

Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle (Saale)

Direktor: Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer

**Einfluss von Nährstoffen auf die pankreatische Differenzierung muriner
embryonaler Stammzellen**

Dissertation

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

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

von Sandrina Maria Schweyen

geboren am 16.12.1985 in Dinslaken

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer (MLU Halle)
2. Prof. Dr. Christoph Viehbahn (Uni Göttingen)
3. Prof. Dr. Maria Wartenberg (Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Eröffnung des Promotionsverfahrens am 01.07.2014

Verteidigung am 05.02.2015

Referat

In vitro kann über die Manipulation verschiedener Signalwege die Entwicklung der beta-Zelle nachvollzogen werden. Zum Beispiel können durch Zugabe von Wachstumsfaktoren embryonale Stammzellen zu definitivem Entoderm und weiter zu pankreatischen Vorläuferzellen differenziert werden. Glukose ist hierbei ein wichtiger Stimulus dessen Bedeutung in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde.

In dieser Arbeit wurden zwei murine embryonale Stammzelllinien, die CGR8 und ihre transgene Schwesterlinie, die Sox17-DsRed, durch Zugabe von Aktivin A, KAAD-Cyclopamin und Indolaktam V zu pankreatischen Vorläufern differenziert und dabei der Einfluss von Glukose auf die Differenzierung sowohl mittels RNA-Analyse als auch licht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es wurden zwei verschiedene Endpunkte gewählt. Zum ersten wurden die Sox17-DsRed zur Gewinnung von definitivem Entoderm verwendet. Es konnte kein synergistischer Effekt nach Zugabe von Aktivin A und/oder *Inducer of Definitive Endoderm* (IDE)1 und 2 detektiert werden. Zum anderen konnte anhand der CGR8 gezeigt werden, dass eine bestimmte Glukose-Konzentration des Mediums für die Gewinnung von pankreatischen Vorläuferzellen essentiell ist. Das Standard-Kulturmedium enthält 17,5 mM Glukose; eine Verringerung der Konzentration bis 5 mM zur Erzielung physiologischerer Bedingungen hatte keinen fördernden Effekt auf die Differenzierung. Ein noch geringerer Glukose-Gehalt des Mediums führte zu einem massiven Zellsterben und behindert Differenzierung und Kultur. Durch Zugabe von sehr hohen Glukose-Konzentrationen (50 mM) konnte eine Erhöhung des Anteils an pankreatischen Pdx1-positiven Vorläuferzellen erreicht werden. Der Anteil Pdx1-exprimierender Zellen war jedoch nur dann erhöht, wenn Glukose vom Stadium des Mesentoderms (Tag 3) bis zur beginnenden Bildung pankreatischer Vorläuferzellen (Tag 8) hinzugegeben wurde. Andere Differenzierungsintervalle zeigten sich weniger Glukose-sensibel. Es konnte zudem dargestellt werden, dass die Pdx1-Expression im Intervall von Tag 3 bis 8 mit steigender Glukose-Konzentration zunimmt. Die *in vivo* vorliegende Konzentration liegt bei 3,9-5,5 mM, die Schädigung der beta-Zellen beginnt ab einer chronischen Hyperglykämie von circa 10 mM (Glukotoxizität). Hiervon abzugrenzen sind ES-Zellen, welche *in vitro* einer weitaus höheren Konzentration bedürfen (17,5 mM). Die aktivierten Mechanismen sind eng mit der pankreatischen Differenzierung verknüpft, wie die Expression von TGF- β 1 oder die Aktivierung des Hexosamin-Synthese Signalwegs. Es ist zu vermuten, dass durch eine Erhöhung des Glukose-Gehalts im Differenzierungsmedium, welcher über das doppelte der üblichen Konzentration hinausgeht, über diese Signalwege eine Zunahme des Anteils pankreatischer endokriner Vorläuferzellen erreicht werden kann.

Schweyen, Sandrina Maria: Einfluss von Nährstoffen auf die pankreatische Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen Halle (Saale), Martin-Luther-Universität, Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2014

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Pathogenese und klinische Bedeutung des Diabetes mellitus	1
1.2	Physiologie und Entwicklung des Pankreas <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	3
1.3	Embryonale Stammzellen	5
1.4	Einfluss metabolischer Faktoren auf die pankreatische Entwicklung	6
2	Zielstellung	7
3	Material und Methoden	9
3.1	Zellkultur	9
3.1.1	Zelllinien (Sox17-DsRed und CGR8)	9
3.1.2	Stammzellhaltung	10
3.2	Pankreatische Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen	12
3.2.1	Versuchsansatz	14
3.2.2	Einfluss von <i>small molecules</i> auf die Entstehung von definitivem Entoderm	15
3.2.3	Einfluss von niedrigen Glukose-Konzentrationen	16
3.2.4	Differenzierung zu pankreatischen endokrinen Vorläuferzellen.	17
3.2.5	Einfluss von <i>in vivo</i> physiologischen Glukose-Konzentrationen auf die pankreatische Differenzierung	18
3.2.6	Einfluss von hohen Glukose-Konzentrationen	19
3.3	mRNA-Analyse	21
3.3.1	RNA-Isolation	21
3.3.2	cDNA-Synthese	22
3.3.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
3.3.4	Gelelektrophorese	23
3.3.5	quantitative PCR (<i>real time</i>)	24
3.4	Immunzytochemischer Nachweis	25
4	Ergebnisse	27
4.1	Erhöhung des Anteils an definitivem Entoderm am Modell der Sox17-DsRed	27
4.1.1	Charakterisierung der Sox17-DsRed	27
4.1.2	Einfluss der <i>small molecules</i> IDE1 und IDE2	28
4.2	Einfluss niedrigster Glukose-Konzentrationen auf die Entstehung von definitivem Entoderm	30
4.3	Differenzierung von CGR8-Zellen zu pankreatischen Vorläuferzellen	32
4.3.1	Morphologische Veränderungen im Verlauf der <i>in vitro</i> Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen	32
4.3.2	Vergleich der Zelllinien CGR8 und Sox17-DsRed bezüglich des Zeitpunktes der Entstehung von definitivem Entoderm	33

4.3.3	Einfluss von <i>in vivo</i> physiologischen Glukose-Konzentrationen auf die Entstehung pankreatischer Vorläufer	35
4.3.4	Detektion von Glukose-sensiblen Intervallen	39
4.3.5	Einfluss der Glukose-Konzentration auf die Differenzierung	46
5	Diskussion	55
6	Zusammenfassung	69
7	Literatur	71
8	Anhang	76
8.1	Kulturmedien	75
8.2	Primer und Antikörper	78
9	Thesen	80
10	Lebenslauf	
11	Selbstständigkeitserklärung	
12	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
13	Danksagung	

Abkürzungen

a	alpha
Abb.	Abbildung
Akt. A	Aktivin A
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
BSA	Bovines Serum Albumin
CDM	Chemisch definiertes Medium
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
C _T	<i>Cycle threshold</i>
Cxcr4	Chemokine receptor 4
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DE	Definitives Entoderm
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Diff.	Differenzierungsmedium
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	DesoxyRibonukleosid-Triphosphat
Ds	Dictosoma species
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EB	<i>Embryoid body</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ESC	Embryonale Stammzelle
FACS	<i>Fluorescence activated cellsorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FoxA2	<i>Forkhead box A2</i>
FoxO1	<i>Forkhead box O1</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GIP	<i>Glucose-dependent insulinotropic peptide</i>
GLP	<i>Glukagon-like Peptide</i>
Glc	Glukose
GMEM	Glasgow Minimum Essential Medium
HBP	<i>Hexoamin-Biosynthese-Pathway</i>
HCl	Salzsäure
Hnf4	<i>Hepatic nuclear factor 4</i>
ICM	Innere Zellmasse
IDE 1/2	<i>Inducer of definitive Endoderm 1/2</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
ILV	(-) Indolaktam V
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzelle
IRS-2	Insulin Rezeptor Substrat 2
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
ME	Mesentoderm
Meox1	<i>Mesenchyme homebox1</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MTG	Mercapto-1-Thioglycerol
NEAA	<i>Nonessential amino acid</i>

NeuroD1/6	<i>Neurogenic differentiation 1/6</i>
NEFA	Nicht veresterte Fettsäuren
Ngn3	Neurogenin 3
Nkx6.1	NK6 homeobox 1
NTP	Nukleosidtriphosphat
Pax6	<i>Paired box 6</i>
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pdx1	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
PE	Pankreatisches Entoderm
PF	<i>Primitive foregut</i>
PFA	Paraformaldehyd
PG	<i>Posterior gut</i>
PKC	Proteinkinase C
PP	Pankreatisches Polypeptid
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT PCR	<i>Reverse Transriptase Polymerase Chain Reaction</i> (quantitative Echtzeit-PCR)
SAPK2	<i>Stress Activated Protein Kinase 2</i>
SEM	Standardfehler
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
SMAD4	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
Sox7	<i>SRY-related HMG box 7</i>
Sox17	<i>SRY-related HMG box 17</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tetra-Aminoethylen
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris Buffered Saline</i> mit Tween
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TubV	Tubulin V

Einheiten

bp	Basenpaare
g	Gramm
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
min	Minute
M	Mol
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
pM	Pikomol
sec	Sekunde
h	Stunde
d	Tag
U	Unit

1 Einleitung

1.1 Pathogenese und klinische Bedeutung des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus, die sogenannte Zuckerkrankheit, gehört zu den großen Volkskrankheiten mit steigender Inzidenz. 2011 lebten weltweit 366 Millionen Menschen mit einem diagnostizierten Diabetes mellitus, weiteren 280 Millionen wird ein hohes Risiko, daran zu erkranken, zugeschrieben. Ohne weitere Interventionen wird ihre Anzahl nach Schätzungen der International Diabetes Federation (IDF) in den nächsten 20 Jahren auf 552 Millionen (plus 50,8 %) angewachsen sein (Hauner et al., 2012; Europe, 2009).

Über 90 Prozent der betroffenen Personen leiden an Typ 2 Diabetes; vom Typ 1 Diabetes sind fast 5 Prozent betroffen. Ein nur geringer Anteil wird allein durch genetische Defekte bedingt (Giani et al., 2004; Böhm et al., 2011; Hauner, 2013). Das Krankheitsbild des Diabetes mellitus umfasst eine Gruppe durch Hyperglykämie gekennzeichneter metabolischer Störungen. Nach den Kriterien der amerikanischen Diabetes-Gesellschaft (ADA) ist bei einem Nüchtern-Plasmaglukose-Spiegel über 6,1 mmol/l von einer gestörten Glukosetoleranz, und bei wiederholter Messung eines Spiegels über 7 mmol/l ein Diabetes mellitus zu diagnostizieren (Kerner et al., 2011; Herold, 2012).

Von der Ätiologie ausgehend wird zwischen vier Diabetes-Hauptformen unterschieden. Im Folgenden soll die Pathogenese der ersten zwei Typen dargestellt werden.

Der Typ 1 Diabetes mellitus ist Folge einer Autoimmunerkrankung, bei der es nach entzündlicher Infiltration der Inselzellen zur Bildung von Inselzellantikörpern kommt. Die konsekutive chronische Insulitis führt letztendlich zu einer unwiederbringlichen Zerstörung der Insulin produzierenden beta-Zellen und einem absoluten Insulinmangel (Spinass et al., 2001) (Abb. 1 A).

Ein heterogenes Krankheitsbild stellt der Typ 2 Diabetes mellitus dar. Hier spielen genetische Defekte der Insulinwirkung und Sekretion, in Verbindung mit erworbenen Faktoren wie Ernährungsverhalten, Bewegungsmangel und Adipositas, eine Rolle. All dies führt zu einer gestörten Glukose-Homöostase, zu peripherer Insulinresistenz und verminderter Glukosetoleranz (Hien et al., 2010). Nach jahrelanger Kompensation mündet der Teufelskreis aus Insulinresistenz bei Hyperglykämie und reaktiver Hyperinsulinämie in einem „Ausbrennen“ der Insulin produzierenden beta-Zellen; der Patient benötigt exogen zugeführtes Insulin (Abb. 1 B). Nach Schätzungen des Deutschen Diabetes-Zentrums wurden 2007 fast 2,3 Millionen Menschen in Deutschland mit Insulin behandelt. Von diesen waren drei Viertel älter als 60 Jahre. Hieraus ist zu schließen, dass jeder 20. Deutsche dieser Altersgruppe auf eine Insulinbehandlung angewiesen war - Tendenz steigend (Hauner et al., 2012). Da es sich um eine schleichende Krankheit mit wenig charakteristischen Symptomen handelt, wissen viele Betroffene zu Beginn nichts von ihrer Erkrankung.

Als Ursache der gesteigerten Morbidität und Mortalität zuckerkranker Menschen sind die Folgeerkrankungen der chronischen Hyperglykämie anzusehen. Durch eine Makroangiopathie treten vermehrt Myokardinfarkte, zerebrale Insulte und periphere arterielle Verschlusskrankheiten auf. Die Mikroangiopathie bedingt eine Schädigung der Retinae und Nieren. Auf weitere komplexe Syndrome (diabetische Neuropathie und Fußsyndrom, arterielle Hypertonie als Ausdruck einer gestörten Endothelfunktion, etc.) soll hier nur hingewiesen werden. Die Lebenserwartung betroffener Männer und Frauen ist mit 5,3 bzw. 6,4 Lebensjahren deutlich reduziert (Leitlinien der DDG, 2008).

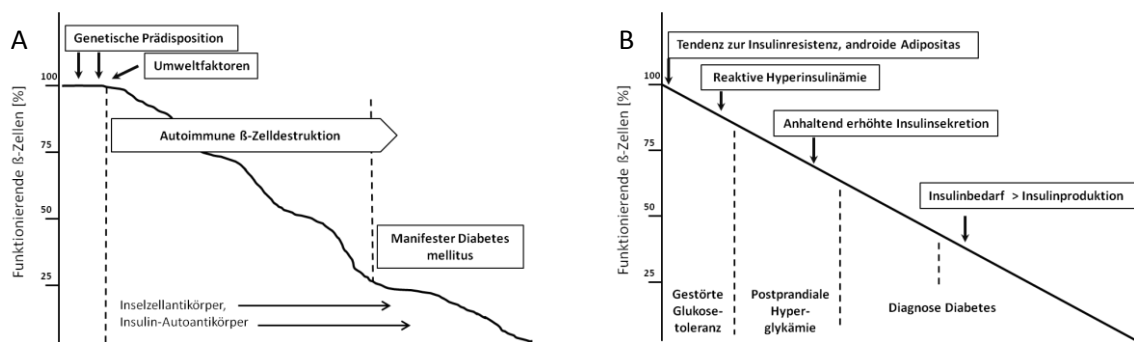


Abb. 1 Pathogenese der Entstehung des Diabetes Typ 1 (A) und Typ 2 (B). Der so genannte juvenile Typ 1 Diabetes mellitus entsteht infolge einer autoimmunen Zerstörung über eine kurze Zeitspanne. Diabetes Typ 2 entsteht meist im Rahmen eines metabolischen Syndroms und reaktiver Hyperinsulinämie über eine längere Zeit hinweg (nach Spinass et al., 2001; Hien et al., 2010).

Um das Fortschreiten der Folgeerkrankungen zu verlangsamen, ist eine optimale antihyperglykämische Therapie in Kombination mit einer Optimierung des begleitenden Hypertonus und der Dyslipoproteinämie essentiell (Gaede et al., 2003). Aufgrund der chronischen Progredienz ist die Therapie in Abhängigkeit zum jeweiligen pathophysiologischen Stadium zu modifizieren. Die Vermeidung unerwünschter Nebenwirkungen, wie schwerer Hypoglykämie und ausgeprägter Gewichtszunahme, ist hierbei wesentlich. Es stehen zur Therapie des Typ 2 Diabetes insulinotrope (Sulfonylharnstoffe, Glinide, GLP-1 Analoga, Dipeptidylinhibitoren) und nicht-insulinotrope Pharmaka (Insulinsensitizer [Metformin, Glitazone] und α -Glukosidaseinhibitoren) zu Verfügung, welche bei Therapieversagen mit Insulin kombiniert werden können (Herold, 2012).

Unter Insulingabe, welche bei Typ 1 Diabetes von Beginn an erforderlich wird, ist zwischen der konventionellen und intensivierten Insulintherapie zu unterscheiden. Die Nebenwirkungen ergeben sich im ersten Fall aus der unphysiologisch langen Halbwertszeit des substituierten Insulins (4 h) und der folgenden unterdrückten Glukagonsekretion: während der Essensaufnahme ist zu wenig Insulin in der Leber, später zirkuliert es zu lange. Schwankende Blutzuckerspiegel mit protrahierten Hypo- und Hyperglykämien gefährden den Patienten. Die normoglykämische Einstellung mit Hilfe der intensivierten Insulintherapie, die eine mehrmalige

Kontrolle des Blutzuckerspiegels erfordert, ist vor allem bei älteren und wenig complianten Patienten schwierig.

Die Herausforderung der Forschung liegt nun in der Entwicklung neuer, an Nebenwirkungen ärmeren Antidiabetika und einem besseren Verständnis der patientenspezifischen Pathogenese und Medikamentenwirkung. Ziel sind die Entwicklung patientenspezifischer Therapieansätze, um während des Verlaufs der Erkrankung gezielt intervenieren und somit ihre gravierenden Folgen minimieren zu können.

1.2 Physiologie und Entwicklung des Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse, ein retroperitoneal im Oberbauch gelegenes, circa 80 g schweres Organ, unterteilt sich makroskopisch in Caput, Corpus und Cauda. Funktionell besitzt sie einen exokrinen und einen endokrinen Anteil. Ersterer bildet die Hauptmasse des Pankreas und sezerniert einen enzymreichen Verdauungssaft ins angrenzende Duodenum. Der Anteil des Inselorgans beträgt lediglich 2 % und setzt sich aus kleinen Gruppen endokriner Zellen (Langerhanssche Inseln) zusammen, welche zu 40-60 % aus Insulin produzierenden beta- und 30 % Glukagon sezernierenden alpha-Zellen bestehen. Diese beiden Hormone beeinflussen antagonistisch den Plasmaglukose-Spiegel. Weitere Zellen wie delta- (Somatostatin), PP- (pankreatisches Polypeptid) und epsilon-Zellen (Ghrelin) legen sich zusammen mit den alpha-Zellen mantelartig um die im Zentrum gelegenen beta-Zellen. Letztere sind innerhalb der Langerhansschen Insel gleichmäßig verteilt. Der wichtigste Reiz zur Ausschüttung von Insulin ist die Erhöhung des Blutglukosespiegels, aber auch die Auswirkungen von Parasympathikus, *Glucagon-like peptide* (GLP-1) und *Glucose-dependent insulinotropic peptide* (GIP) bewirken eine Senkung des Blutzuckers (Lüllmann-Rauch, 2009; Smith et al., 2012).

beta-Zelldifferenzierung *in vivo*

Die pankreatische Entwicklung geht zusammen mit den Anlagen von Thymus, Leber und Lunge vom definitiven Entoderm aus, welches während der Gastrulation eines der 3 Keimblätter ausmacht (Abb. 2). Es konnte gezeigt werden, dass aus einer gemeinsamen Vorläuferpopulation, dem Mesentoderm, Meso- und Entoderm entstehen (Borowiak, 2010). Das entstehende primitive Darmrohr wird hierbei durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktorvermittelten Signalwegen zwischen entodermalem Epithel und umgebenden Mesenchym geprägt (Zorn et al., 2009). Auch die später ausknospende ventrale und dorsale Pankreasanlage ist von Geweben mesodermalen Ursprungs umgeben (Aorta und Herz).

Die Entwicklung des endokrinen Pankreas ist gut erforscht. In der murinen Embryogenese erfolgt sie zweiphasig: zuerst wächst eine transiente Population Glukagon- und/oder Insuli-positiver Zellen zwischen E9.5 und E13.5. Keine dieser Zellen differenziert später zur reifen beta-Zelle aus (Herrera, 2000).

In der menschlichen Entwicklung gibt es diese klare Phasentrennung nicht, jedoch geht man auch hier von einer separaten Entwicklung der späteren beta-Zellen aus eigenen Vorläuferzellen aus. Studien zeigen Pdx1 (*pancreatic-duodenal box 1*) positive multipotente Vorläufer, aus welchen sich alle anderen Zelltypen entwickeln (Borowiak, 2010).

Aus der Abwesenheit von Pdx1 würde eine Aplasie des Pankreas resultieren (Stoffers et al., 1997). Die zunehmende Expression des Transkriptionsfaktors

Ngn3 (Neurogenin 3) weist auf die endokrine Entwicklung der Zellen hin (Smith et al., 2004). Exogenes Ngn3 führt zur Umwandlung von endokrinen Vorläuferzellen zu Inselzellen. Es ist bekannt, dass Ngn3 auch in späteren Stadien der pankreatischen Entwicklung eine Vielzahl von Genen kontrolliert. Wenn auch heute noch nicht alle Prozesse verstanden sind, so ist doch seine essentielle Bedeutung für die Reifung und Erhaltung der adulten Inselzelle bekannt (Borowiak, 2010).

beta-Zelldifferenzierung *in vitro*

Pankreatische beta-Zellen sind hochspezialisiert und haben selbst *in natura* nur eine sehr geringe Proliferationsrate, so dass sich eine Kultur äußerst schwierig gestaltet. Die Erforschung der Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu beta-Zellen schreitet stetig fort. In mehreren Schritten wird hierbei die pankreatische Entwicklung *in vitro* herbeigeführt. Um eine beta-Zelle aus einer embryonalen Stammzelle zu differenzieren, ist es notwendig, den natürlichen Entwicklungspfad *in vitro* nachzuvollziehen. Verschiedene Signalwege werden über Retinsäure, FGF (*fibroblast growth factor*), Wnt, Hedgehog und Aktivin beschriftet (D'Amour et al., 2006; Borowiak, 2010). Mit Hilfe einer Kultur in 3D-Aggregaten wird die spontane

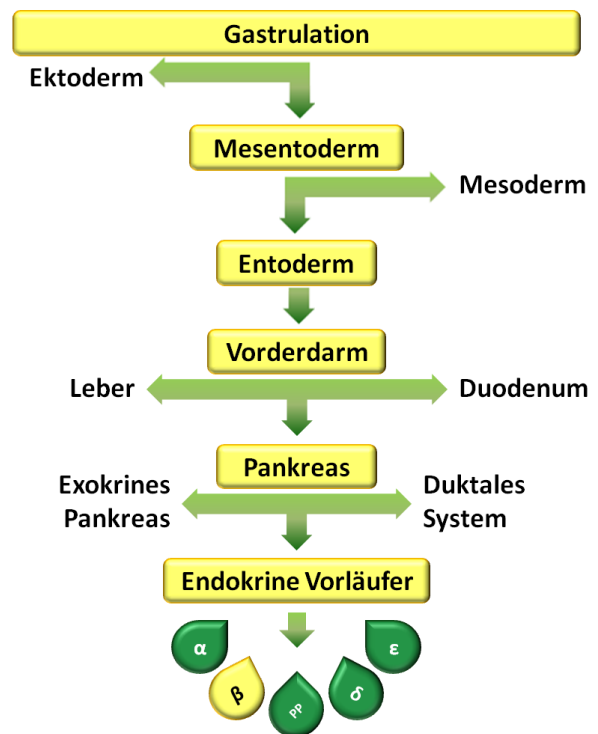


Abb. 2 Entwicklungsverlauf *in vivo* während der Gastrulation. Aus einer gemeinsamen Vorläuferpopulation bilden sich Zellen des primitiven Darmrohrs. Das spätere Pankreas hat seinen Ursprung in den Zellen des Vorderdarms und setzt sich aus exo-, endokrinen und duktalem Anteil zusammen.

Differenzierung in die 3 Keimblätter angeregt. Die Ausbeute an definitivem Entoderm kann über Aktivierung des Aktin/Nodal- Signalweges signifikant erhöht werden (Schroeder et al., 2011). Durch sequentielle Zugabe spezifischer Wachstumsfaktoren können weitere Signalkaskaden moduliert und eine Vermehrung und Differenzierung des definitiven Entoderm bis hin zu pankreatischen (Pdx1-positiven) und endokrinen (Ngn3-positiven) Vorläuferzellen erzielt werden. Durch Analyse spezifischer Transkriptionsfaktoren kann hierbei der Differenzierungsfortschritt nachvollzogen werden (Abb. 3).

