sialic acid biosynthesis. *FEBS Lett* 580 (28-29): 6649–6654.

Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336 (6200): 684-687.

Wobus AM, Guan K, Yang HT, Boheler KR (2002) Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods Mol Biol* 185: 127-156.

Yamanaka S, Li J, Kania G, Elliott S, Wersto RP, Van Eyk J, Wobus AM, Boheler KR (2008) Pluripotency of embryonic stem cells. *Cell tissue Res* 331 (1): 5-22.

Yardeni T, Choekyi T, Jacobs K, Ciccone C, Patzel K, Anikster Y, Gahl WA, Kurochkina N, Huizing M (2011) Identification, tissue distribution, and molecular modeling of novel human isoforms of the key enzyme in sialic acid synthesis, UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase. *Biochemistry* 50 (41): 8914-8925.

Yogeeswaran G, Salk PL (1981) Metastatic Potential Is Positively Correlated with Cell Surface Sialylation of Cultured Murine Tumor Cell lines. *Science* 212 (4502): 1514-16.

Zuccotti M, Merico V, Redi CA, Bellazzi R, Adjaye J, Garagna S (2009) Role of Oct-4 during acquisition of developmental competence in mouse oocyte. *Reprod Biomed Online* 19 (3): 57-62.

## 8 Thesen der Dissertation

1. GNE-defiziente- sind ebenso wie Wildtyp- Embryonale Stammzellen der Maus in der Lage sich zu Embryoid bodies zu formieren und in alle 3 Keimblätter zu differenzieren.
2. Die frühe Letalität von GNE-defizienten Mausembryonen an Tag 8.5 ist nicht auf ein Problem in der Keimblattdifferenzierung zurückzuführen.
3. Es besteht ein Unterschied in der Genexpression zwischen Wildtyp- und GNE-defizienten Embryoid bodies.
4. Den geringeren Differenzierungsgrad der GNE-defizienten ES-Zellen in FCS-haltigem Medium holen diese in den ersten Tagen der Entwicklung in Embryoid bodies auf.
5. Die Genexpressionsunterschiede im SR-Medium legen eine veränderte Bildung und Funktion von kardialem, neuronalem und extraembryonalem Gewebe bei GNE-defizienten Embryonen nahe.
6. GNE-defizienten Embryoid bodies gelingt aufgrund der geringeren Oberflächensialylierung der Ausgangs-ES-Zellen in FCS- sowie in SR-Medium schlechter die typische Embryoid body-Konfiguration zu bilden.
7. GNE-defiziente Embryoid bodies können sich spontan in neuronale Zellen, Herzmuskelzellen und glatte Muskelzellen differenzieren.

---

## Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Jessica Hering  
Anschrift: Majakowskistraße 06  
09127 Chemnitz  
Geburtsdatum: 22.01.1988  
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt, heute Chemnitz  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung

1994 – 1998 Grundschule Gablenz, Chemnitz  
1998 – 2006 Johannes-Kepler-Gymnasium, Chemnitz  
Abschluss mit Abitur  
2006 – 2012 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg  
Abschluss mit 2. Ärztlicher Prüfung  
seit 03/2013 Assistenzärztin an der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, -  
psychotherapie und –psychosomatik des Carl-von-Basedow-Klinikums  
Saalekreis

Halle (Saale), den

---

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich, Jessica Hering, erkläre ehrenwörtlich, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Differenzierung von Wildtyp und GNE-defizienten murinen embryonalen Stammzellen in „Embryoid bodies““ unter der Leitung von Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertationsschrift aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

---

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertationsschrift vorgelegt.

---

## Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und für die herzliche Aufnahme in sein Team bedanken.

Ganz herzlich danken möchte ich Dr. Wenke Weidemann für ihre sehr gute fachliche Betreuung, ihr Vertrauen in meine Arbeit und für ihren Optimismus. Danke.

Mein Dank gilt weiterhin Annett Thate, die mich labortechnisch immer gerne unterstützt hat sowie der ganzen AG Horstkorte, durch die ich meine Zeit im Labor sehr genießen durfte.

Einen weiteren Dank möchte ich Manuel Rehm aussprechen, der mir bei computertechnischen Problemen stets zur Seite stand.

Nicht zuletzt möchte ich mich meiner ganzen Familie danken, insbesondere meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich darüber hinaus auf wunderbare Weise bis heute unterstützen und meiner Zwillingsschwester Annika, die mich immer wieder ermutigt.