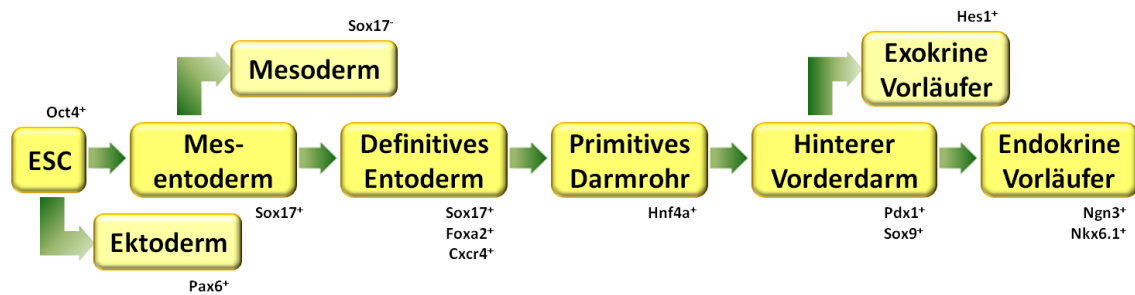


Abb. 3 Darstellung der Differenzierung von embryonalen Stammzellen (ESC) zu endokrinen Vorläuferzellen *in vitro*. Jedes Entwicklungsstadium weist hierbei typische Expressionsmuster auf.

Wenn auch die ersten Schritte eine hohe Ausbeute an definitivem Entoderm ergeben (Effizienz bis 80 %), so ist das Problem aktueller Protokolle die letztendlich sehr niedrige Population Insulin-positiver Zellen, welche zudem nur wenig Insulin oder beide Hormone (Insulin und Glukagon) exprimieren und keine physiologische Glukosesensibilität aufweisen (D'Amour et al., 2006).

1.3 Embryonale Stammzellen

Das Problem des absoluten Insulinmangels des Typ 1- und letztendlich auch des Typ 2-Diabetikers ist, abgesehen von der Substitution des Hormons momentan nur mittels Transplantation von Pankreata toter Spender, mitsamt aller Nebenwirkungen einer anschließenden immunsuppressiven Therapie, zu lösen. Zur Umgehung der Problematik fehlender Spender und gravierender pharmakologischer Nebenwirkungen würde sich eine Therapie mit in die pankreatische Linie ausdifferenzierten embryonalen Stammzellen anbieten (Van Hoof et al., 2009).

Man unterscheidet zwischen adulten und embryonalen Stammzellen. Erstere sind beispielsweise in Knochenmark, Haut oder Leber zu finden. Sie zeichnen sich durch ein geringeres Regenerations- und ein auf ein Keimblatt eingeschränktes Differenzierungspotential aus. Die Fähigkeit zur Transdifferenzierung (Keimblatt überschreitende Differenzierung) wurde zwar beschrieben, ist aber umstritten (Koestenbauer et al., 2006).

Embryonale Stammzellen (ESC) sind dadurch charakterisiert, dass sie sich unbegrenzt teilen und in jede der über 200 verschiedenen Zelltypen eines adulten Säugetiers differenzieren

können. *In vivo* wie *in vitro* sind sie fähig, sich in alle 3 Keimblätter auszudifferenzieren (Groebner et al., 2006). Gewonnen werden die pluripotenten Zellen aus der inneren Zellmasse (ICM) von Blastozysten. Vorausgesetzt, man kann unter entsprechender Kultur eine uniforme Population gewährleisten, sind die ESC für therapeutische Zwecke in ausreichendem Maße nutzbar (Borowiak, 2010).

Ethisch betrachtet ist jedoch die Verwendung menschlicher Embryonen für Forschungszwecke problematisch. In Deutschland ist diese per Embryonenschutzgesetz nur in Ausnahmefällen geduldet. Große Hoffnungen liegen deshalb auf der Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC). Um an diese Zellen zu gelangen, werden somatische Zellen (beispielsweise Keratinozyten aus Haarwurzeln) in ein pluripotentes Stadium reprogrammiert und anschließend in die gewünschte neue Linie differenziert. Hinsichtlich einer späteren Transplantation haben jedoch alle diese Möglichkeiten ein weiteres, gemeinsames Problem: der Anteil an undifferenzierten Zellen, welcher im Empfängerorganismus weiterhin undifferenziert bleibt und proliferiert.

Somit ist im Hinblick auf all diese Ansätze des Problems fehlender beta-Zellen zu konstatieren, dass jeder Einzelne seine Vorteile und Schwächen besitzt – auf allen Feldern jedoch noch großer Forschungsbedarf besteht.

1.4 Einfluss metabolischer Faktoren auf die pankreatische Entwicklung

Ein Schwachpunkt geläufiger Differenzierungsprotokolle ist ihre geringe Differenzierungseffizienz: die Ausbeute reifer Insulin-produzierender beta-Zellen ist für therapeutische Zwecke zu spärlich. Bis dato fand bei allen Optimierungsversuchen die Analyse des Nährstoffgehaltes der Umgebung und seine Beeinflussung der kultivierten und sich differenzierten ES-Zellen jedoch nur wenig Beachtung. Die Bedeutung der Nährstoffzufuhr während der embryonalen und fetalen Entwicklung ist seit langem durch Studien am Tiermodell bekannt. Hier kam es durch eine intrauterine Unterernährung des Fetus im Rahmen der konsekutiven Wachstumsretardierung auch zu einer Verringerung der Anzahl pankreatischer beta-Zellen (Inoue et al., 2009).

Macfarlane et al. inkubierten 1999 humane Inselzellen in Medien mit geringen (3 mM) und hohen (16 mM) Glukose-Konzentrationen und konnten zeigen, dass Glukose die Insulin-Gen-Promotor-Aktivität und Kerntranslokation von Pdx1 reguliert (Macfarlane et al., 1999). Unter niedrigem Glukosegehalt verblieb Pdx1 inaktiv im Zytoplasma, während es bei hohen Konzentrationen aktiviert wurde und mittels des SAPK2-Signalwegs in den Zellkern translozierte. Auch direkte Effekte von Glukose auf Pdx1-positive pankreatische Vorläuferzellen wurden am Rattenmodell beschrieben (Guillemain et al., 2007). Hierbei zeigte sich lediglich die endokrine Entwicklung des embryonalen Gewebes Glukose-abhängig, nicht aber die der exokrinen Azini des Pankreas. Glukose modifizierte die endokrine Entwicklung

jedoch nicht direkt über die Stimulation von Ngn3, dem frühesten Marker endokriner Vorläuferzellen, sondern regulierte die Expression von NeuroD, einem *Downstream*-Gen des Ngn3. Nach Gabe anderer Monomere, wie Xylose oder Fruktose, konnte keine Erhöhung des Insulin-Gens detektiert werden. In Abwesenheit von Glukose beobachtete man eine reversible Entwicklungsverzögerung, die jedoch nicht durch „Stress“ aufgrund eines Mangels an ATP erklärt werden konnte, da Glukose per se keinen Einfluss auf den sich entwickelnden Pankreas hat. Auf adulte Zellen wirkt Glukose proliferativ – so führt beispielsweise feine Aktivierung des beta-Zell-Insulin-Rezeptor/Insulin-Rezeptor-Substrat-2 (IRS-2)-Signalwegs durch anschließend sezerniertes Insulin zu einer Hemmung des Pdx1-Repressors FoxO1 (Okada et al., 2007).

Von Aminosäuren ist bekannt, dass sie die Insulin-Sekretion fördern. Über mitochondrial generiertes ATP, welches als Sensor von Kalzium-Kanälen dient, wird die Exozytose von Insulin erhöht. Von Glutamat ist zudem bekannt, dass es auch direkt die Pdx1-Expression der beta-Zelle stimuliert (Newsholme et al., 2007).

In Abhängigkeit von ihrer Expositionsdauer zeigen nicht-veresterte Fettsäuren (NEFAs) sowohl stimulierende als auch schädliche Effekte auf beta-Zellen (Keane et al., 2008). Einzelne Fettsäuren wie die Arachidonsäure werden allerdings über einen längeren Zeitraum toleriert und induzieren die Sekretion von Insulin und Proliferation der beta-Zellmasse (Nolan et al., 2006).

In dieser Arbeit wird im Folgenden vor allem der Einfluss von Glukose auf die pankreatische Differenzierung untersucht.

2 Zielstellung

Im Hinblick auf die weltweit steigende Inzidenz der an Diabetes mellitus und an seinen Folgeerkrankungen leidenden Menschen liegt die Herausforderung der Forschung darin, Möglichkeiten zu generieren, die eine physiologische Einstellung des Blutzuckers betroffener Patienten ermöglichen. Bei vollständigem Verlust der Insulinproduktion ist derzeit lediglich eine symptomatische Therapie möglich – die Gabe von Insulin. Eine „Heilung“ ist nur durch Ersatz der verlorenen beta-Zellen möglich. Dies ist entweder durch Transplantation des vaskularisierten Organs oder über das assoziierte Inselzellprogramm möglich (Bundesärztekammer, 2013). Kriterium der Aufnahme in die Warteliste ist die Diabetes Typ 1 bedingte Niereninsuffizienz. In Deutschland wurden 2012 an 24 Kliniken 161 Pankreas-transplantationen durchgeführt, wobei die 5-Jahresfunktionsrate momentan bei 67 % liegt (DSO, 2013).

Die Verwendung von pankreatisch differenzierten embryonalen Stammzellen zielt auf ein besseres Verständnis der Pathogenese der Erkrankung sowie der Austestung der Wirkung eingesetzter Medikamente ab, um patientenspezifische Therapieansätze zu ermöglichen. Des

Weiteren könnten gewonnene beta-Zellen in ferner Zukunft auch als Transplantat den absoluten Insulinmangel beheben.

Derzeit werden diese Ziele jedoch von der geringen Anzahl gewonnener funktionaler Zellen behindert. Die Effizienz geläufiger Protokolle ist zum einen für therapeutische Zwecke nicht ausreichend, zum anderen stimmen die gewonnenen Inselzellen nicht in allen wichtigen Eigenschaften mit den originalen beta-Zellen überein (dies betrifft beispielsweise deren geringe Glukose-Sensibilität, nachgewiesenes Insulin wird nicht von differenzierten Zellen produziert oder die Differenzierung erfolgt über *in vivo* nicht existente Differenzierungsschritte (Chen et al., 2011)).

Ergo ist es notwendig, die bestehenden Protokolle zur Differenzierung nach dem Vorbild der Natur *in vitro* zu optimieren, um die gewonnene Menge an pankreatischen Vorläuferzellen und die sich daraus differenzierenden beta-Zellen zu erhöhen. Da die physiologische Entwicklung vom umgebenden Gewebe abhängt, ist eine Kokultur mit Endothelzellen anzustreben, denn die Interaktion zwischen Endothelzellen und pankreatischen Vorläufern erscheint für die erfolgreiche Differenzierung essentiell (Borowiak, 2010).

Während der fördernde Einfluss von sogenannten *small molecules* auf die pankreatische Differenzierung mehrfach beschrieben wurde (Borowiak et al., 2009), legte man bisher jedoch nur wenig Augenmerk auf die Bedeutung des Nährstoffgehaltes der Umgebung der sich differenzierenden Zellen.

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe muriner embryonaler Stammzellen den Einfluss von Nährstoffen auf die pankreatische Differenzierung zu evaluieren. Hieraus ergeben sich folgende Herausforderungen:

- 1) Möglichkeit der Erhöhung der Ausbeute an definitivem Entoderm durch Kombination der *small molecules* IDE1 und IDE2 mit dem etablierten Aktivin A
- 2) Etablierung eines geeigneten Protokolls für die murine embryonale Stammzelllinie CGR8 unter Vergleich mit ihrer modifizierten Schwesterlinie, den Sox17DsRed exprimierenden Stammzellen
- 3) Detektion des Einflusses von Glukose auf die Entstehung von pankreatischen Vorläuferzellen unter Behandlung der Zellen mit
 - unphysiologisch niedrigen Konzentrationen (0-2 mM)
 - *in vivo* vorkommenden Konzentrationen (5, 10 mM)
 - unphysiologisch hohen Konzentrationen (20, 30, 50 mM)
- 4) Förderung der Differenzierung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gabe oder des Entzugs von Glukose unter
 - Detektion sensibler Intervalle während des Differenzierungsprozesses
 - Wechsel der Glukose-Konzentrationen zwischen den Differenzierungsschritten

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Verbrauchsmaterialien und Instrumentarium

- Einmalpipetten 50 ml (Heinemann Labortechnik, Duderstadt, Deutschland)
- Glasfläschchen 5 ml (Heinemann Labortechnik)
- Glaspipetten 2, 10, 20 ml (Heinemann Labortechnik)
- Greiner bakteriologische Zellkulturschalen 6, 10 cm (Heinemann Labortechnik)
- Greiner Falcon Tubes 10, 15 ml (Heinemann Labortechnik)
- Nunc Kryoröhrchen 1,8 ml (Heinemann Labortechnik)
- Nunc Zellkulturschalen 6 cm (Heinemann Labortechnik)
- Spritzenfilter 0,22 µm, 26 mm CA-Membran (Heinemann Labortechnik)
- Vakuumfilter 150, 250 ml (TPP, Trasadingen, Schweiz)
- Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TS 100, Kamera Nikon Digital sight
- Inkubator: HERAcell 150 (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
- Neubauer Zählkammer (Brand GmbH & Co.KG, Gummersbach, Deutschland)
- Sterilbank HERAsafe (Heraeus Instruments)
- Zentrifuge Biofuge Stratos (Heraeus Instruments)

3.1.1 Zelllinien (CGR8 und Sox17-DsRed)

CGR8

Diese murinen embryonalen Stammzellen (Wildtyp, Karyotyp 40, XY) wurden aus der inneren Zellmasse 3,5 Tage alter männlicher Präimplantations-Embryonen isoliert (*Mus musculus*, Stamm 129). Aufgrund des pluripotenten Charakters der Zellen sind sie zur Differenzierung in alle 3 Keimblätter befähigt. Verhindert wurde während der *feeder*-freien Stammhaltung die Differenzierung durch die Zugabe von *Leukemia inhibitory factor* (LIF) (Nichols et al., 1990).

Sox17-DsRed

Durch eine homologe Rekombination von CGR8-Zellen mit dem Vektor „pSox17DsRed-ExpressNLS-IRES2-Puro3-Neo“ sind diese Zellen in der Lage, zusammen mit dem als Marker für das definitive Entoderm geltende Sox17 eine roten Farbstoff (DsRed) zu exprimieren, welcher nicht nur die mikroskopische Kontrolle, sondern auch eine FACS-Sortierung der Zellen erlaubt. Dank einer Puromycin-Resistenz können die transgenen Zellen in *feeder*-freier Kultur selektiert werden.

3.1.2 Stammzellhaltung

Materialien

- 0,02 % EDTA in PBS (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)
- 0,2 % Trypsin 1:250 in PBS (PAA, Pasching, Deutschland)
- *Alkaline Phosphatase Detektion Kit* (Millipore, Billarica, USA)
- *Aqua destillata*
- DMSO (Sigma-Aldrich)
- Dulbecco's PBS ohne Ca⁺ und Mg²⁺ (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Fetales Kälberserum (Lonza, Basel, Schweiz)
- G418 Sulfate, 300 mg/ml (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- *Gelatine, from porcine skin* (Sigma)
- Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) (Gibco, Carlsbad, California, USA)
- *Leukemia inhibitory factor* (LIF) 10⁷ U/ml (Millipore)
- L-Glutamin , 200 mM (PAA)
- Non-essential amino acids (NEAA), 100x (PAA)
- Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich)
- Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml), 100x (PAA)
- Sodium Pyruvat, 100 mM (PAA)
- β-Mercaptoethanol (Sigma)
- TBS-T (*Tris Buffered Saline Tween*)

Die murinen embryonalen Stammzellen wurden auf mit 0,5-1 % Gelatine-Lösung beschichteten Kulturschalen (6 cm) mit je 5 ml entsprechendem Medium (siehe Tab. 1 und 2) kultiviert. Essentiell ist bei beiden Zelllinien die Zugabe von LIF, einem Mitglied der Interleukin-6 Familie, welches über die STAT3-Signalkaskade wirkend die Pluripotenz der Stammzellen erhielt (Boeuf et al., 1997). Zur Kultur der Sox17-DsRed-Zellen war es außerdem notwendig dem Medium G418 (Geneticin) hinzuzufügen, welches dank einer konstitutiven Neomycin-Resistenz nur die Vektor tragenden Zellen selektierte.

Zellpassage

Um die Vermehrung von trotz der Zugabe von LIF differenzierten Zellen zu verhindern, war es notwendig, die Zellen alle 48 h zu passagieren, da erstere die häufige Passage nicht überleben. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellmorphologie wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimal mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (gemischt im Verhältnis 1:1) behandelt, welche im Anschluss sofort wieder entfernt wurde. Die sich vom Kulturschalenboden ablösenden Zellen wurden in 2 ml angewärmtem CGR8 oder Sox17-Medium aufgenommen und in eine neue mit 0,5 % Gelatine beschichtete und mit 3 ml Medium gefüllte Kulturschale (Nunc) überführt. Die Kultur der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und einem 5 %igen CO₂-Gehalt. Optimal waren bis zu 30 Passagen der Zellen möglich, ohne die Differenzierungseffizienz zu beeinflussen.

Kryokonservierung

Zur Erhaltung eines Vorrats an Stammzellen wurden niedrige (< 15) Passagen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Um eine Schädigung der Zellen durch Eiskristalle zu vermeiden, war dabei eine Überführung in ein spezielles Kryomedium notwendig.

Medium:

- 72 % Kulturmedium (nicht vorgewärmt)
- 20 % FCS
- 8 % DMSO

Pro Kryoröhrchen wurde eine vollständig bewachsene Kulturschale verwendet. Die Stammzellen wurden, analog zur Passage, mit Trypsin-EDTA abgelöst und in 2 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon Tube überführt und 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Nach Absaugung des Überstandes wurde das Zellpellet im Kryomedium (s. oben) gelöst und bei -80 °C in speziellen mit Isopropanol gefüllten Einfrierboxen eingefroren. Nach 24 h konnten die Zellen in flüssigem Stickstoff zur Langzeitkonservierung einlagert werden.

Zum Auftauen einer Passage wurde das Kulturmedium im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und 3 ml in eine mit 0,5 % Gelatine beschichteten Kulturschale (Durchmesser 6 cm) gegeben. Nun wurde das Kryoröhrchen mit den gefrorenen Zellen zügig im Wasserbad aufgetaut. Ein schnelles Vorgehen war dabei wichtig, da die hohe DMSO-Konzentration des Kryomediums auf Dauer zytotoxisch wirkt. Nach Überführung in ein Falcon Tube mit 4 ml Kulturmedium wurde der zellschädigende Effekt durch das enthaltende FCS gemildert. Die Zellen wurden nun bei 200 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mittels 2 ml Kulturmedium in die Kulturschale befördert. Die Kultur erfolgte unter oben genannten Bedingungen. Die Vitalität der Zellen wurde am folgenden Tag mikroskopisch kontrolliert.

Kontrolle von Pluripotenz und Stammzellcharakter

Ein Merkmal pluripotenter Zellen ist die Aktivität von alkalischen Phosphatasen (AP). Diese Enzyme bewirken eine Dephosphorylierung verschiedener Moleküle (O'Connor et al., 2008). Während der Nachweisreaktion wird eine Naphtolverbindung durch die AP dephosphoryliert. Das Produkt der Reaktion wird durch Bindung an ein Chromogen sichtbar gemacht.

Färbelösung (Reagenz 1: Reagenz 2: Aqua dest. = 2:1:1):

- Reagenz 1, Fast Red Violet (0,8 g/l Stammlösung, gebrauchsfertig)
- Reagenz 2, Naphtol AS-BI Phosphate (4 mg/ml Stammlösung in AMPD-Puffer (2 mol/l), pH 9,5, gebrauchsfertig)

Zur Herstellung des Präparats wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml einer 4 %igen PFA-Lösung (0,4 g PFA in 10 ml bei 80 °C auf heizbarem Magnetrührer lösen und

anschließend auf Eis kühlen) für 1-2 min fixiert. Hiernach wurde die Fixierlösung entfernt und die Kulturschale mit 2 ml TBS-T (Lösung aus 20 mM Tris-HCL und 0,15 M NaCl (pH 7,4) sowie 0,05 % TWEEN-20) zügig gespült. Ein Austrocknen des Präparates musste vermieden werden, da es sonst untauglich geworden wäre. Nun wurde das Präparat mit 2 ml der Färbelösung für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Färbelösung wurde abermals mit 2 ml Waschpuffer gespült und die Zellen mit 2 ml PBS feucht gehalten. Die nun rotgefärbten Stammzellen konnten lichtmikroskopisch begutachtet werden.

3.2 Pankreatische Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen

Materialien:

- (-) Indolaktam V, 1 mM (Alexis Biochemicals, San Diego, California, USA)
- Aktivin A, 0,5 mg/ml (Prepro Tech GmbH, Hamburg, Deutschland)
- B27 Supplement, 50x (Life Technologies, Carlsbad, California)
- *Chemically Defined Lipid Concentrate*, 100x (Life Technologies)
- D-Glukose in PBS, 1M (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) w/o Glukose, 1x (PAA)
- Dulbecco's PBS ohne Ca⁺ und Mg²⁺ (Biochrom AG)
- F12 *Nutrient Mixture* (Ham), 1x (PAA)
- Fetales Kälberserum (Lonza)
- *Human Insulin solution*, 10mg/ml (Sigma)
- IDE1 5 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)
- IDE2 5 µg/ml (Santa Cruz)
- Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), 1x (PAA)
- KAAD-Cyclopamin, 200 µg/ml (Merck)
- L-Glutamin , 200 mM (PAA)
- LIF (ESGRO) 2,4x10⁶ U/mg (Milteny Biotec GmbH, Bergisch-Glattbach, Deutschland)
- MTG, 150 mM (Sigma-Aldrich)
- *Non-essential amino acids* 100x (PAA)
- Panexin NTS (Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10mg/ml), 100x (PAA)
- Transferrin, 30 mg/ml in IMDM (Roche, Berlin, Deutschland)

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei Endpunkte der Differenzierung unter Verwendung zweier Zelllinien gewählt. Zum einen wurde die Optimierung der Gewinnung von definitivem Entoderm anhand der Sox17-DsRed-Zellen angestrebt. Hierbei wurde der Einfluss von so genannten *small molecules* (Chen et al., 2009) auf die Entstehung definitiven Entoderms und der Einfluss von niedrigsten Glukose-Konzentrationen auf die weitere Entwicklung untersucht. Zum anderen wurden CGR8-Zellen zu pankreatischen endokrinen Vorläuferzellen nach einem modifizierten Protokoll von (Chen et al., 2009) differenziert und die Effekte von sehr hohen Glukose-Konzentrationen und dem Zeitpunkt ihrer Gabe ausgetestet.

Um die *in vivo* ablaufenden Entwicklungsvorgänge während der Embryogenese *in vitro* nachzustellen, wurde das Modell des *hanging-drop* während der ersten Differenzierungsstages angewendet. Hierbei bilden sich alle 3 Keimblätter in einer der Blastozyste ähnlichen Struktur, welche *Embryoid Body* (EB) genannt wird (Abb. 4).

Da das Pankreas entodermalen Ursprungs ist, wurde während dieser ersten Differenzierungsstufe Aktivin A dem Differenzierungsmedium hinzugefügt (Sulzbacher et al., 2009). Während der Gastrulation *in vivo* entsteht das definitive Entoderm (DE) aus einem Vorläufer namens Mesentoderm (ME). Eine zentrale Stellung hat während der folgenden Entwicklung zu definitivem Entoderm Nodal, ein Mitglied der *Transforming growth factor* (TGF)- β Superfamilie (Tam et al., 2003). Aktivin A imitiert seine Wirkung durch Interaktion mit zwei transmembranen Rezeptoren, welche letztendlich zur Translokation von SMAD4 in den Zellkern führt. Hierdurch wird nach Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener Gene gewährleistet (Chen et al., 2006).

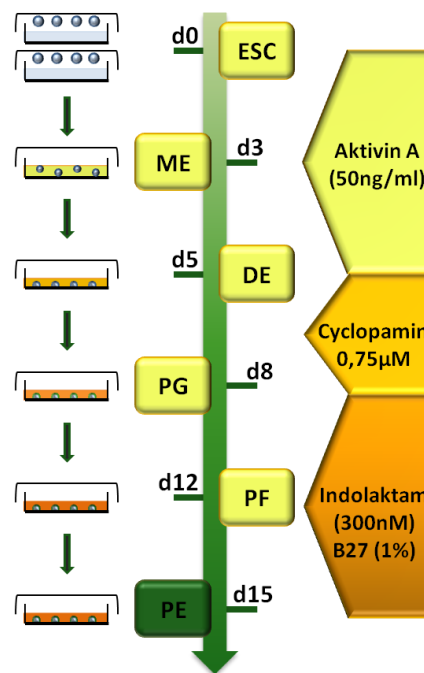


Abb. 4 Differenzierungsprotokoll der murinen embryonalen Stammzelllinie CGR8. Differenzierung der Stammzellen über einen *hanging-drop*-Ansatz und Akt. A zu definitivem Entoderm, später Selektion pankreatischer Vorläuferzellen durch Cyclopamin und Indolaktam. ESC: embryonale Stammzelle, ME: Mesentoderm, DE: definitives Entoderm, PF: primitiver Darm, PG: hinteres Darmrohr, PE: pankreatisches Entoderm.

Da neben der Induktion von entodermalen auch die Entstehung von neuronalen Strukturen gefördert wird (Shi et al., 2005), ist zur weiteren Differenzierung die anschließende Gabe von KAAD-Cyclopamin essentiell. Dieses Steroidalkaloid ist Antagonist des *Sonic hedgehog*, welches über seine Zielstruktur *Smoothed* stark in die Entwicklung neuronaler Strukturen

involviert ist. Zudem kommt es später in hohem Maße in Duodenum und Magen vor (Kim et al., 1998). Nach Selektion von entodermalen Zellen wurde nun die Differenzierung von pankreatischen Vorläuferzellen möglich. Als letzter Differenzierungsschritt wurde Indolaktam V (ILV) zu den Zellen gegeben. Dieses *small molecule* aktiviert die Proteinkinase C (PKC) welche über eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen verschiedene zelluläre Prozesse einschließlich Differenzierung, Proliferation und Apoptose reguliert, sowie den Anteil an Pdx1-positiven pankreatischen Vorläuferzellen erhöht (Chen et al., 2009).

3.2.1 Versuchsansatz

Zu Versuchsbeginn an Tag 0 wurden unbeschichtete Kulturschalen (10 cm) mit je 10 ml PBS gefüllt, um ein Austrocknen der *hanging-drops* zu verhindern. Die benötigten Medien für die gerichtete und spontane (Kontrolle) Differenzierung wurden gemäß den Angaben für chemisch definiertes Medium (CDM, Tab. 3) und Differenzierungsmedium 1 (Diff. I, Tab. 4) hergestellt. Für die erforderliche MTG-Konzentration wurden 26 µl MTG in 2 ml Ham's F12 gelöst und steril filtriert. Die embryonalen Stammzellen wurden nun mittels Trypsin/EDTA-Lösung, analog der Passage, aus den Kulturschalen gelöst, die Zelllösung in ein Falcon-Tube überführt und bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in einer Waschlösung aus IMDM/F12 1:1 resuspendiert und abermals zentrifugiert, um die Rückstände des Stammzellmediums zu entfernen. Nach erneuter Resuspension in 10 ml IMDM/F12 wurde die Zellzahl der Lösung mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\sum \text{Zellen aller 4 Quadrate}}{4} \times 10.000$$

Erst jetzt gaben wir die entsprechende Menge Aktivin A (50 ng/ml) zum CDM hinzu. Ein 20 µl Tropfen sollte 600 Zellen enthalten, folglich wurden auf 5 ml Medium 150.000 Zellen pro steriles Glasfläschchen gegeben. Ein Fläschchen reichte hierbei für 6 Kulturschalen à 40 Tropfen CDM und 3 Kulturschalen à 80 Tropfen Diff.1 (der hohe FCS-Anteil erhöhte die Oberflächenspannung und erlaubte mehr Tropfen pro Platte). Die Tropfen wurden auf der Innenseite des Kulturschalendeckels positioniert, welcher anschließend vorsichtig gewendet und auf den mit PBS gefüllten Boden gesetzt wurde. Die Kultur erfolgte nun erschütterungsfrei für 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Zellen sammelten sich entsprechend der Schwerkraft im Konus des Tropfens und bildeten dort die EBs.

An Tag 3 wurden die entstandenen EBs abgespült, 3:1 gepoolt und in Suspensionskultur überführt. Hierzu wurde neues Differenzierungsmedium (CDM und Diff. I) hergestellt und je 3 ml in eine unbeschichtete, bakteriologische Kulturschale (Durchmesser 6 cm) gegeben. Die Suspensionskultur erfolgte bei CGR8-Zellen bis Tag 5, bei Sox17-DsRed-Zellen bis Tag 9.

An Tag 5 und 9 wurden die Kulturschalen mit gerichtet differenzierten EBs 3:1, die mit spontan differenzierten EBs 1:1 auf mit 0,1 % Gelatine beschichteten Kulturschalen ausgesät. Für

spätere Immunfluoreszenzproben wurden Deckgläschen vor der Gelatinebeschichtung auf dem Schalenboden platziert. Das zum Anwachsen benötigte Medium war für beide Gruppen Diff.I. 24 h später, nach dem Anwachsen der EBs auf dem Schalenboden, erfolgte ein Mediumwechsel. Dabei wurden die gerichtet differenzierten Zellen mit Differenzierungsmedium 2 (Diff. II, Tab. 5) und 0,75 μM Cyclopamin behandelt. Die Kontrollgruppe wuchs weiterhin in Diff.1. Nach 2 Tagen endete die Differenzierung der Sox17-DsRed.

Zur Gewinnung pankreatischer Vorläuferzellen wurde den gerichtet differenzierenden CGR8-Zellen an Tag 8 Diff. II mit 300 nm ILV und 1% B27 zugefügt. An Tag 12 erfolgt ein letzter Mediumwechsel mit Diff. II und 1 % B27. Versuchsende war an Tag 15. Jeder Versuch wurde dreimal unter denselben Bedingungen durchgeführt.

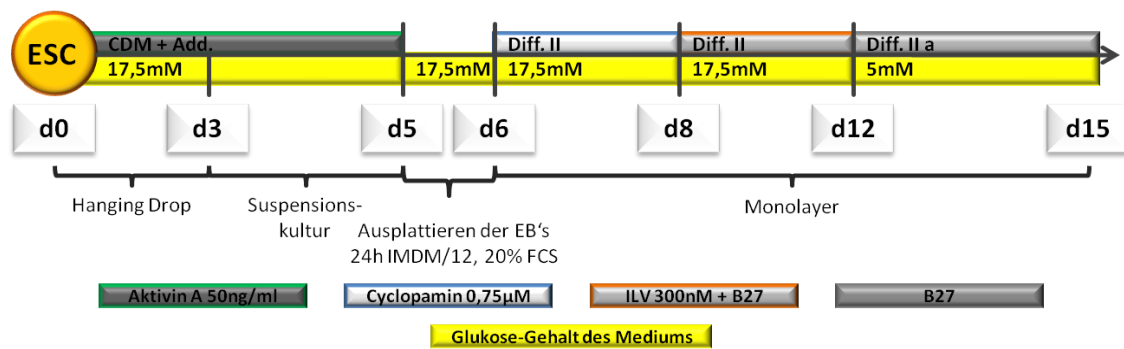


Abb. 5 Pankreatische Differenzierung von CGR8-Zellen. Der Glukosegehalt des Mediums beträgt stets 17,5 mM. Probenentnahme an Tag (d) 0, d3, d5, d8, d12 und d15. Abkürzungen s. Text.

3.2.2 Einfluss von *small molecules* auf die Entstehung von definitivem Entoderm

In vitro führen die Mitglieder der TGF- β Superfamilie Nodal und Aktivin A in murinen wie humanen embryonalen Stammzellen zu einer bevorzugten Differenzierung in die pankreatische Linie. Die *inducer of definitive endoderm* (IDE) 1 (2-[(6-carboxy-hexanoyl)-hydrazolmethyl]-benzoic acid) und IDE 2 (7-(2-cyclopentylidenehydrazino)-7-oxoheptanoic acid) sind *de novo* synthetisierte Chemikalien, welche als Agonisten des Aktivin A/Nodal-Signalwegs wirken (Borowiak et al., 2009). Ziel des folgenden Versuches war es, den Anteil an definitivem Entoderm durch Zugabe von IDE1 und/oder IDE2 zusätzlich zu dem bewährten Aktivin A zu erhöhen (Sulzbacher et al., 2009).

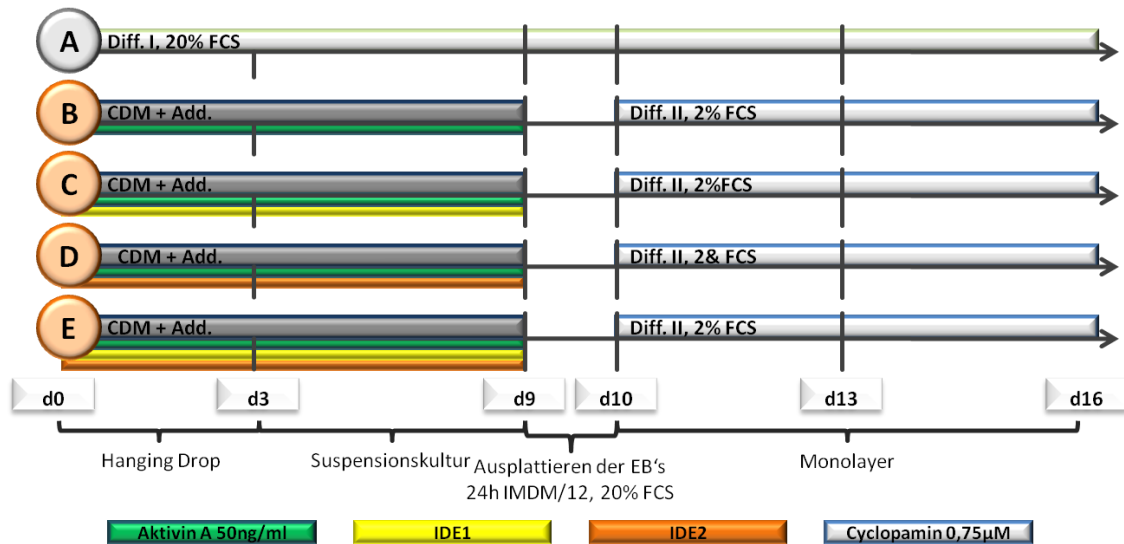


Abb. 6 Differenzierungsprotokoll Sox17-DsRed unter Aktivin A und small molecules, (A) Spontane Differenzierung (Kontrolle), (B) CDM + Aktivin A, (C) CDM + IDE1, (D) CDM + IDE2. (E) CDM + IDE1+ IDE2. Kontrolle auf DsRed an Tag (d) 9, Probenentnahme an d0, d9, d13, d16.

Sox17-DsRed-Zellen wurden wie oben beschrieben zum Versuchsansatz verwendet. Die Zellen wurden von Tag 0 bis 9 in CDM unter Zusatz von 50 ng/ml Aktivin A (vgl. Abb. 6 B), Aktivin A und 5 µM/ml IDE1 (vgl. Abb. 6 C), Aktivin A und 5 µM/ml IDE2 (vgl. Abb. 6 D) sowie allen 3 Zusätzen (vgl. Abb. 6 E) kultiviert. An Tag 9 erfolgte die fluoreszenzgestützte mikroskopische Kontrolle auf DsRed, welches das Vorhandensein von definitivem Entoderm anzeigt. Anschließend wurden die EBs ausplattiert und 24 h später gemäß dem Differenzierungsprotokoll weiterkultiviert.

3.2.3 Einfluss von niedrigen Glukose-Konzentrationen auf die weitere Differenzierung

In der Literatur wurde eine Verlangsamung der Differenzierung durch niedrige Glukose-Konzentrationen beschrieben (Guillemain et al., 2007). Ziel dieses Versuches war der Nachweis des Einflusses von niedrigsten (0-1 mM) Glukose-Konzentrationen auf entstandenes definitives Entoderm.

Der Versuchsansatz erfolgte abermals unter Nutzung der Sox17-DsRed. Nach Gewinnung einer ausreichenden Menge definitiven Entoderms wurden die DsRed-positiven EBs gemäß oben beschriebenem Protokoll ausplattiert. Vierundzwanzig h später werden die angewachsenen Zellen unter Glukosemangel (Abb. 7 B), 0,5 mM Glukose (Abb. 7 C) und 1 mM Glukose (Abb. 7 D) in Differenzierungsmedium Iia (Tab. 6) und 0,75 µM Cyclopamin bis Tag 16 kultiviert. Die Zellmorphologie der EBs wurde während des gesamten Differenzierungsprozesses täglich mikroskopisch verfolgt.

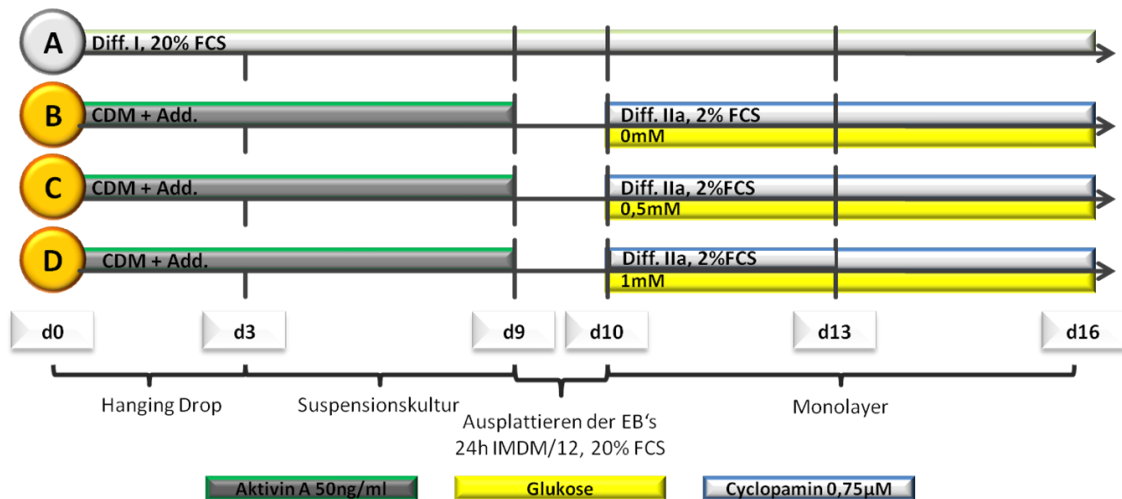


Abb. 7 Differenzierungsprotokoll von Sox17-DsRed unter Glukoseentzug. Sox17-DsRed wurden ab Tag (d) 10 unter (B) 0 mM, (C) 0,5 mM und (D) 1 mM Glukose kultiviert; (A) spontane Differenzierung (Abkürzungen s. Text).

3.2.4 Differenzierung von CGR8-Zellen zu pankreatischen endokrinen Vorläuferzellen

Anhand der Sox17-DsRed-Zellen wurde ein Modell zur Gewinnung von definitivem Entoderm etabliert; der Erfolg der Differenzierung konnte fluoreszenzmikroskopisch einfach nachgewiesen werden. Zur Differenzierung pankreatischer Vorläuferzellen wurde ein nach Chen et al. modifiziertes Differenzierungsprotokoll verwendet und die unveränderte Schwesterlinie der Sox17-DsRed, die CGR8-Zellen, als Modellsystem gewählt (Chen et al., 2009).

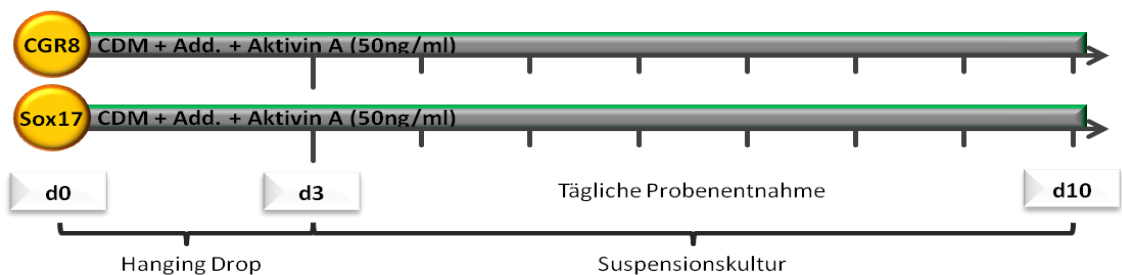


Abb. 8 Differenzierungsprotokoll muriner ESC (CGR8 und Sox17-DsRed) unter Gabe von Aktivin A. Verglichen wurde das Differenzierungsverhalten der beiden Zelllinien. RNA-Probenentnahme an Tag (d) 0, d 4-10 sowie tägliche lichtmikroskopische Kontrolle.

Um Unterschiede in der Differenzierungsgeschwindigkeit festzustellen, wurden ESCs beider Linien mit CDM und 50 ng/ml Aktivin A im *hanging-drop* zu EBs formiert und an Tag 3 in Suspensionskultur überführt. Tägliche Probenentnahmen wurden durchgeführt, um in RT- und *realtime* PCR den Anstieg des Markers für definitives Entoderm, Sox17, zu detektieren.

3.2.5 Einfluss von physiologischen Glukose-Konzentrationen auf die pankreatische Entwicklung

Guillemain et al. verwiesen in ihrer Publikation 2007 auf eine optimale Konzentration von 5-10 mM Glukose im Kulturmedium, um eine ausreichend hohe Menge pankreatischer Vorläuferzellen zu erreichen (Guillemain et al., 2007). Die beschriebenen Experimente wurden an explantierten, sich differenzierenden embryonalen Ratten-Pankreata durchgeführt. In den folgenden Experimenten wurden CGR8-Zellen gemäß dem in Abb. 9 gezeigten Protokoll differenziert und mit 5 und 10 mM Glukose von Tag 0-12 und Tag 3-8 konfrontiert. Die Wahl dieser zwei Konzentrationen wurde zum einen in Anlehnung an die Versuche der Arbeitsgruppe um Guillemain gewählt, welche ein Differenzierungsoptimum bei 5 und 10 mM beschrieb. Zum anderen liegen die physiologische Glukosekonzentration eines erwachsenen Menschen bei 5 mmol/l und die maximale Rückresorptionskapazität der menschlichen Niere (sogenannte Nierenschwelle) für Glukose bei 10 mmol/l, so dass die folgenden Versuche auch ihren Vergleich mit den *in vivo* vorliegenden Bedingungen suchten.

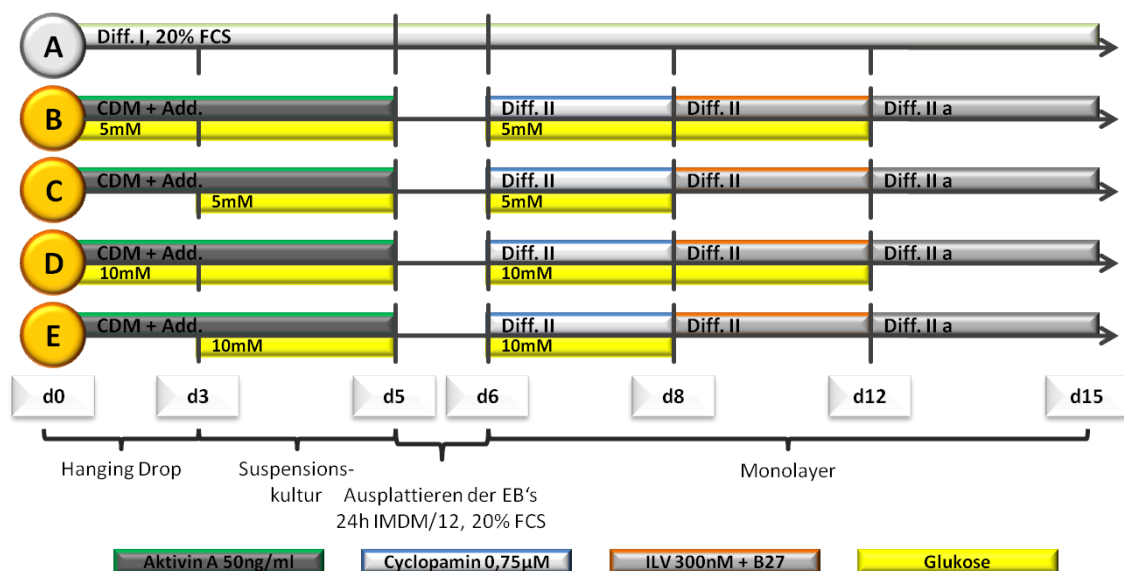


Abb. 9 Differenzierungsprotokoll von unter niedriger Glukose differenzierten CGR8-Zellen. CGR8 wurden gerichtet unter 5 mM (B, C) und 10 mM (D, E) Glukose von Tag (d) 0-12 (B, D) bzw. d3-8 (C, E) kultiviert, (A) spontane Differenzierung. Probenentnahme für RNA an d0, d3, d5, d8, d12, d15. Abkürzungen s. Text.

Die Gabe zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten zielte hierbei auf die Detektion sensibler Intervalle während der Differenzierung ab.

3.2.6 Einfluss von hohen Glukose-Konzentrationen auf die pankreatische Differenzierung und Detektion sensibler Intervalle

In der Literatur wurde der positive Einfluss von Glukose auf die Entstehung Pdx1-positiver pankreatischer Vorläuferzellen beschrieben (Macfarlane et al., 1999).

Zur Austestung des Einflusses von sehr hohen Glukose-Konzentrationen zu bestimmten Zeitpunkten auf die Differenzierung von CGR8-Zellen in die pankreatische Linie wurde anfangs eine Konzentration von 50 mM gewählt. Um sensible Intervalle nachzuweisen, wurden die nach oben genannten Differenzierungsprotokoll für CGR8 differenzierenden Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien mit dieser Konzentration behandelt (vgl. Abb. 10).

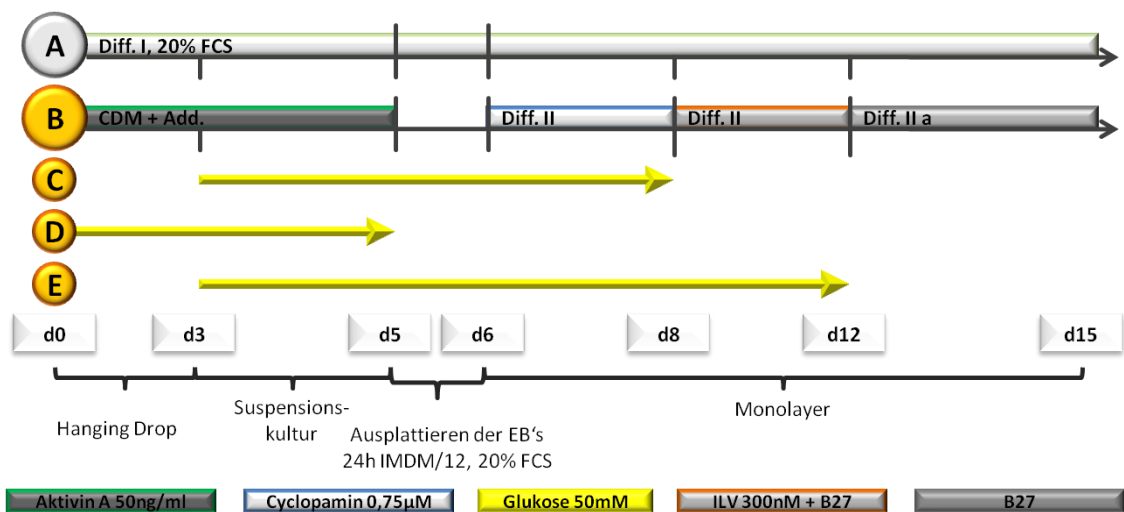


Abb. 10 Differenzierungsprotokoll von CGR8 unter intermittierend hoher Glukosezufuhr. CGR8 wurden gerichtet gemäß dem Standardprotokoll differenziert (B), sowie unter Zugabe von 50 mM Glukose von Tag (d) 3-8 (C), d0-5 (D) und d3-12 (E). Kontrolle: spontan differenzierende Zellen (A). Probenentnahme an d0, d3, d5, d8, d12, d15 (RNA) und d15 IF (Abkürzungen s. Text).

Da zudem der Einfluss von Effekten in Abhängigkeit von der Höhe der verwendeten Konzentration beleuchtet werden sollte, wurden die CGR8-Zellen Glukose-Konzentrationen von 20, 30 und 50 mM ausgesetzt. Zum einen wurde hierbei die differenzierende Stammzelle bis Tag 12 behandelt (Abb. 11), zum anderen wurden die Zellen von Tag 3 bis Tag 8 mit 20, 30 und 50 mM Glukose im Medium exponiert (Abb.12).

Die Größe der entstehenden EBs wurde an Tag 3 und 5 dokumentiert, wobei pro Gruppe 10 *embryoid bodies* lichtmikroskopisch ausgemessen werden. Die Morphologie der differenzierenden Zellen wurde täglich lichtmikroskopisch kontrolliert und fotografiert.

Die gewonnenen Proben wurden mittels *realtime*-PCR auf ihr jeweiliges Differenzierungsstadium analysiert.

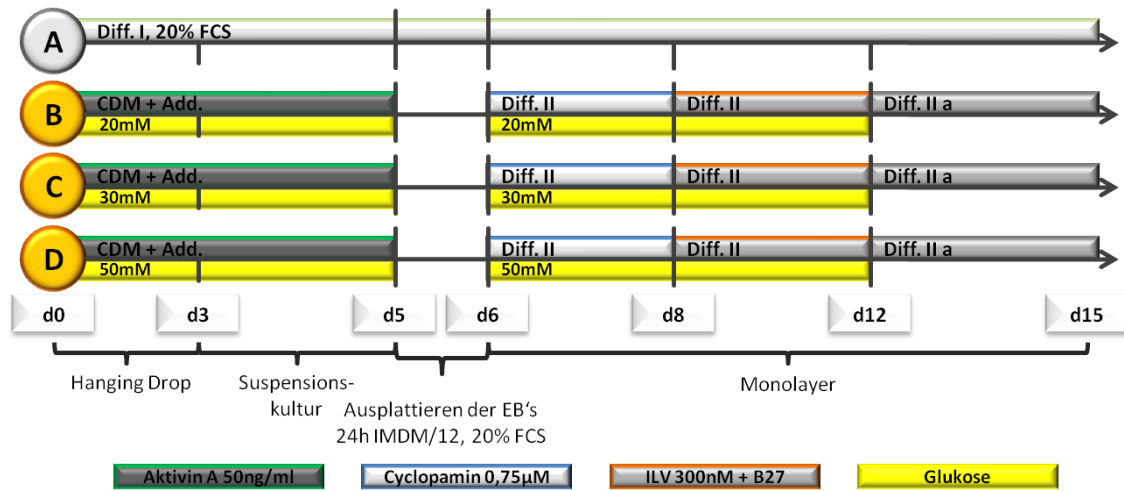


Abb. 11 Differenzierungsprotokoll von CGR8 unter Glukosezufuhr von d 0-12. CGR8 wurden gerichtet gemäß dem Standardprotokoll differenziert unter Zugabe von 20 mM (B), 30 mM (C) und 50 mM (D) von Tag (d) 0-12. Kontrolle: spontan differenzierende Zellen (A). RNA- Probenentnahme an d0, d3, d5, d8, d12, d15 (Abkürzungen s. Text).

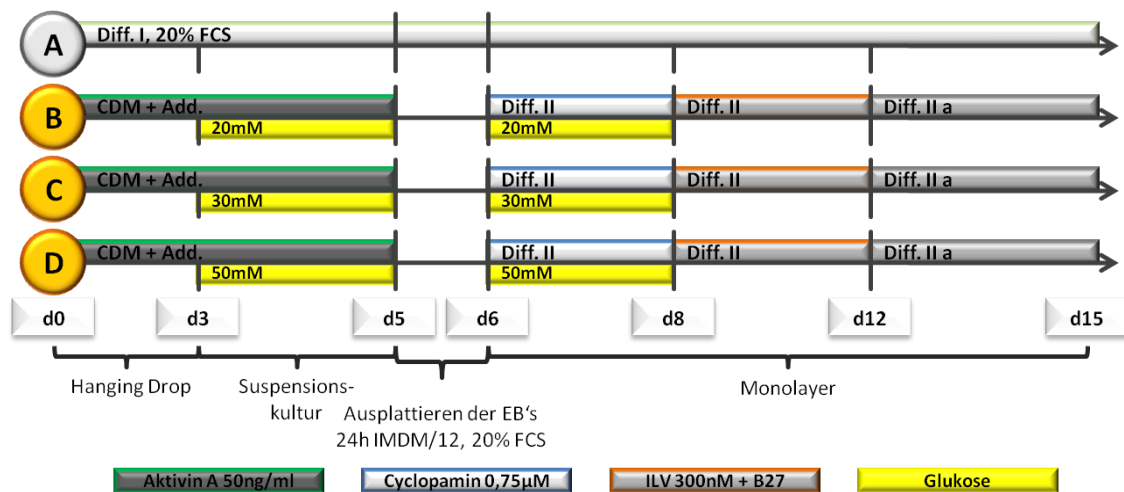


Abb. 12 Differenzierungsprotokoll von CGR8 unter Glukosezufuhr von d 3-8. CGR8 wurden gerichtet gemäß dem Standardprotokoll differenziert unter Zugabe von 20 mM (B), 30mM (C) und 50mM (D) von Tag (d) 3-8. Kontrolle: spontan differenzierende Zellen (A). RNA- Probenentnahme an d0, d3, d5, d8, d12, d15 (Abkürzungen s. Text).

3.3 mRNA-Analyse

Instrumentarium

- Agagel Mini Elektrophoresekammer (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Step One Plus, real time pcr systems (Applied Biosystems, Life Tech)
- Geldokumentationsgerät und Analysesoftware Biocapture (LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland)
- Mastercycler gradient (Benning 700/12460) (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- NanoVue Spektrophotometer (GE healthcare, München, Deutschland)
- Power Pack HC (Biorad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Thermoblock (Biometra)
- Zentrifuge 5415 C (Eppendorf)

3.3.1 RNA-Isolation

Materialien

- PBS (Phosphate buffered saline)
- Qiashreder-Säulen (Qiagen N.V., Hilden, Deutschland))
- RDD-Puffer (Qiagen)
- RLT-Lysepuffer (Qiagen)
- RNase-free DNase Set, (RDD DNA Digest Buffer, RNase-free DNase-I) (Qiagen)
- RPE-Puffer (Qiagen)
- RW1-Waschpuffer (Qiagen)
- β -Mercaptoethanol (Merck)

Zur Probengewinnung von Zellen im gewünschten Differenzierungsstadium wurde das Medium der entsprechenden Kulturschale abgesaugt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die am Boden haftenden Zellen wurden mittels 594 μ l RLT-Lysepuffer abgelöst und die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß zusammen mit 6 μ l β -Mercaptoethanol gegeben. Bis zur weiteren Verarbeitung der Probe konnte diese bei -80 °C gelagert werden.

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) entsprechend der Angaben des Herstellerprotokolls: pro Probe wurde eine RNeasy Säule mit dem Lysat und Ethanol geladen, anschließend erfolgte ein DNA-Verdau und nach mehrmaligem Waschen mit oben genannten Puffern wurde die isolierte RNA in 35 μ l RNase-freiem Wasser gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch. Hierbei wurde bei 260 nm die optische Dichte bestimmt, wobei eine RNA-Konzentration von 0,04 μ g/ μ l einer Absorption von 1,0 entsprach. Die gewonnene RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.3.2 cDNA-Synthese

Materialien

- Oligo dT(12-18) N-Primer; Lösung 50 μ M in 10mM Tris-HCL, pH 8,3 (Fermentas)
- 5x Reverse Transkriptase Puffer; 250 mM Tris-HCL, pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland)
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); je 10 mM (Fermentas)
- RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase; 200 U/ μ l (Fermentas)
- RiboLock RNase Inhibitor; 40 U/ μ l (Fermentas)

Zur Detektion exprimierter Gene ist es notwendig, die einsträngige messenger RNA (mRNA) mittels eines Enzyms, der reversen Transkriptase, zu komplementieren. Es wurden hierbei 2 μ g RNA umgeschrieben; die Menge benötigter μ l ist abhängig von der photometrisch ermittelten Konzentration der in der Probe enthaltenen RNA. Da für einen 20 μ l Ansatz insgesamt 11,5 μ l Lösung zur Synthese benötigt wurden, ist die fehlende Menge durch DEPC-Wasser ersetzt worden. Dieser Ansatz wurde zusammen mit je 1 μ l Oligo dT-Primer 5 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden je 4 μ l RT-Puffer, 2 μ l dNTP, 1 μ l Reverse Transkriptase und 0,5 μ l RNase Inhibitor hinzu pipettiert. Hiernach wurde für 60 min bei 42 °C inkubiert und die Reaktion später bei 70°C für 10 min hitzeinaktiviert. Die erhaltene cDNA lagerte bei -20 °C. Kontrolliert wurde der Erfolg der Synthesereaktion durch den Nachweis eines *housekeeping*-Gens (Tubulin V, GAPDH), welches unabhängig von dem Differenzierungsgrad in allen Zellen vorliegt.

3.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Materialien

- | | |
|--|--|
| - 10 mM Primer Sense (s) und Antisense (as); 100 mM Stammlösung 1:10 in DEPC-Wasser (biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland) | - Agarose (Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland) |
| - 10x Reaktionspuffer B (Solis BioDyne, Tartu, Estland) | - Ethidiumbromid 10 mg/ml |
| - 10x Reaktionspuffer B2 (Solis BioDyne) | - GeneRuler 100p Plus DNA Ladder (Fermentas) |
| - 10x Reaktionspuffer BD (Solis BioDyne) | - HOTFIREpol DNA Polymerase; 5 U/ μ l (Solis BioDyne) |
| - 2,5 mM dNTP-Mix (Solis BioDyne) | - Reinstwasser |
| - 25 mM MgCl ₂ (Solis BioDyne) | - Taq (Firepol) DNA Polymerase; 5 U/ μ l (Invitrogen, Life Tech) |
| - 6x DNA Ladepuffer (Solis BioDyne) | |

Um den Erfolg der Differenzierung zu prüfen, ist es möglich, die Transkription von bestimmten Genen, die für die jeweilige Entwicklungsstufe charakteristisch sind, per PCR nachzuweisen.

Die gewonnenen Amplifikate wurden durch eine anschließende Gelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt. Mittels eines Standards (DNA-Leiter) konnte die Größe der PCR-Produkte bestimmt werden.

25 µl PCR-Ansatz (Bsp. TubV)

- 16,35 µl Reinst-Wasser
- 2,5 µl 10x Reaktionspuffer (BD)
- 2,0 µl 25 mM MgCl₂
- 2,0 µl 2,5 mM dNTP-Mix
- Je 0,5 µl 10pmol Primer (s/as)
- 0,25 µl Taq FIREPOL DNA Polymerase
- 1 µl cDNA

Programm: 95 °C 5 min, (95 °C 45 sec, 57 °C 45 sec, 72 °C 45 sec) x 45 Zyklen, 72 °C 10 min, 4° C Pause.

Bei allen Ansätzen wurde für jedes Primerpaar eine spezifische Annealing-Temperatur verwendet und die Mengenverhältnisse der Ingredienzien optimiert (s. Tab. 7, Anhang). Für einige Gene (z.B. Pdx1) ist es notwendig, eine sensitivere Polymerase mit einem anderen Programm zu verwenden.

25 µl PCR-Ansatz (Bsp. Pdx1)

- 12,75 µl Reinst-Wasser
- 2,5 µl 10x Reaktionspuffer (B2)
- 2,5 µl 25 mM MgCl₂
- 2,0 µl 2,5 mM dNTP-Mix
- Je 1 µl 10 pmol Primer (s/as) s. Tab. 7
- 0,25 µl HOT-FIRE DNA Polymerase
- 3 µl cDNA

Programm: 95 °C 15 min, (95 °C 45 sec, Primer-spezifische Annealing-Temperatur 45 sec, 72 °C 45 sec) x 45 Zyklen, 72 °C 10 min, 4 °C Pause

3.3.4 Gelelektrophorese

Zur Erhaltung eines 2%igen Agarose-Gels wurden 2 g Agarose zu 100 ml TAE gegeben und bis zur vollständigen Verflüssigung erhitzt. Nach kurzzeitiger Abkühlung wurden 3 µl Ethidiumbromid untergemischt und das Gel gegossen. Nach vollständiger Aushärtung bei Raumtemperatur konnten die PCR-Produkte auf das Gel in der mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer aufgetragen werden. Je 8 µl der PCR-Probe wurden mit 3 µl 6x-Ladepuffer vermischt und in die Taschen des Agarosegels gegeben. Die Auftrennung erfolgte

bei 100 V, 0,1 A für 30 min. Das Ergebnis wurde anschließend unter UV-Licht mittels Geldokumentationsgerät und Analysesoftware detektiert und analysiert.

3.3.5 Quantitative PCR (qPCR, *realtime*)

Instrumentarium

- Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Tech)

Materialien

- *Faster Thermal Cycling Plates* 98-well (Applied Biosystems)
- *Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems)
- PowerSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- Realtime-PCR Primer s/as 10 mM (biomers.net GmbH)
- RNase freies Wasser (Qiagen)

Zur quantitativen Bestimmung von PCR-Produkten ist eine sogenannte *realtime*-PCR durchzuführen. Ein Fluoreszenzfarbstoff, hier das SYBRGreen, wird an die doppelsträngige DNA gebunden. Durch die Messung der gewonnenen fluoerzienten Amplifikate eines Gens in Echtzeit und der Ermittlung des PCR Zyklus, in welchem die Fluoreszenz einen Mindestwert überschreitet, kann man auf die Menge des exprimierten Gens schließen.

Das jeweilige Gen wurde mit Hilfe eines *housekeeping*-Gens (GAPDH), welches in nicht- und differenzierten Zellen gleichermaßen exprimiert wird, normalisiert, um durch unterschiedliche RNA-Mengen der Proben entstandene Fehler zu kompensieren. Um Pipettierfehler zu verringern, wurde jede Probe dreimal aufgetragen, vermessen und ein Durchschnittswert gebildet (technische Replikate). Die relative Quantifizierung erfolgte gemäß einer für den jeweiligen Primer (Tab. 8) spezifischen Standardkurve.

20 µl qPCR-Ansatz

- 10 µl SYBRGreen
- 8 µl RNase freies Wasser
- Je 0,5 µl 10 pmol/µl Primer (s/as) s. Tab. 8
- 1 µl cDNA

Programm: 95 °C 10 min, (95 °C 15 sec, 60 °C 1 min) x 45 Zyklen, 95 °C 15 sec, 60 °C 1 min, 95 °C 15 sec

Die gewonnenen Daten wurden anschließend graphisch dargestellt. Da von allen Differenzierungsversuchen zwei Wiederholungen durchgeführt wurden, erfolgten anschließend die Berechnungen der einzelnen Mittelwerte und die Auftragung derselben unter Einschluss eines Standardfehlers. Um den Verlauf der Expression der gesuchten Gene Sox17, Sdf1, Pdx1 und Ngn3 sowie NeuroD6 darzustellen, wurden die Expressionswerte mit der Kontrolle

(spontan differenzierte ESC) verrechnet und graphisch dargestellt. Mittels Sigmaplot wurden diese Daten weiter ausgewertet und durch die Anwendung eines t-Tests auf Signifikanz überprüft.

3.4 Immunzytochemischer Nachweis

In jedem Stadium ihrer Differenzierung haben die Zellen ein spezifisches Expressionsmuster welches nicht nur auf mRNA-, sondern auch auf Proteinebene nachgewiesen werden kann. Um letztere zu detektieren wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper benutzt, die, nach spezifischer Bindung an das gewünschte Protein, selbiges mikroskopisch sichtbar machen können. Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung bindet ein primärer Antikörper an das gesuchte Epitop und ein sekundärer Antikörper, der wiederum an ein Fluorochrom (Alexa 488) gekoppelt ist, bindet an den ersten. Durch Bestrahlung des Präparates in einem Wellenbereich von 499 nm kommt es schließlich zu einer Emission von grünem Licht (519 nm).

Instrumentarium:

- Biozero BZ-8100E (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) und Software BZ-Analyser

Materialien

- *Dako Mounting Medium* (Dako, Hamburg, Deutschland)
- Hoechst 33342 (Invitrogen); für die Stammlösung (50 µg/ml) werden 1 mg 20 ml Reinst-Wasser gelöst. Arbeitslösung (5 µg/ml) durch Verdünnung 1:10 mit Reinst-Wasser
- Objektträger: Starfrost adhäsiv, 76x26 mm (Heinemann)
- PBS (*Phosphate buffered saline*)
- PFA 4 % (Sigma-Aldrich)
- Pinzette
- Primäre und sekundäre Antikörper (Tab.9)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- Ziegen Serum 1 %, 3,5 % (Invitrogen)

Zur Herstellung der Präparate wurden die EBs auf mit Gelatine beschichteten Deckgläschen ausgesetzt und weiter gemäß Protokoll differenziert. Am Tag der Probenentnahme wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden 2 ml einer 4%igen PFA-Lösung für 20 min auf das Präparat gegeben und abermals mit PBS gewaschen. Um ein Austrocknen des Präparats zu verhindern, wurde das letzte PBS belassen.

Die Färbung der Präparate erfolgte in einer Feuchtkammer. Zur Blockung unspezifischer Epitope wurde das Präparat mit 1 %igem Ziegen Serum und 0,1 % TritonX für 30 min und anschließend mit 3,5 %igem Ziegen Serum für weitere 30 min behandelt, da es sich bei den verwendeten Antikörpern um nukleäre Epitope handelte. Vor der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde abermals dreimal mit PBS gewaschen. Je 100 µl der Antikörpersuspension

(jeweils entsprechend der Herstellerangaben verdünnt) wurden für 45 min bei 37 °C auf dem Präparat belassen. Wieder wurde mit PBS gewaschen. 100 µl des sekundären Antikörpers, ebenfalls entsprechend verdünnt, wurden für 30 min bei 37 °C hinzugegeben. Nach abermaligem Waschen erfolgte die Kernfärbung mit 100 µl Hoechst 33342 bei Raumtemperatur für 8 min. Nun wurde dreimal mit PBS und ein letztes Mal mit Reinstwasser gewaschen. Letzteres verhinderte die Bildung von Salzkristallen bei der folgenden Einbettung. Jetzt wurde der Objektträger beschriftet, ein Tropfen Dako Mounting Medium platziert und das abgetropfte Deckgläschen vorsichtig darauf gesetzt. Über Nacht härtete das Präparat aus, um nach 24 h mit klarem Nagellack umrandet zu werden. Bei 4 °C wurde es nun bis zur mikroskopischen Untersuchung dunkel gelagert.

Die Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop.

4 Ergebnisse

4.1 Erhöhung des Anteils an definitivem Entoderm am Modell der transgenen murinen ES-Zelllinie Sox17-DsRed

4.1.1 Charakterisierung der Sox17-DsRed

Die murine embryonale Stammzelllinie Sox17-DsRed ist durch eine transgene Modifikation gekennzeichnet. Sox17-DsRed exprimierende Zellen enthalten nur ein Allel für Sox17; das zweite Allel enthält, kontrolliert von seinem nativen Promotor, neben einer Puromycinresistenz das DsRed (*Discosoma species*). Bei Expression von Sox17 nach Differenzierung in Zellen des definitiven Entoderms werden diese Zellen durch rote Fluoreszenz erkennbar. Eine Kultur der Stammzellen unter Gabe von G418 selektiert die genetisch veränderten Zellen und dient somit zum Erhalt der transgenen Expression.

Die Insertion des Expressionsvektors der Sox17-DsRed-Linie konnte mittels PCR nachgewiesen werden. Schon in der embryonalen Stammzelle konnte das Intron überspannende Transkript durch einen entsprechend designten Primer bei 654 bp aufgezeigt werden (Abb. 13).

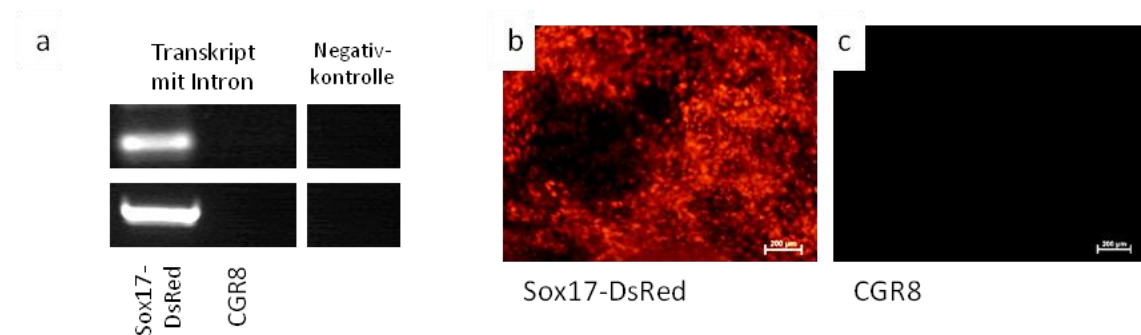


Abb. 13 Vergleich der embryonalen Stammzellen Sox17-DsRed und CGR8 als Stammzelle und in zu definitivem Entoderm differenzierten Zustand. (a) In den Sox17-DsRed konnte stets die transgene Modifikation nachgewiesen werden. Negativkontrolle: Wasser. (b) DsRed-positive Zellen an Tag 9. (c) Kein Nachweis DsRed unter den CGR8 (Maßstab: 200 μm).

In den embryonalen Stammzellen der Sox17-DsRed wurde das neue Transkript exprimiert. Sowohl in undifferenziertem als auch differenziertem Zustand konnte die transgene Modifikation auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Die unveränderte Schwesterlinie CGR8, welche dem Wildtyp muriner ES-Zellen entspricht, zeigte keinerlei Expressionsmuster. Fluoreszenzmikroskopisch konnte das DsRed an Tag 9 nur bei den transgenen Zellen detektiert werden. Der Wildtyp zeigte erwartungsgemäß keinerlei fluoreszentes Verhalten.

Die Pluripotenz der beiden murinen ESC-Linien wurde mittels alkalischer Phosphatase-Reaktion überprüft. Lichtmikroskopisch entsprach die Zellmorphologie dem typischen Charakter einer embryonalen Stammzelle: das Kern-Zytoplasma-Verhältnis war mit einem nur

schmalen Zytoplasmasaum stark zu Gunsten des Zellkerns verschoben, die Zellen wuchsen dicht nebeneinander und zeigten ein uniformes Erscheinungsbild (Abb. 14 (a) und (c)).

Nach Behandlung mit Naphtol-AS-BI-Phosphat färbte sich der überwiegende Teil der Zellen in einem leuchtenden rot, zeigte das Vorhandensein der alkalischen Phosphatase an und wies damit auf die Pluripotenz der ESC hin.

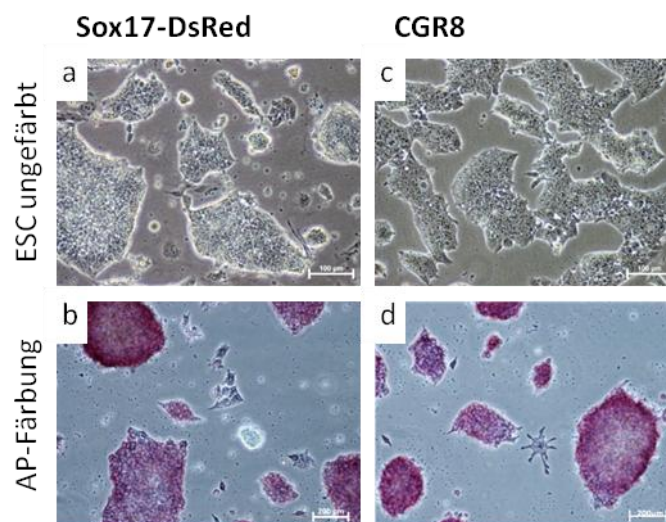


Abb. 14 Murine embryonale Stammzellen in Kultur (a, c) und nach Färbung gemäß der alkalischen Phosphatasereaktion (b, d). Die Zellen zeigen sich überwiegend rot gefärbt. Vereinzelt sind ungefärbte morphologisch abweichende differenzierte Zellen sichtbar (Maßstab: 100 μm).

4.1.2 Einfluss der *small molecules* IDE1 und IDE2

Ziel der folgenden Versuche war es, die Differenzierungseffizienz und damit die Ausbeute an definitivem Entoderm zu erhöhen, um eine bessere Grundlage für die Gewinnung von pankreatischen Vorläuferzellen zu erlangen.

Die Zellen wurden hierbei nur mit 50 ng/ml Aktivin A sowie der Kombination aus Aktivin A und 5 μM IDE1 oder IDE2 behandelt. Die letzte Gruppe bildete die Kombination aller 3 Wachstumsfaktoren. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die unter 20 % FCS spontan ausdifferenzierten. Alle EBs wurden an Tag 3 gemäß Protokoll in Suspensionskultur gebracht und anschließend täglich bis zu Tag 10 auf DsRed kontrolliert.

Aus allen Gruppen wurden Proben zur Analyse des Expressionsmusters auf RNA-Ebene entnommen. An Tag 9 zeigte sich ein der Fluoreszenz äquivalentes Bild: in allen vier Gruppen, unabhängig von der Behandlung mit IDE1 oder IDE2, konnte die Expression von Markern des definitiven Entoderms Sox17 und CXCR4 nachgewiesen werden (Abb. 15). Der Anteil an extraembryonalem Entoderm, repräsentiert durch Sox7, konnte durch keines der *small molecules* vermindert werden. Die Konsequenz aus diesen Resultaten ziehend, wurde in den

folgenden Versuchen nur Aktivin A (50 ng/ml) zur Erlangung von definitivem Entoderm verwendet.

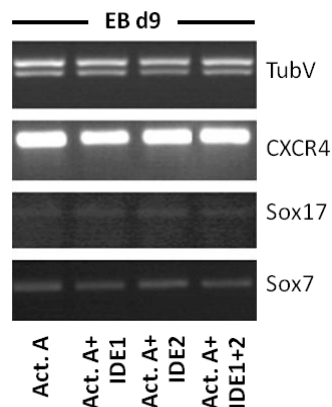


Abb. 15 RT-PCR, Probenentnahme an Tag (d) 9 der Suspensionskultur. In allen 4 Gruppen wurde ein ähnliches Expressionsmuster der Marker für definitives Entoderm (Sox17, Cxcr4) beobachtet. TubulinV diente der Kontrolle des Erfolgs der cDNA-Synthese. Der Anteil an extraembryonalem Entoderm wurde durch Sox7 repräsentiert.

Mit Ausnahme der spontan differenzierenden Gruppe, welche einen deutlich größeren Durchmesser aufwies, aber weitaus weniger DsRed, zeigten sich die gerichtet differenzierten EBs allesamt deutlich kleiner. Hinsichtlich des DsRed waren zwei Peaks zu verzeichnen. Der erste, kleinere Peak trat in allen Gruppen an Tag 5 auf (Abb. 16 (g-j)). Der zweite, weitaus größere Anstieg der DsRed-Expression, zeigte sich zwischen Tag 8 und Tag 9. Es konnte fluoreszenzmikroskopisch kein Unterschied zwischen der Differenzierung unter alleiniger Aktivin A und dem Zusatz eines *small molecules* verzeichnet werden. Auch die Kombination aller 3 Faktoren erbrachte keinen verstärkenden Effekt.

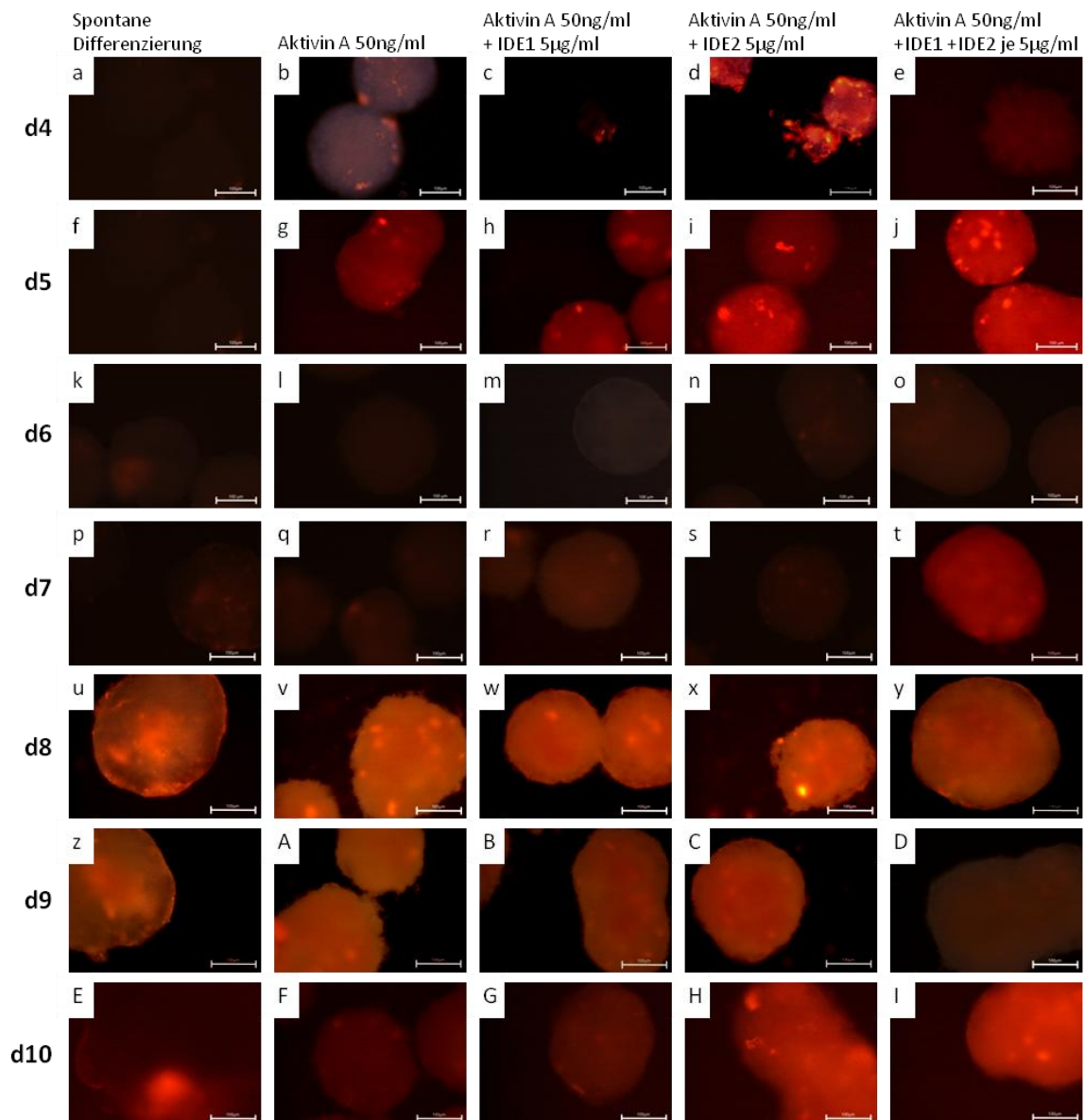


Abb. 16 Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich des Anteils an DsRed (rot) der sich differenzierenden EBs. Das Maximum des Anteils rot fluoreszierender Zellen wurde zwischen Tag (d) 8 und 9 beobachtet (Maßstab: 100 µm).

4.2 Einfluss niedrigster Glukosekonzentrationen auf die Entstehung von definitivem Entoderm

Es ist schon länger bekannt, dass die Versorgung mit Nährstoffen während der pränatalen Entwicklung essentiell für die Entwicklung von beta-Zellen ist. Unterernährung führt zu einer Abnahme der Anzahl zukünftiger beta-Zellen. Der Einfluss von 0,5-10 mM Glukose auf das sich entwickelnde Pankreas wurde bereits an explantierten E13.5 Rattenpankrea *in vitro* untersucht (Guillemain et al., 2007). Es liegen jedoch keine Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung von niedrigsten Glukose-Konzentrationen während der Differenzierung von embryonalen Stammzellen vor.

Um einen gesicherten Anteil an definitivem Entoderm als Ausgangssituation der Versuche zu haben, wurden abermals die Sox17-DsRed verwendet. Nach erfolgreicher fluoreszenzmikroskopischer Prüfung auf das Vorhandensein von DsRed, dem Indikator der Existenz von definitivem Entoderm, wurden die EBs auf 0,1 % Gelatine ausplattiert.

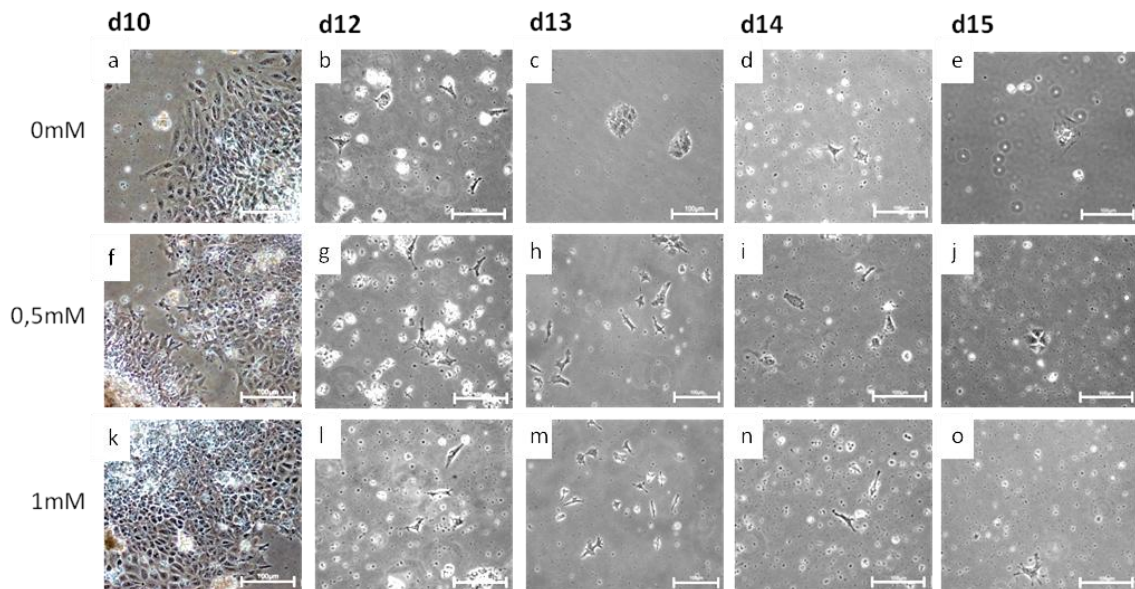


Abb. 17 Nach etabliertem Protokoll differenzierte DsRed-positive Zellen. Sie wurden an Tag (d) 9 ausplattiert und ab d 10 mit 0, 0.5, und 1 mM Glukose behandelt. Das drastische Zellsterben wurde vor allem in den ersten Tagen deutlich. Bild (a), (f), (k): *Outgrowth* der EBs vor Glukoseentzug. 2 Tage später existierten nur noch vereinzelt lebende Zellen ((b), (g), (l)). Gegen Versuchsende waren alle Zellen abgestorben ((e), (j), (o)) und schwammen abgelöst im Medium (Maßstab: 100µm).

Der Glukosegehalt des bis dahin verwendeten Mediums zur gerichteten Differenzierung (chemisch definiertes Medium, CDM) betrug standardmäßig 17,5 mM. Nach mikroskopisch überprüfem sicheren Anwachsen auf dem Boden der Kulturschalen (Abb. 17 (a), (f) und (k)) wurde den Zellen mit stark Glukose-reduziertem Medium konfrontiert. Unter 0 mM, 0.5 mM, und 1 mM erfolgte die weitere Kultur mit drastischen Folgen. Nach zwei Tagen Kultur unter Glukosemangel lösten sich in allen 3 Gruppen über 90 % der Zellen vom Boden ihrer Kulturschale ab und trieben sterbend im Medium (Abb. 17 (b), (g), (l)). Die Morphologie der übrigen Zellen veränderten sich von einem rund-kompakten zu einem langgestreckten, Ausläufer bildendem Äußeren. Während der laufenden Kultur nahm ihre Anzahl weiter ab, bis bereits an Tag 15, einem Tag vor Ende des Versuchs, keine lebenden Zellen mehr wuchsen. Eine Probenentnahme zur Analyse des RNA-Expressionsmusters wurde somit unmöglich.

4.3 Differenzierung von CGR8-Zellen zu pankreatischen Vorläuferzellen

4.3.1 Morphologische Veränderungen im Verlauf der *in vitro* Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen

Die undifferenzierten murinen embryonalen Stammzellen CGR8 zeichneten sich in Kultur durch kleines, kompakt wachsendes Äußeres aus. Sie besaßen einen nur schmalen Zytoplasmasaum und wuchsen in „Schwemmland“-artigen planen Verbänden auf dem Boden der Kulturschale (Abb. 18 (a)). Mit Beginn der Differenzierung im 3D-Modell, dem hängenden Tropfen, formten sich gut begrenzte, überwiegend runde EBs, welche unter Zufuhr von Aktivin A einen deutlich kleineren Durchmesser als ihre spontan differenzierten Pendanten aufwiesen (vgl. Abb. 18 (b) und (f)). Während des Wachstums in Suspensionskultur ab dem 3. Differenzierungstag waren immer wieder apoptotische Zellen im Umkreis der gerichtet differenzierenden EBs zu beobachten.

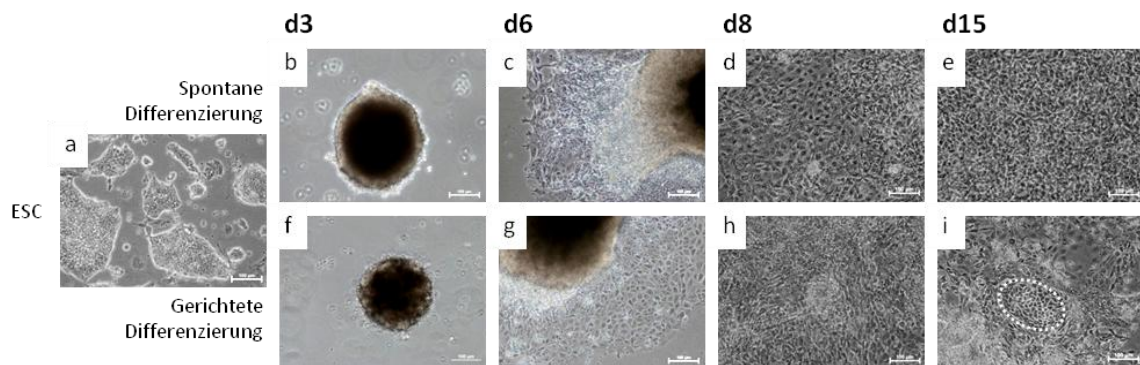


Abb. 18 Verlauf der spontanen und gerichteten Differenzierung der murinen embryonalen Stammzelllinie CGR8. (b), (f) EB in Suspensionskultur an Tag 3; (c), (g) EB mit *Outgrowth*, (h) Bildung neuronaler Zellen; (i) inselartige Cluster (Markierung); (d), (e) bunte Mischung Zellen verschiedenster Morphologie (Maßstab: 100µm).

Der Beginn der Kultur als Monolayer erfolgte an Tag 5. Die zunehmende Differenzierung der Zellen zeigte sich im so genannten *Outgrowth*, welcher sich am Rand der anwachsenden EBs bildete. Der direkte Kontakt der Zellen zu den Zusätzen des Mediums führte zu einer Veränderung ihrer Morphologie und offenbarte die Unterschiede zwischen spontaner und gerichteter Differenzierung. In der Gruppe gerichtet differenzierender Zellen zeigten sich an Tag 8 überwiegend neuronale und epithelartige Zellverbände (Abb. 18 (h)). Nur selten waren schlagende Zellcluster zu verzeichnen, die auf die Bildung von Kardiomyozyten hingewiesen hätten. Mit zunehmendem Differenzierungsverlauf steigerte sich die Rate der apoptotischen Zellen mit resultierender Selektion bestimmter Zelltypen, beispielsweise epithelartiger wirbel- und kreisförmiger Strukturen, welche sich auffällig oft in der Nähe von neuronalen Strukturen formierten (Abb. 18 (i)).

Die spontan differenzierenden Zellen hingegen zeichneten sich durch überwiegend in Form und Größe unstete, weitgehend Fibroblasten-ähnliche Verbände und eine überaus geringere Apoptoserate aus.

4.3.2 Vergleich der Zelllinien CGR8 und Sox17-DsRed bezüglich des Zeitpunktes der Entstehung von definitivem Entoderm

Das Modell der bei Differenzierung zu definitivem Entoderm rot fluoreszierenden Sox17-DsRed-Zellen hatte sich bei der Etablierung eines optimalen Aktivin A gestützten Protokolls bewährt. Für den nächsten Schritt, die Gewinnung pankreatischer Vorläuferzellen, wurde in dieser Arbeit die Schwesterlinie CGR8 verwendet. Um bestmögliche Voraussetzungen für das später etablierte Differenzierungsprotokoll zu schaffen, war es notwendig, eventuelle Unterschiede im Sox17-Expressionsmuster der beiden Zelllinien zu detektieren.

Hierzu wurden beide Linien gemäß des schon beschriebenen *hanging-drop* Protokolls zu EBs geformt und in Suspensionskultur gebracht. Die ersten Unterschiede waren hierbei in Größe und Aussehen der EBs zu beobachten (Abb. 19). Die aus den Sox17 geformten EBs erschienen morphologisch weniger kompakt und nahmen mit der Zeit weniger an Größe zu. Ganz im Gegenteil zu den stetig wachsenden CGR8 lösten sich bei den Sox17-stämmigen EBs zusehends sterbende Zellen aus dem Verband, so dass am 10. Tag die ursprünglich runde Form (vgl. Abb. 19 (f) und (j)) nur noch zu erahnen war. Jeder Wechsel des Mediums verstärkte diesen Vorgang zusehends. Die CGR8 hingegen zeigten sich weniger fragil und von mechanischen Belastungen weitgehend unbeeindruckt (Abb. 19 (b)-(e)).

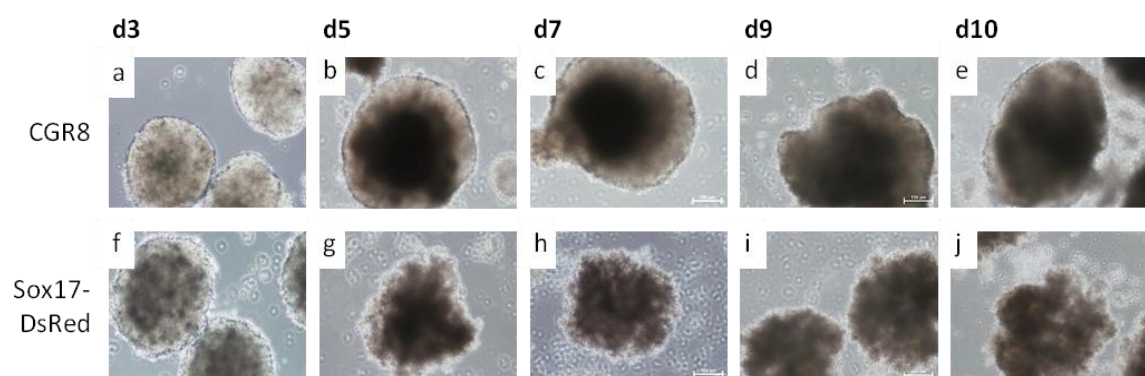


Abb. 19 Vergleich des Wachstums der CGR8 (a-e) und Sox17 (f-j). CGR8-stämmige EBs zeigen sich kompakter, größer und gegenüber mechanischen Belastungen stabiler (Maßstab: 100 µm).

Um die Differenzierungsfähigkeit der beiden murinen embryonalen Stammzelllinien hinsichtlich der Ausbeute an definitivem Entoderm zu vergleichen, wurde die Expression der stellvertretenden Gene für definitives Entoderm, Sox17, und extraembryonales Entoderm, Sdf1, qualitativ und quantitativ mittels RT- und *realtime*-RT-PCR analysiert.

In der qualitativen Analyse auf das Vorhandensein von definitivem Entoderm zeigten die CGR8-Zellen einen 6 Tage früheren Expressionsanstieg von Sox17, wobei die stärkste Bande an Tag 6 nachgewiesen werden konnte (Abb.20 (A)). Bei den Sox17-DsRed hingegen wurde erwartungsgemäß erst an Tag 9 das Vorhandensein von definitivem Entoderm verzeichnet (Abb. 20 (B)). Bei den embryonalen Stammzellen und an Tag 4 bei den Sox17-DsRed erschienen die Banden nicht auf der erforderlichen, durch die Positivkontrolle repräsentierten Höhe von 304 Basenpaaren. Der Marker des extraembryonalen Entoderms, Sdf1, wurde von den CGR8 auch zeitiger (ab Tag 4) exprimiert. Die Sox17-DsRed hatten auch bezüglich dieses Gens ihren Expressionspeak an Tag 9, konnten aber schon an Tag 4 bis 6 schwache Sdf1-Banden vorweisen.

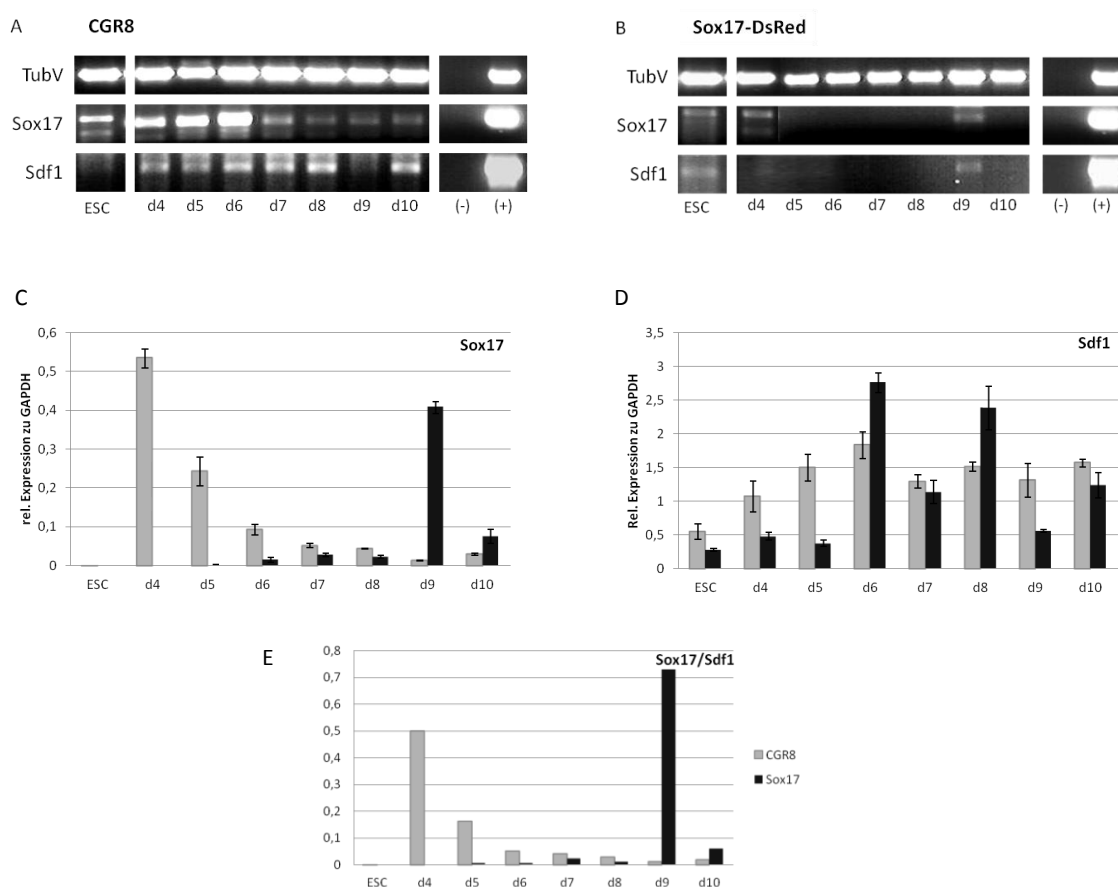


Abb. 20 Repräsentative Transkriptdaten der Expression der Marker Sox17 und Sdf1 in CGR8 (A) und Sox17-DsRed (B) stämmigen EBs. (A/B) ESC: undifferenzierte Zellen der jeweiligen Linie, Tag (d) 4-10 in Suspensionskultur unter Einfluss von Akt. A (50 ng/ml) differenziert. TubV (452 bp): Kontrolle der cDNA-Synthese, Sox17 (304 bp): definitives Entoderm, Sdf1 (396 bp): extraembryonales Entoderm, (-): Negativkontrolle, (+): Positivkontrolle. (C/D) Relativer mRNA-Gehalt in CGR8 (grau) und Sox17-DsRed (schwarz) im Verhältnis zur Expression von GAPDH (*housekeeping-gen*). (E) Verhältnis von definitivem Entoderm (Sox17) zu extraembryonalem Entoderm (Sdf1).

Die quantitative Bestimmung des Anteils an Sox17 erbrachte ähnliche Ergebnisse. Die Betrachtung der Markerexpression im Verlauf zeigte bei beiden Zelllinien einen starken Anstieg

und anschließend langsamen Abfall von Sox17. Den größten Anteil exprimierten die CGR8 an Tag 4 und 5, während die Sox17-DsRed an Tag 9 ihr Maximum aufwies (Abb. 20 (C)). Langsamer stieg in beiden Gruppen der Anteil an extraembryonalem Entoderm, repräsentiert durch Sdf1 (Abb. 20 (D)). Da ein Teil der extraembryonalen Zellen auch Sox17-positiv ist, wurde der Sox17-Anteil ins Verhältnis zu dem Anteil an Sdf1 gesetzt, um den wirklichen Anteil an definitivem Entoderm darzustellen (Abb. 20 (E)). Hier zeigte sich bei den CGR8 eine schnelle Differenzierung der Zellen mit einem starken Anstieg des definitiven Entoderms an Tag 4, welcher im weiteren Verlauf flach abfiel. Die Differenzierung der Sox17-DsRed konnte erst an Tag 9 ähnlich hohe Expressionswerte aufweisen.

Anhand des Expressionsmusters der CGR8 wurde das Differenzierungsprotokoll der folgenden Versuche angepasst. Basierend auf einem Protokoll von Chen et al. wurde der Ausplattierungszeitpunkt eingedenk des Sox17-Peaks zwischen Tag 4 und 5 auf Tag 5 verschoben (Chen et al., 2009). Somit verkürzte sich, wie im Kapitel 3.2.1. beschrieben, das bestehende Protokoll der Sox17-DsRed, laut dessen Verlauf die EBs bis Tag 9 in Suspensionskultur verweilten, um 4 Tage. Die folgenden Versuche wurden nun mit neuem zeitlich kürzeren Protokoll und der murinen embryonalen Stammzelllinie CGR8 durchgeführt.

4.3.3 Einfluss von physiologischen Glukose-Konzentrationen auf die Entstehung pankreatischer Vorläuferzellen

Im Folgenden wurde anhand der CGR8 der Einfluss von physiologischen Glukose-Konzentrationen auf das sich zu pankreatischen Vorläuferzellen ausdifferenzierende Stammzellmodell untersucht. Die gewählten Glukose-Konzentrationen bezogen sich auf die *in vivo* beim Menschen als physiologisch an gesehene 5 mM hohe Blutglukose-Konzentration, und die maximale Rückresorptionskapazität der menschlichen Niere für Glukose, welche bei 10 mM liegt.

Somit wurden die CGR8 laut neuem Protokoll zu pankreatischen Vorläuferzellen mit einem modifizierten Medium, welches 5 beziehungsweise 10 mM Glukose enthielt, differenziert. Um Glukose-sensible Zeitpunkte während der Differenzierungsetappen zu detektieren, wurden diese Konzentrationen jeweils von Versuchsbeginn bis Tag 12 und von Tag 3 bis Tag 8 gegeben. Entnommene RNA-Proben wurden anschließend per *realtime*-PCR analysiert.

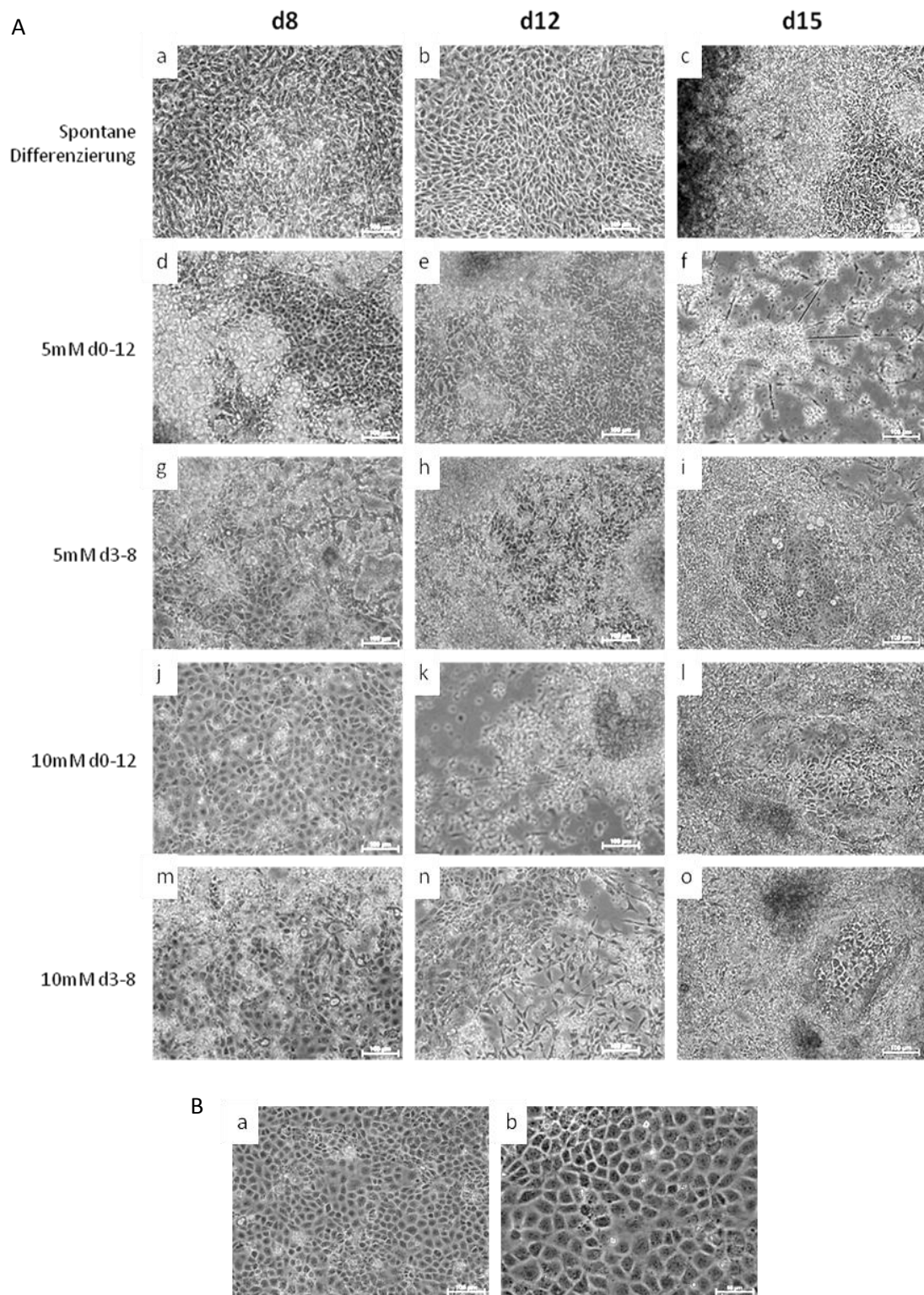


Abb. 21 Gerichtete Differenzierung von CGR8 unter 5 mM und 10 mM Glukose. (A) Die Zellen wurden entweder von Tag (d) 0-12 oder d3-8 mit der jeweiligen Glukose-Konzentration kultiviert. Als Kontrolle dienten spontan differenzierte Zellen (a-c). (B) endothelartige Formationen an d8, repräsentativ aus der 5 mM Glukose d0-12 Gruppe. (Maßstab: 100 µm und 50 µm).

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Zellen während des Differenzierungsverlaufs fiel eine endothelartige Veränderung aller gerichtet differenzierenden Zellen an Tag 8 auf, welche in dieser Form bei den vorhergehenden Versuchen nicht beobachtet worden war (s. Abb. 21 (B a, b)). Allerdings existierten diese Formationen nicht dauerhaft. An Tag 12 waren diese Strukturen verschwunden und durch fibroblastenähnliche Zellstränge ersetzt worden, die den spontan differenzierenden Zellen glichen (Abb. 21 (e, h, k, l)).

Während des gesamten Differenzierungsverlaufs unter niedriger Glukose zeichneten sich alle gerichtet differenzierten Gruppen durch einen hohen Anteil sterbender Zellen aus, welche nach Kultur unter der Standardkonzentration von 17,5 mM langsam geringer wurde. Neuronale Strukturen oder inselartige Cluster traten in allen gerichtet differenzierenden Gruppen in nur geringer Menge und erst an Tag 15 auf (Abb. 21 (k), (o)).

Nach Versuchsende wurden die gewonnenen RNA-Proben auf die Expression von spezifischen Markern der pankreatischen Linie untersucht (Abb. 22).

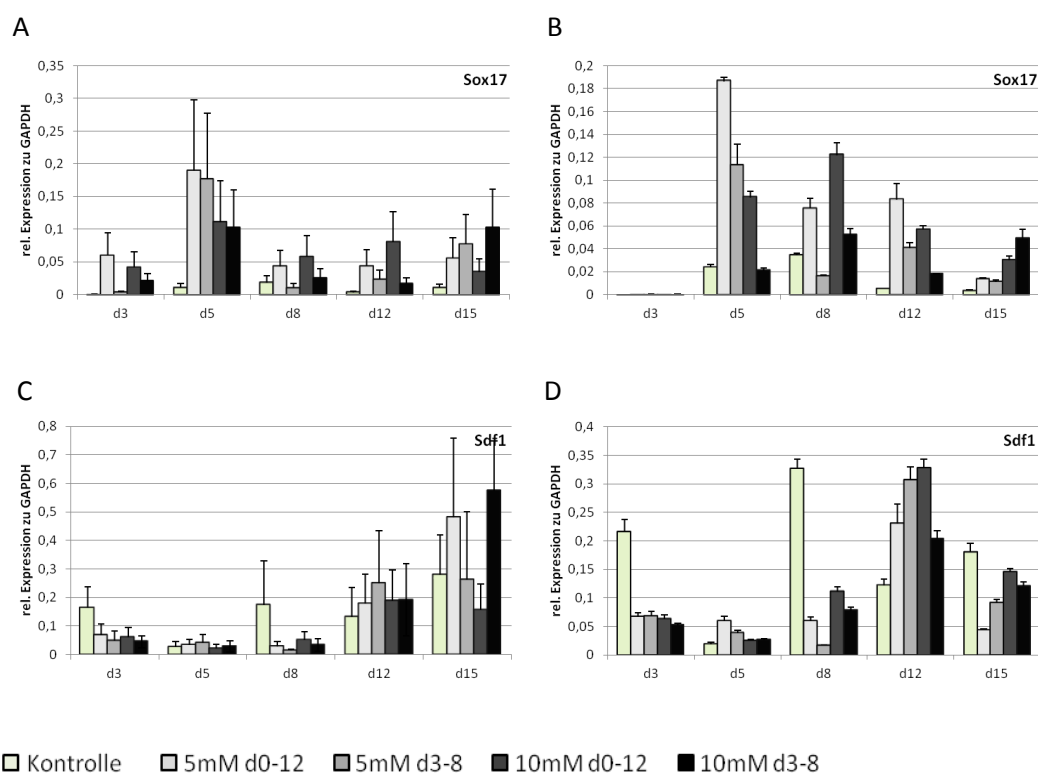


Abb. 22 Transkriptdaten der Expression von Sox17 (A, B) und Sdf1 (C, D) in CGR8 unter 5 mM (hellgrau) und 10 mM Glukose (dunkelgrau). Linksseitig (A,C) die gemittelten Werte aller Versuche (N=3, n=3) mit Standardfehler (SEM), rechtsseitig (B,D) Daten eines Versuchs mit Standardabweichung als repräsentatives Beispiel.

Der Marker des definitiven Entoderms, Sox17, stieg im Laufe der Differenzierung mittels Aktivin A in allen gerichtet differenzierenden Gruppen innerhalb der ersten Differenzierungstage an – im Gegensatz zu den spontan differenzierenden Zellen, welche allesamt viel weniger Sox17 aufwiesen (Abb. 22 (A)). Bei der Mittelung der durchgeführten

Versuche (n=3) zeigten die Transkriptdaten den tendenziell höchsten Sox17-Peak in der Gruppe, welche 5 mM Glukose von Anbeginn der Differenzierung (Tag 0) bis zu Tag 12 erhalten hatte. In allen mit Aktivin A behandelten Gruppen wurde zudem eine Minderung der Expression von Sdf1, dem Marker des extraembryonalen Entoderms, registriert. Hinsichtlich der unterschiedlichen Glukose-Konzentration zeigten sich jedoch kaum Unterschiede (Abb. 22 (C)).

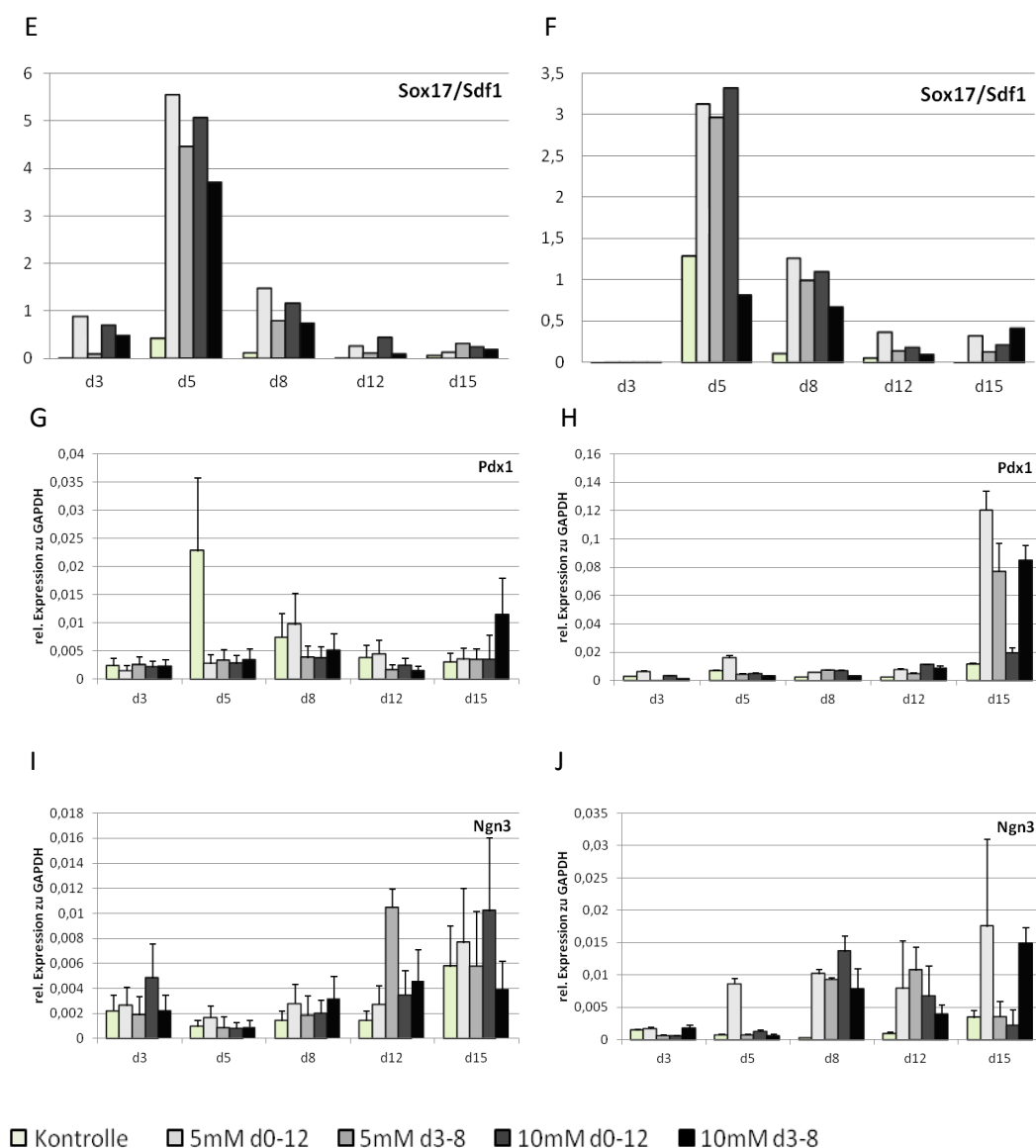


Abb. 23 Transkriptdaten der Expression von Pdx1 (G, H) und Ngn3 (I, J) in CGR8 unter 5 mM (hellgrau) und 10 mM Glukose (dunkelgrau). (E, F) zeigen das Verhältnis von Sox17 zu Sdf1. Linksseitig die gemittelten Werte aller Versuche (N=3, n=3) mit Standardfehler (SEM), rechtsseitig Daten eines Versuchs mit Standardabweichung als repräsentatives Beispiel.

Nachdem das Verhältnis von Sox17 zu Sdf1 berechnet wurde, zeigte sich ein geringfügig höherer Anteil an definitivem Entoderm in der Gruppe, welche von Tag 0 an unter 5 mM Glukose differenziert wurde. Hinsichtlich des Vorhandenseins von Pdx1 (Marker der pankreatischen Progenitorzellen) konnte bei der Mittelung der Daten kaum ein Unterschied der

gerichteten zur spontanen Differenzierung nachgewiesen werden (Abb. 22 (G)). Auch wenn einzelne Versuche eine Erhöhung seiner Expression in einzelnen Gruppen zeigten (Abb. 22 (H)), so ließen sich diese Tendenzen in den Wiederholungsversuchen nicht nachvollziehen. Dasselbe galt auch für die Expression von Ngn3, welches im Mittel von 3 Versuchen auch kaum einen Unterschied zur spontanen Differenzierung zeigte (Abb. 22 (I)).

4.3.4 Detektion von Glukose-sensiblen Intervallen während der frühen pankreatischen Differenzierung

Da die Zufuhr der moderaten Glukose-Konzentrationen 5 und 10 mM Glukose keine außerordentlichen Effekte auf das Maß der Gewinnung pankreatischer Vorläuferzellen erbracht hatte, wurde in den folgenden Versuchen ein anderes Extrem gewählt. Die differenzierenden Zellen wurden nun mit 50 mM Glukose, dem 10 fachen der *in vivo* physiologisch vorliegenden Konzentration, belastet.

Abhängigkeit der Differenzierungseffizienz vom Zeitpunkt der Glukose-Exposition

Das erste Ziel bestand auch hierbei in der Detektion besonders Glukose-sensibler Intervalle während des pankreatischen Differenzierungsprozesses. Das Medium der gerichtet differenzierenden Zellen wurde nun zum einen von Tag 0 bis 12, zum anderen von Tag 3 bis 5 sowie von Tag 3 bis Tag 8 mit 50 mM Glukose versetzt. Zur Kontrolle wurden spontan und nach dem Standardprotokoll unter denselben Kulturbedingungen differenzierende Zellen ebenfalls mittels analysiert.

Betrachtete man die Veränderung der Morphologie der Zellen im Verlauf der 15-tägigen Differenzierung, so zeigten sich gegen Ende des Protokolls auffällige Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die spontan differenzierenden Zellen nahmen, wie schon beschrieben, ein inhomogenes Äußeres an, ein überwiegender Zelltyp konnte nicht beobachtet werden (Abb. 24 (a, b)). Ihr Wachstum wurde nur durch die Grenzen ihrer Kulturschale begrenzt.

In den gerichtet differenzierenden Gruppen zeigten sich die größten Unterschiede zwischen den gemäß des etablierten (Standard-) Protokolls kultivierten Zellen und der Gruppe, welche mit 50 mM Glukose von Tag 3 bis Tag 8 kultiviert wurde (Abb. 24 (c-f)). Bei der ersteren zeigten sich ab Tag 12 erste neuronale Strukturen, die an Größe und Zahl bis Tag 15 stetig zunahmen. Dem gegenüber stand eine nur geringe Anzahl an epithelartigen Zellverbänden, welche sich inselförmig von den anderen Zellen abhoben. Versetzte man das Differenzierungsmedium allerdings von Tag 3 bis Tag 8 mit einer hohen Glukosekonzentration, formierten sich diese epithelartigen Verbände bereits an Tag 12, um während der verbleibenden 3 Tage an Größe und Anzahl zuzunehmen. Zum Ende des Protokolls waren die nahezu runden inselartigen Cluster in dieser Form ausschließlich in dieser Gruppe zu detektieren (Abb. 24 (f)).

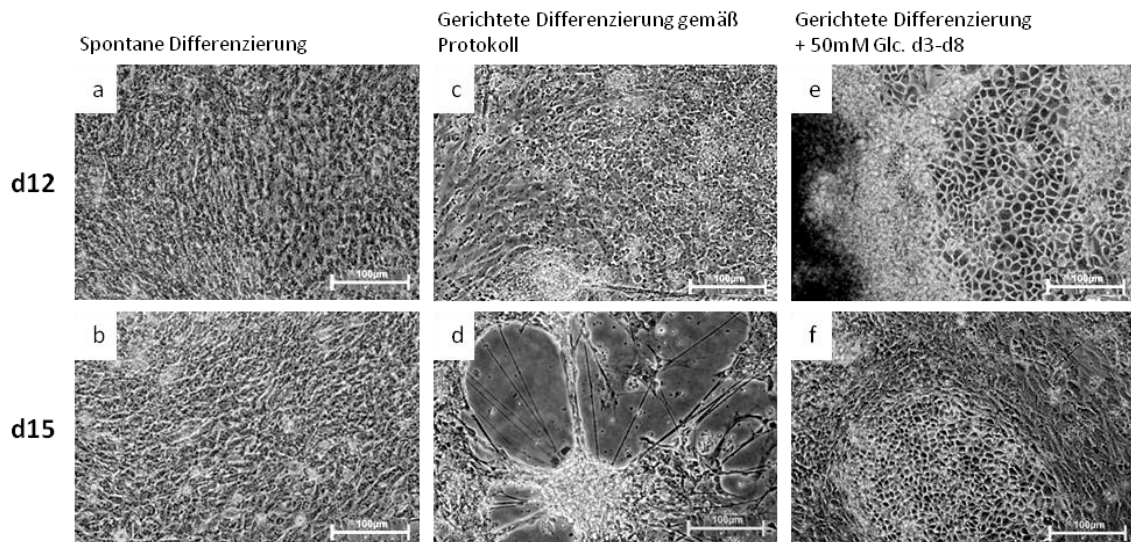


Abb. 24 Morphologische Unterschiede während der spontanen (a, b) und gerichteten (c-f) Differenzierung von CGR8. Zellen, die im Standardmedium differenziert wurden, wiesen einen viel höheren Anteil neuronaler Strukturen (d) auf als Zellen, denen 50 mM Glukose (Glc.) von Tag 3-8 zugesetzt wurde. Letzter formierten im Gegenzug ab dem 12. Tag epithelartige Verbände (e), welche an Tag 15 als inselartige Cluster (f) erschienen (Maßstab: 100 µm).

Die anderen Gruppen, denen die 50 mM Glukose von Differenzierungsbeginn bis Tag 12 beziehungsweise von Tag 3 bis Tag 5 beigefügt worden war, zeigten am Ende der Versuche mit Ausnahme der schon beschriebenen hohen Apoptoserate keine besonderen Zelltypen. Hier vermischten sich zu gleichen Teilen neuronale Strukturen mit schlagenden Clustern und fibroblastenartigen Zellverbänden. Inselartige Formationen wurden nicht vorgefunden.

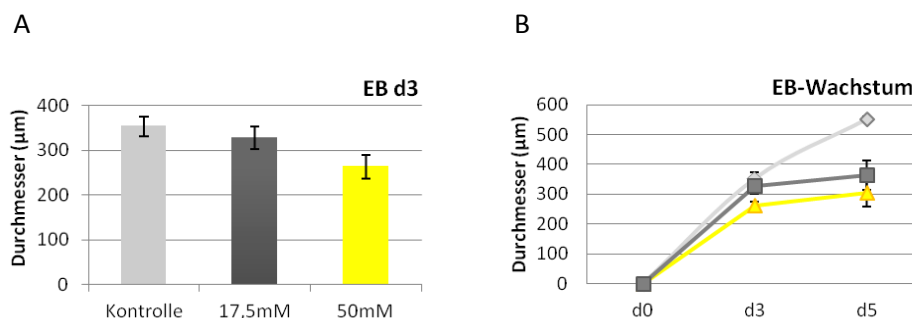


Abb. 25 Durchmesser von *embryoid bodies* nach gerichteter Differenzierung mittels Standardmedium (17,5 mM Glukose) und Zusatz von 50 mM Glukose. Betrachtet wurde die Größe an Tag 3 (A) und der Größenzuwachs während der Suspensionskultur (B) (N=1, n=10).

Um etwaige direkte Einflüsse der hohen Glukose auf die EB-Bildung zu dokumentieren, wurden die Durchmesser von jeweils 10 *embryoid bodies* an Tag 3 und Tag 5 ausgemessen. EBs unter 50 mM Glukose zeigten sich von kleinerer Größe, wuchsen aber in gleichem Maße wie

ihre unter 17,5 mM kultivierten Pendants. Allein die spontan differenzierten EBs, die im Mittel an Tag 3 zwar nur leicht größer als die gerichtet differenzierten waren, wuchsen innerhalb der 3 Tage währenden Suspensionskultur auf fast das Doppelte ihrer an Tag 3 gemessenen Größe (Abb. 25).

Der qualitative Nachweis bedeutender Meilensteine der Differenzierung erfolgte abermals mittels RT-PCR. In der folgenden Abbildung werden die Ergebnisse der RNA-Analyse von Tag 5, 8, 12 und 15 dargestellt.

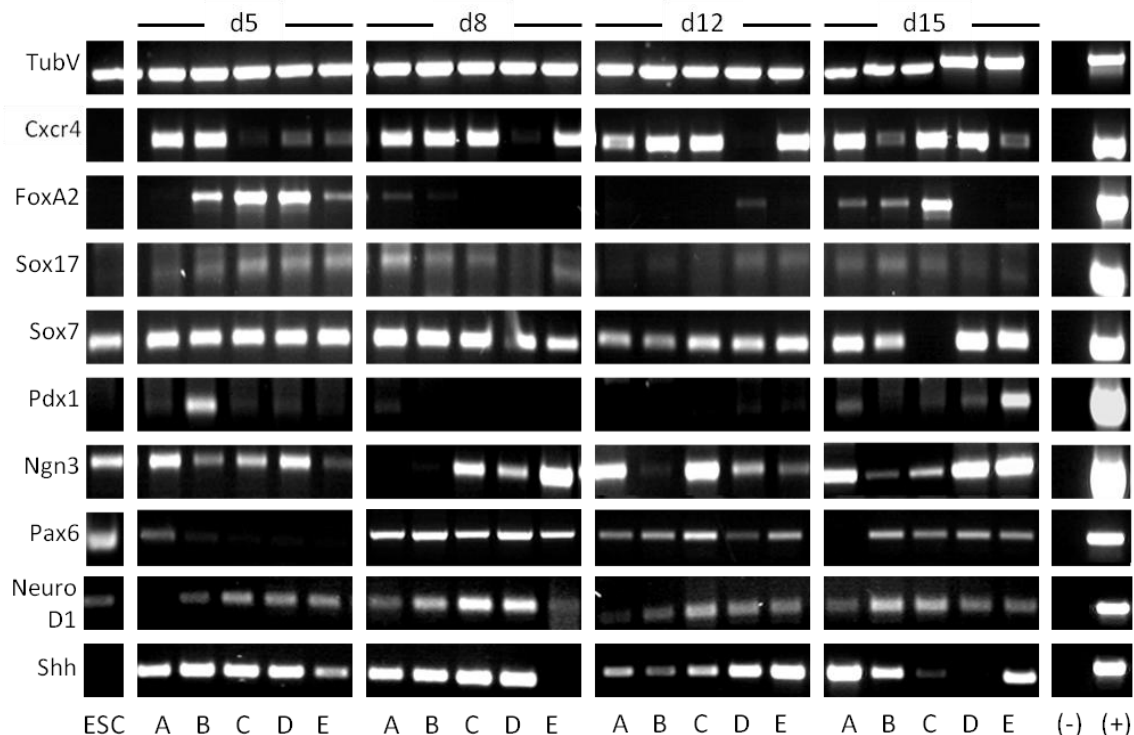


Abb. 26 Repräsentative Transkriptdaten im Verlauf der pankreatischen Differenzierung. (A) spontane Differenzierung, (B) Diff. nach Standardprotokoll, (C) 50 mM Glc. Tag (d) 0-12, (D) 50 mM Glc. d3-5, (E) 50 mM Glc. d3-8. Gezeigt wird die Expression von Markern des definitiven Entoderms (Cxcr4, FoxA2, Sox17), des definitiven Entoderms (Sox7), der pankreatischen (Pdx1) und endokrinen (Ngn3, NeuroD1, Pax6) Vorläufer sowie des neuronalen Ektoderms (Shh). Nachweis der erfolgreichen cDNA-Synthese durch TubV (*housekeeping-gen*). (-) Negativkontrolle, (+) Positivkontrolle.

Bei sämtlichen Gruppen konnte die Expression der Marker des definitiven Entoderms Cxcr4, FoxA2 und Sox17 nachgewiesen werden (Abb. 26). Cxcr4 konnte in allen Gruppen mehr oder minder stark zu jedem Zeitpunkt nachgewiesen werden, zeigte jedoch an Tag 5 in den beiden Kontrollgruppen die stärkste Bande, während die mit hoher Glukose behandelten Gruppen erst Tage später in diesem Umfang exprimierten. FoxA2 hingegen zeigte zwei Expressionspeaks, der erste zeigte sich besonders stark an Tag 5 und 15 in der mit 50 mM Glukose von Tag 0 bis 12 behandelten Gruppe (C). Behandelte man von Tag 3 bis 8 (E), war an diesen Tagen nur eine schwache Bande zu verzeichnen. Vergleicht man die gerichtet differenzierten Zellen

untereinander, wurde Sox17 in dieser Gruppe am stärksten an Tag 5 exprimiert. Ein Marker des extraembryonalen Entoderms, Sox7, konnte hier von der Stammzelle an in jeder Gruppe, unabhängig von gerichteter oder spontaner Differenzierung, nachgewiesen werden.

Pdx1, stellvertretend für das Vorhandensein pankreatischer Vorläuferzellen, wurde am stärksten an Tag 5 in der gerichtet differenzierten Kontrolle (B) und an Tag 15 in der von Tag 3 bis 8 mit hoher Glukose behandelten Gruppe exprimiert. Die embryonalen Stammzellen und sämtliche Gruppen an Tag 5 wiesen Ngn3 auf, einen Marker der endokrinen Entwicklung. An Tag 8 jedoch zeigten sich die stärksten Banden in den Gruppen, die Glukose von Tag 0 bis 12 (C) und Tag 3 bis 8 (E) erhalten hatten. Gruppe C erhielt sich die starke Bande bis Tag 12 um an Tag 15 Ngn3 nur noch schwach zu exprimieren. Am Ende des Protokolls konnte die stärkste Expression dieses Markers abermals in Gruppe E verzeichnet werden. Aber auch die anderen gerichtet differenzierten Gruppen wiesen Ngn3 auf – wenn auch in absteigender Menge. Jedoch wurde es zu diesem Zeitpunkt auch von einer großen Menge spontan differenzierter Zellen exprimiert.

Pax 6, welches zu einem frühen Differenzierungszeitpunkt für das Ektoderm, später jedoch für endokrine Vorläuferzellen steht, wurde an Tag 5 in den gerichtet differenzierten Proben herunter reguliert, wobei die schwächste Bande in Gruppe E nachweisbar war. Die spontan differenzierenden Zellen wiesen zu diesem Zeitpunkt den größten Anteil an Pax6 auf. An Tag 15 zeigt sich ein gegenteiliges Bild: die spontane Kontrolle wies keinerlei Pax6 auf, während es von den gerichtet differenzierten Zellen exprimiert wurde.

NeuroD1, ein weiterer Marker der endokrinen Vorläufer, konnte mit Ausnahme der spontan differenzierenden Zellen an Tag 5, jederzeit nachgewiesen werden. *Sonic hedgehog* (Shh), Marker des neuralen Ektoderms, konnte an Tag 5 in Gruppe E nicht nachgewiesen werden. Drei Tage später, an Tag 12, wurde in dieser Gruppe eine Bande detektiert, welche weitaus kräftiger schien als in allen anderen Gruppen. Abermals 3 Tage später zeigten die spontan differenzierten Zellen den größten Anteil an Shh, während es nun in Gruppe D (50 mM Glukose von Tag 3 bis 5) nicht nachweisbar war.

Um den Anteil der Marker Sox17, Sdf1 sowie Pdx1 und Ngn3 genauer abzuschätzen, wurde die Expression dieser Gene mittels *realtime*-PCR analysiert (Abb. 27). Hierbei wurden jeweils die einzelnen sowie das Mittel der Versuche betrachtet.

Hier zeigte sich wieder, dass in den gerichtet differenzierten Gruppen der Anteil an definitivem Entoderm im Vergleich zur spontanen Kontrolle unter Einfluss von Aktivin A erhöht war. Wurde 50 mM Glukose von Tag 3 bis Tag 8 hinzugefügt, erhöhte sich die Expression von Sox17 noch einmal (Abb. 27 (A, B)). Im Gegenzug konnte eine Senkung des Anteils an extraembryonalem Entoderm durch Aktivin A beobachtet werden (Abb. 27 (C, D)). Nachdem

Sox17 mit Sdf1 verrechnet wurde und damit das Verhältnis von definitivem zu extraembryonalem Entoderm sichtbar gemacht worden war, zeigte sich im Mittel der schnellste Anstieg der Expression von Sox17 in der letzten Gruppe (50 mM d3 bis 8).

Zellen, die von Differenzierungsbeginn mit 50 mM Glukose behandelt worden waren, wiesen einen langsameren, aber an Tag 8 höchsten Anstieg des definitiven Entoderms auf.

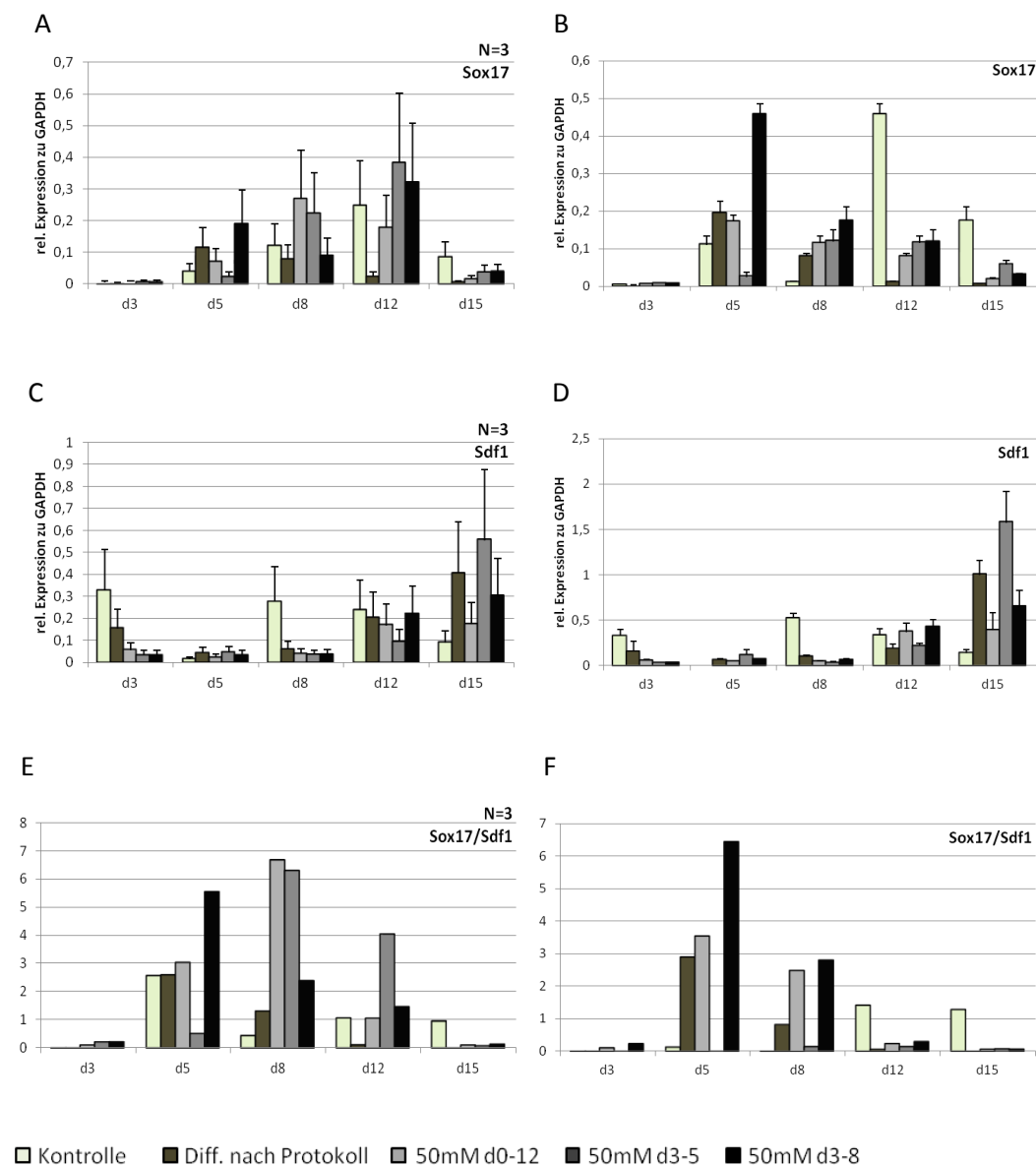


Abb. 27 Transkriptdaten der Expression von Sox17 (A, B) und Sdf1 (C, D) sowie das Verhältnis von Sox17 zu Sdf1 (E, F) in unter 50 mM Glukose pankreatisch differenzierten CGR8.

Linksseitig die gemittelten Werte aller Versuche (N=3, n=3) mit Standardfehler (SEM), rechtsseitig Daten eines Versuchs mit Standardabweichung als repräsentatives Beispiel.

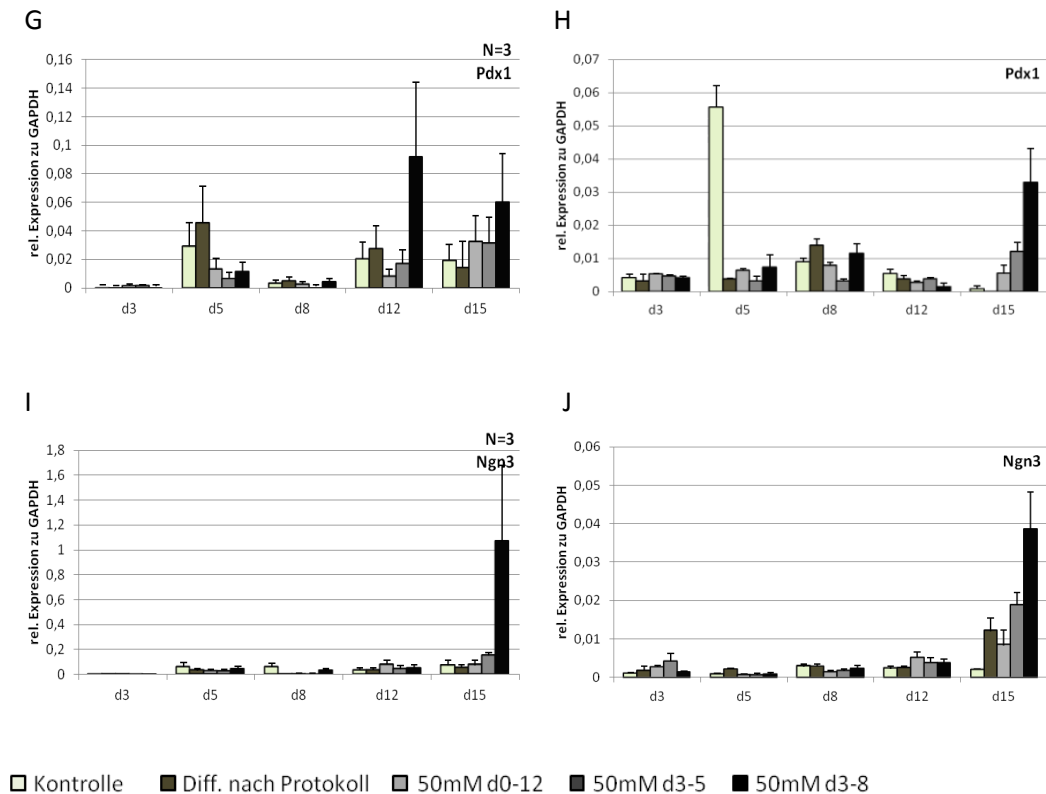


Abb. 28 Transkriptdaten der Expression von Pdx1 (G, H) und Ngn3 (I, J) in unter 50 mM Glukose pankreatisch differenzierten CGR8. Linksseitig die gemittelten Werte aller Versuche (N=3, n=3) mit Standardfehler (SEM), rechtsseitig Daten eines Versuchs mit Standardabweichung als repräsentatives Beispiel.

Betrachtete man die Expression von Pdx1, so zeigte sich bei der Mittelung (Abb. 28 (G)) der Versuche der höchste Peak an Tag 12 und 15 in den Zellen, welche 50 mM Glukose von Tag 3 bis 8 erhalten hatten. Dieses Ergebnis spiegelte sich in allen Einzelversuchen wieder. Außergewöhnlich hohe Werte wie in der Kontrollgruppe an Tag 5 (Abb. 28 (H)) blieben auf einzelne Versuche beschränkt und waren nicht reproduzierbar. Ähnliche Muster zeigte auch die Expression von Ngn3 (Abb. 28 (I) und (J)). An Tag 15 konnte eine deutliche Erhöhung seiner Expression in genau dieser Gruppe (50 mM Glukose von Tag 3 bis 8) in allen Versuchen verzeichnet werden (repräsentatives Beispiel siehe Abb. 28 (J)). Mittelte man alle 3 Versuche, zeigte sich folglich die mit Abstand höchste Expression in dieser Gruppe. An keinem anderen Tag und in keiner anderen Gruppe konnten ähnliche Werte ermittelt werden.

Abschließend wurden die an Tag 15 gewonnenen immunfluoreszenzgefärbten Proben auf das Vorhandensein der Transkriptionsfaktoren PDX1 und NGN3 analysiert. Auch hier zeigten sich, ähnlich den schon beschriebenen morphologischen Veränderungen, die größten Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen und den Zellen, welche mit 50 mM Glukose von Tag 3 bis 8 behandelt worden waren.

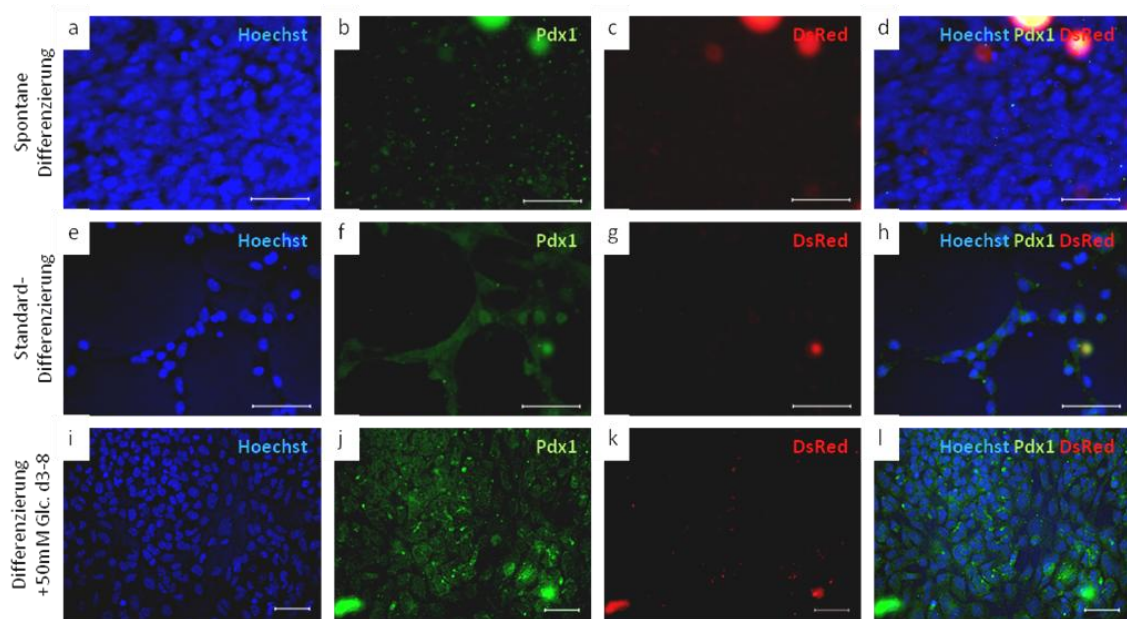


Abb. 29 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von spontan (a-d) und gerichtet differenzierten Zellen (e-l). Letztere wurden laut Standardprotokoll (e-h) sowie unter Zufuhr von 50 mM Glukose (Glc.) von Tag 3 bis 8 (i-l) differenziert. Dargestellt sind die Kernfärbung der Zellen mit Hoechst, die spezifische Detektion von PDX1 sowie Kontrolle von unspezifischen Bindungen mittels DsRed bei 40- und 20facher Vergrößerung (Maßstab: 50µm).

Die spontan differenzierten Zellen, welche durch ihre außerordentlich hohe Zellzahl und kleine Zellkerne auffielen, wiesen keinerlei PDX1 auf (Abb. 29 (a-d)). Betrachtete man die laut Standardprotokoll differenzierten Zellen, so war zum einen der hohe Anteil neuronaler Zellen auffällig. Zum anderen ließen sich zwar die Zytoplasmen dieser Formationen positiv anfärben, jedoch nur wenige Zellkerne, in welchem der Transkriptionsfaktor PDX1 zu erwarten gewesen wäre (Abb. 29(f)). In Zellen, welche von Tag 3 bis 5 sowie Tag 0 bis 12 mit 50 mM Glukose behandelt worden waren, konnte keine spezifische Bindung des Antikörpers an PDX1 gezeigt werden.

Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen, welche von Tag 3 bis Tag 8 der Glukose ausgesetzt worden waren, ein anderes Bild: große, epithelartige Zellen formierten sich zu Clustern und grenzten sich somit von den angrenzenden Formationen aus kleineren Zellen ab (Abb. 30 (a-c)). Die Zellen innerhalb dieser Cluster zeigten PDX1-positive Zellkerne, welche außerhalb nicht zu beobachten waren. Bei diesen Zellen färbte sich lediglich die Zellmembran grün an.

NGN3 konnte in keiner der 5 Gruppen fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. Weder die spontan noch die gerichtet differenzierten Zellen zeigten einen positiven Befund.

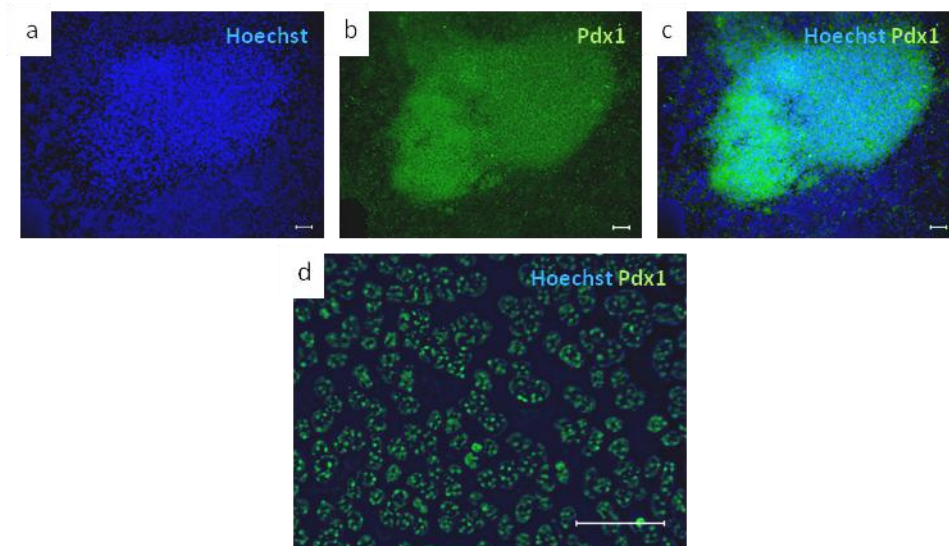


Abb. 30 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung PDX1-positiver Zellen an Tag 15 nach Behandlung mit 50 mM Glukose von Tag 3 bis 8. Zu beobachten waren clusterartige Formationen, die sich deutlich von den umgebenden Zellen abhoben (a-c). Diese Zellen weisen PDX1 innerhalb ihres Zellkerns auf (d). Darstellung in 10- und 40facher Vergrößerung (Maßstab: 50µm).

4.3.5 Einfluss der Höhe der Glukose-Konzentration auf die Differenzierungseffizienz

Da die vorausgegangenen Experimente den Schluss nahe legten, dass Glukose sehr wohl einen Einfluss auf die Differenzierungseffizienz von embryonalen Stammzellen in pankreatische Vorläuferzellen hat, wurde im Folgenden ausgetestet, inwiefern diese von der verwendeten Glukose-Konzentration abhängig ist. Da 50 mM (900 mg/dl) zu einer sehr hohen Belastung der Zellen mit entsprechend hoher Apoptoserate führen und das herkömmliche Differenzierungsmedium 17,5 mM (315 mg/dl) Glukose enthält, wurden die Konzentrationen zwischen diesen zwei Endpunkten gewählt. Direkt verglichen wurden 20, 30 und 50 mM Glukose.

Die vorausgegangenen Versuche zeigten außerdem auf, dass weiterhin der Zeitpunkt der Glukose-Gabe untersucht werden sollte. Aus diesem Grunde wurden die oben genannten Konzentrationen zum einen von Tag 0 bis 12 und zum anderen von Tag 3 bis 8 dem Differenzierungsmedium zugegeben.

Die Darstellung der folgenden Ergebnisse zeigt die murinen embryonalen Stammzellen, deren Medium von Differenzierungsbeginn (Tag 0) bis Tag 12 jeweils 20, 30 und 50 mM Glukose zugesetzt wurde.

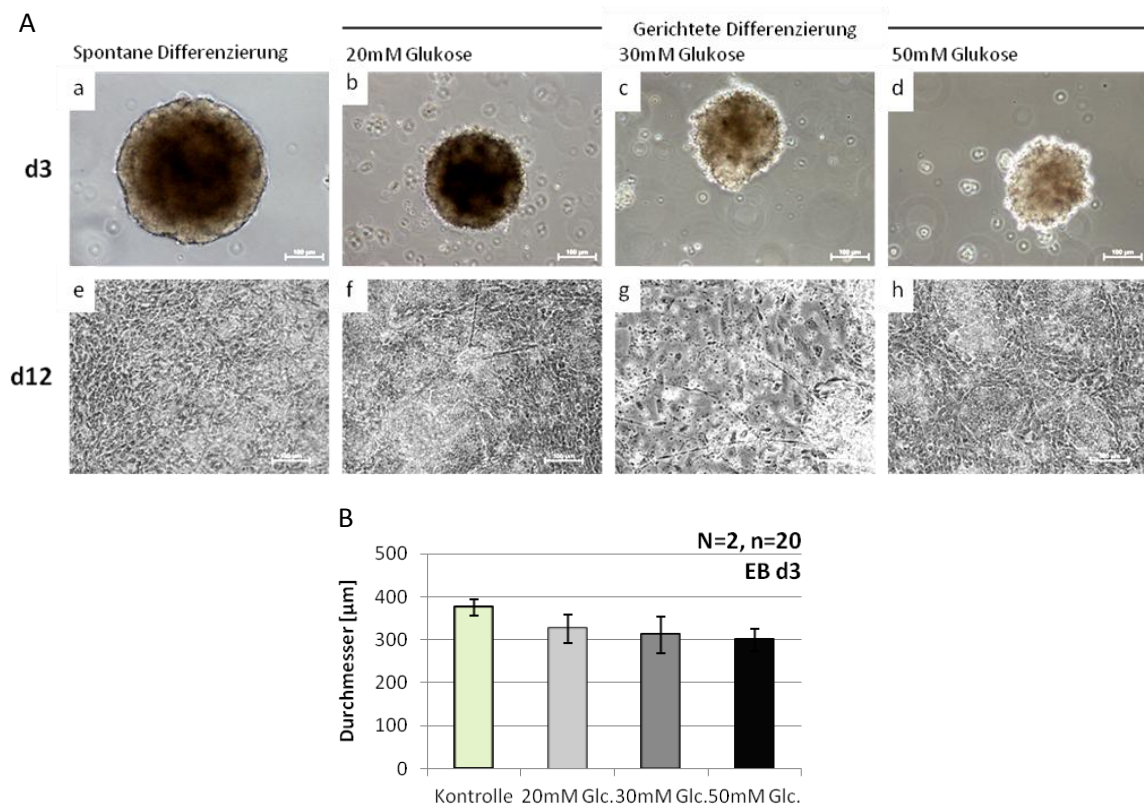


Abb. 31 Morphologische Unterschiede im Verlauf der gerichteten Differenzierung von Tag (d) 0-12 unter Zusatz von 20, 30 und 50 mM Glukose.

(A) Mit Zunahme der Glukose-Konzentration verloren die sich formierenden EBs sowohl ihre runde Form, als auch ihre mechanische Stabilität (b-d) und Größe. An Tag 12 nahm mit steigender Glukose-Konzentration die Anzahl von neuronalen Zellen ab, die Anzahl toter Zellen stieg mit der Höhe der Glukose-Konzentration (Maßstab: 100µm). (B) EB-Durchmesser an Tag 3 im *hanging drop*.

Morphologisch zeigten sich während des Differenzierungsprozesses Unterschiede zwischen den Gruppen sowohl in der Größe der wachsenden EBs als auch im Verlauf des Differenzierungsprozesses. Über die charakteristische Morphologie spontan differenzierender Zellen wurde schon ausführlich berichtet, weshalb im Folgenden nur auf die gerichtet differenzierenden Zellen eingegangen werden soll. Nach Kontrolle der EB-Bildung an Tag 3 fiel vor allem die Form der entstandenen EBs auf: mit zunehmender Glukose-Konzentration verloren sie zusehends ihre runde Form und schienen durch ihre aufgelockerte Konsistenz geringfügig kleiner zu werden (Abb. 31 A (b-d), B). Viele EBs der 50 mM Gruppe dissoziierten vollständig bei mechanischer Belastung, zum Beispiel beim Abspülen an Tag 3.

Am 12. Tag der Versuche fiel bei der Betrachtung der sich differenzierenden Zellen die Abnahme der Anzahl neuronaler Strukturen mit steigender Glukose-Konzentration auf. Die unter 20 mM Glukose differenzierten Zellen formierten sich zu knotenartige Strukturen, von denen dicke, große Neurone ausgingen, die sich in deutlich sichtbarem Abstand brückengleich über die anderen Zellen spannten (Abb. 31 A (f)). Unter 30 mM Glukose waren lediglich zarte

neuronale Ausläufer auf dem Boden der Kulturschale auffindbar (Abb. 31 A (g)). Diese konnte man in der letzten (50 mM) Gruppe nur noch selten sehen; dafür allerdings an Tag 12 wirbelartige Strukturen, welche in den letzten Tagen der Differenzierung einen zusehends epithelartigen Charakter annahmen (Abb. 31 A (h)). Inselartige Cluster, wie in den vorherigen Versuchen beschrieben, waren nicht zu finden; dafür jedoch vermehrt schlagende Zellen in den unter 20 und 30 mM Glukose differenzierten Gruppen. Der Anteil toter Zellen schien mit der Zunahme der Glukose-Konzentration zu steigen.

Bei der Analyse der gewonnenen RNA-Proben zeichneten sich die folgenden Ergebnisse ab (Abb. 32). *Cxcr4*, ein Marker des definitiven Entoderms, war in den ersten Tagen der Differenzierung nur sehr schwach detektierbar. Erst ab Tag 8 konnte in allen gerichtet differenzierten Gruppen eine deutliche Bande nachgewiesen werden. *FoxA2* hingegen ließ sich in allen Gruppen, auch bei den spontan differenzierten Zellen, schon an Tag 3 aufzeigen. Die kräftigste Expression zeigte es allerdings an Tag 5 in den mit 20 mM Glukose (B) behandelten Zellen.

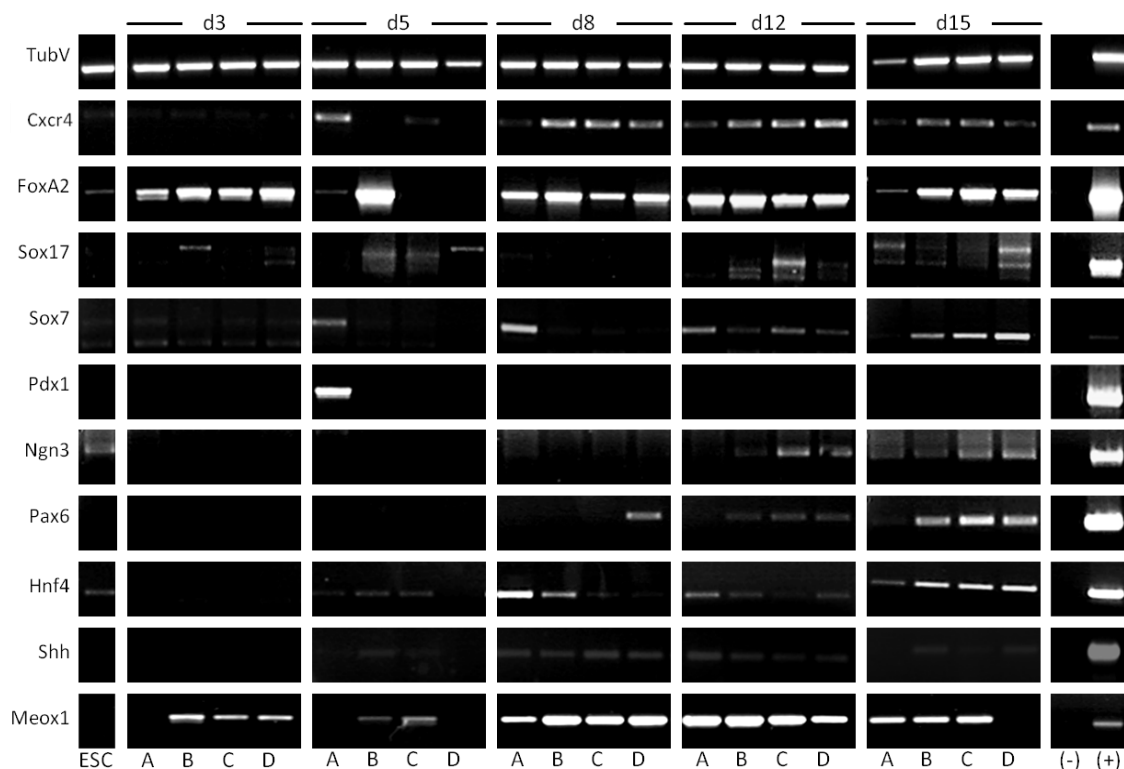


Abb. 32 Repräsentative Transkriptdaten im Verlauf der pankreatischen Differenzierung unter 20, 30 und 50 mM Glukose. (A) spontane Differenzierung, (B) gerichtete Differenzierung unter 20 mM, (C) unter 30 mM, (D) unter 50 mM Glukose. Gezeigt wird die Expression von Markern des definitiven Entoderms (*Cxcr4*, *FoxA2*, *Sox17*), des extraembryonalen Entoderms (*Sox7*), der pankreatischen (*Pdx1*), hepatischen (*Hnf4*) und endokrinen (*Ngn3*, *Pax6*) Vorläufer sowie des neuronalen Ektoderms (*Shh*) und des Mesoderms (*Meox1*). Nachweis der erfolgreichen cDNA-Synthese durch Tubulin V. (-) Negativkontrolle, (+) Positivkontrolle.

Auch Sox17 wurde an Tag 5 in dieser Gruppe und unter 30 mM Glukose (C) nachgewiesen. Einen weiteren Peak erfuhr dieses Gen gegen Ende des Differenzierungsprotokolls. Sox7, Marker des extraembryonalen Entoderms, war stets in den spontan und ab Tag 12 auch in den gerichtet differenzierten Zellen sichtbar. Der Nachweis der Existenz von pankreatischen Vorläuferzellen durch die Expression von Pdx1 konnte nur an Tag 5 in der Kontrollgruppe vollzogen werden. Ngn3 und Pax6 hingegen zeigten sich schwach, aber sichtbar an Tag 15 in allen gerichtet differenzierten Gruppen. Shh, stellvertretend für das neuronale Ektoderm, war von Tag 8 bis 12 in allen, an Tag 15 nur noch in den gerichtet differenzierten Gruppen nachweisbar. Um in Hinblick auf die schlagenden Zellen das Vorhandensein von Zellen des Mesoderms zu überprüfen, wurde die Expression von Meox1 semiquantitativ dargestellt. Dieses war bis zu Tag 8 am stärksten in den gerichtet differenzierenden Zellen zu finden. An Tag 12 jedoch verzeichnete die Kontrollgruppe den größten Anteil, welcher dann mit steigender Glukose-Konzentration abzunehmen schien. Zu Protokollende war nach Behandlung mit 50 mM Glukose (D) kein Meox1 mehr zu finden.

Im Anschluss wurden abermals die Gene Sox17, Sdf1, Pdx1 und Ngn3 quantitativ mittels *realtime*-PCR analysiert (Abb. 33).

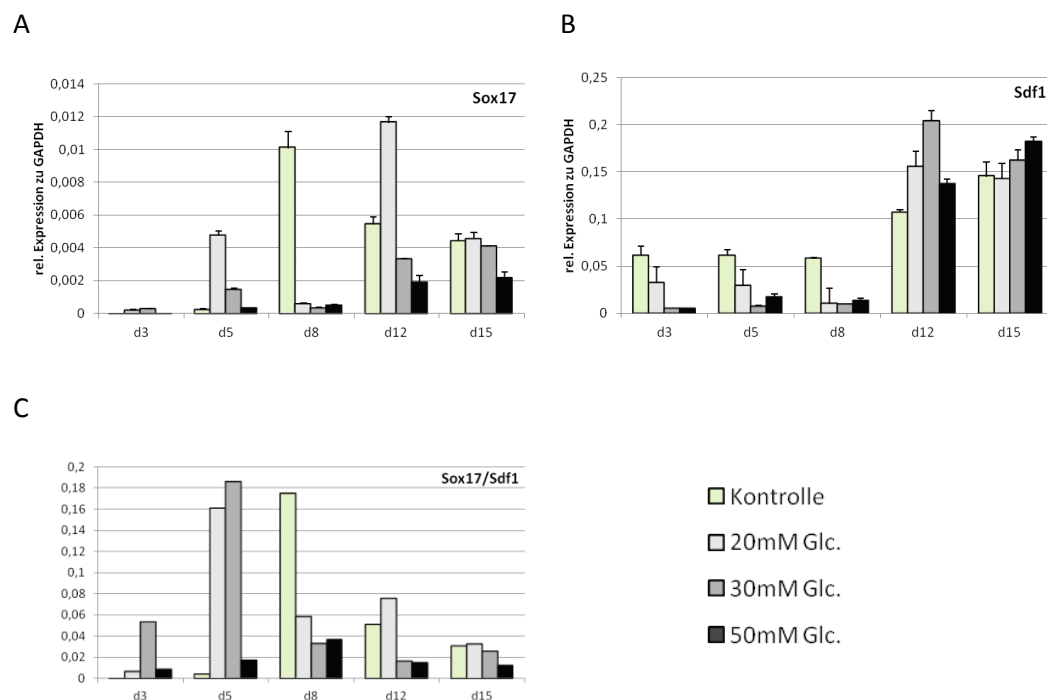


Abb. 33 Repräsentative Transkriptdaten der Expression von Sox17 (A) und Sdf1 (B) sowie das Verhältnis von beidem (C) nach Differenzierung unter 20, 30 oder 50 mM Glukose von Tag (d) 0-12.

Die höchste Expression von Sox17 wurde hierbei stets in der Gruppe mit dem niedrigsten Glukosegehalt nachgewiesen (Abb. 33 (A)). Die Expression von Sdf1 konnte abermals im Vergleich zur Kontrolle in allen Gruppen zu Beginn der Differenzierung unterdrückt werden.

Vergleich man allerdings die gerichtet differenzierten Gruppen miteinander, so wiesen Zellen mit 20 mM Glukose von Tag 3 bis 8 den höchsten Anteil an extraembryonalem Entoderm auf (Abb. 33 (B)). Um die Zellen des extraembryonalen Entoderms aus der Betrachtung auszuschließen, die Sdf1 und Sox17-positiv sind, wurde Sox17 mit Sdf1 verrechnet und graphisch dargestellt (Abb. 33 (C)). Hier zeigte sich, dass der Anteil der alleinig Sox17-positiven Zellen an Tag 3 und 5 unter 20 und 30 mM Glukose am höchsten war. 50 mM Glukose, von Tag 0 an gegeben, ließ die Zellen nur in geringem Maße Sox17 exprimieren.

Beim Vergleich der Transkriptdaten der Gene Pdx1 und Sox17 konnte keinerlei Übereinstimmung zwischen den durchgeführten Versuchen (N=3) gezeigt werden, weshalb diese Daten in dieser Arbeit nicht aufgeführt werden. Auffällig war lediglich die außerordentlich geringe Menge an exprimierten Pdx1 und Ngn3, welche sich kaum über das Niveau der spontan differenzierten Zellen heraus hob.

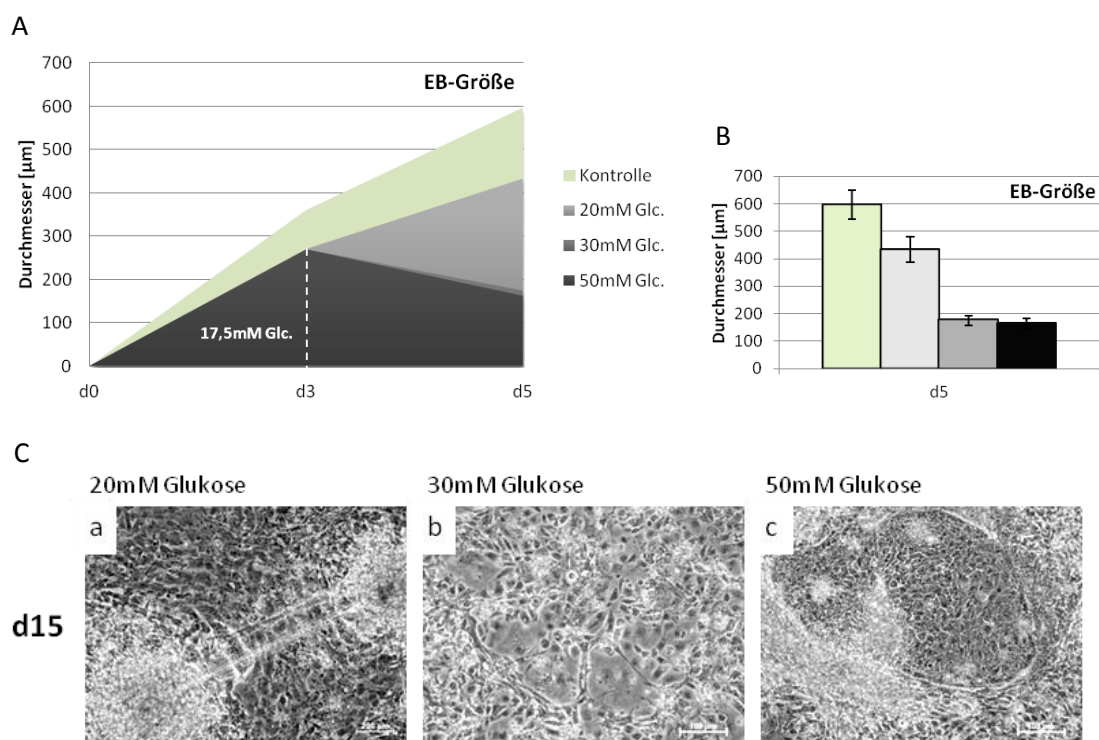


Abb. 34 Darstellung des EB-Wachstums nach Exposition mit 20, 30 oder 50 mM Glukose ab Tag (d) 3. (A) In der Zeit des hängenden Tropfens (d0-3) wurden die Zellen mit Standardmedium (17,5 mM Glukose) kultiviert. Erhöhung der Glukose-Konzentration führt zu einer Größenminderung (B). Größenverhältnisse der einzelnen Gruppen mit Standardabweichung (N=2, n=20). Ab einer Glukose-Konzentration von 30 mM waren entstandene EBs dreimal kleiner als die spontan differenzierte Kontrolle. (C) Kultivierung im Monolayer an d15. Abnahme der Anzahl neuronaler Zellen mit zunehmender Glukose-Konzentration (Maßstab: 100 µm).

Im Anschluss wurde die Abhängigkeit der Glukose-Konzentration auf die pankreatische Differenzierung während der Tage 3 bis 8 analysiert, da dieser Zeitraum laut der vorhergehenden Versuche als besonders Glukose-sensibel erachtet wurde.

Hier kam es nach der Behandlung mit den besonders hohen Glukose-Konzentrationen ab Tag 3 zu einem sehr hohen Zellsterben. Die betroffenen EBs erfuhren eine starke Wachstumsretardierung und zeigten an Tag 5, nach zweitägiger Glukose-Exposition, lediglich ein Drittel der Größe der Kontrollgruppe (Abb. 34 (B)). Im Hinblick auf ihren Durchmesser an Tag 3 hatten die EBs sogar an Größe verloren, wobei hierbei kaum ein Unterschied zwischen der Gruppe unter 30 und 50 mM Glukose festgestellt wurde (Abb. 34 (A)). Unter 20 mM Glukose differenzierte Zellen nahmen weiter an Größe zu.

Betrachtete man die Zellen, die die Kulturschalen an Tag 15 bevölkerten, zeigte sich in der Gruppe mit der niedrigsten Glukose ein bekanntes Bild: Zellen, welche von Tag 3 bis 8 unter 20 mM Glukose gewachsen waren, formierten sich vermehrt zu neuronalen Strukturen. Kleine Zellen wuchsen übereinander und bildeten hügelartige Cluster, welche durch kräftige, aus mehreren Zellen bestehende neuronale Ausläufer miteinander verbunden schienen (Abb. 34 (C, a)). Mit Zunahme des Glukose-Gehaltes des Mediums wurden diese Strukturen immer weniger. So zeigten sich unter 30 mM Glukose nur noch zarte neuronale Ausläufer, welche sich kaum über den Boden der Kulturschale hinaushoben. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Versuchen konnte jetzt allerdings ein höherer Anteil toter Zellen beobachtet werden, welcher auch noch 7 Tage nach Beendigung der Glukose-Belastung auftrat (Abb. 34 (C, b)). Dieses hohe Zellsterben war bei Belastung mit 50 mM Glukose noch höher. In dieser Gruppe lösten sich im Verlauf der Differenzierung ganze „Zellteppiche“ vom Boden der Kulturschale. In die entstandenen Lücken wuchsen epithelartige Verbände, welche sich von den übrigen Zellen durch ihr dunkleres Zytoplasma und größeren Zelldurchmesser abgrenzten (Abb. 34 (C, c)). Bei lichtmikroskopischer Betrachtung in einer stärkeren Vergrößerung war zudem die rosettenförmige Anordnung dieser Zellen auffällig (Abb. 35 (b)). Derartige Formationen konnten in keiner anderen Gruppe beobachtet werden.

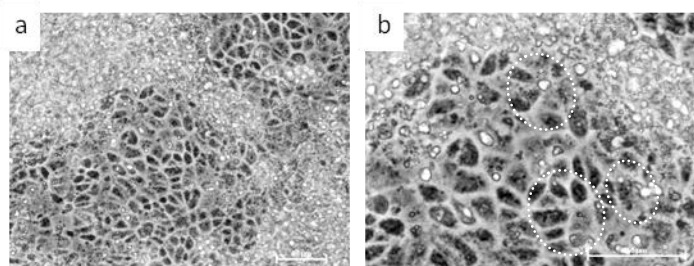


Abb. 35 Epithelartige Zellverbände am 15. Tag der Differenzierung nach Gabe von 50 mM Glukose von Tag 3-8. Auffällig war der Anteil an Zellen, welche rosettenförmig aufeinander zuliefen (Maßstab: 50 µm).

Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeiten zu den Versuchen, in welchen die Abhängigkeit der Differenzierungseffizienz von dem Zeitpunkt der Glukose-Gabe (50 mM) untersucht worden war, wurden nun die gewonnenen RNA-Proben gleich quantitativ analysiert.

Es wurde hierbei die Expression von Sox17 und Sdf1 im Hinblick auf den Anteil an definitivem Entoderm sowie Pdx1 und Ngn3 zur Analyse des Anteils pankreatischer Vorläuferzellen untersucht. Wegen des hohen Anteils an neuronalen Zellen wurde stellvertretend für das neuronale Ektoderm die Expression von NeuroD6 überprüft.

Analysierte man die Transkriptdaten der Expression von Sox17, dem Marker des definitiven Entoderms, so war die Tendenz auffällig, dass es an Tag 5 mit steigender Glukose-Konzentration im Differenzierungsmedium zu einer Erhöhung seines Anteils kam (Abb. 36 (A)). Gegenläufig verhielt sich die Expression von Sdf1, also des Anteils extraembryonalen Entoderms: im Mittel als auch in den Einzelversuchen zeigten Zellen, welche unter 20 mM Glukose kultiviert worden waren, einen viel höheren Anteil an Sdf1 als Zellen, denen von Tag 3 bis Tag 8 50 mM Glukose zugefügt worden war (Abb. 36 (C)).

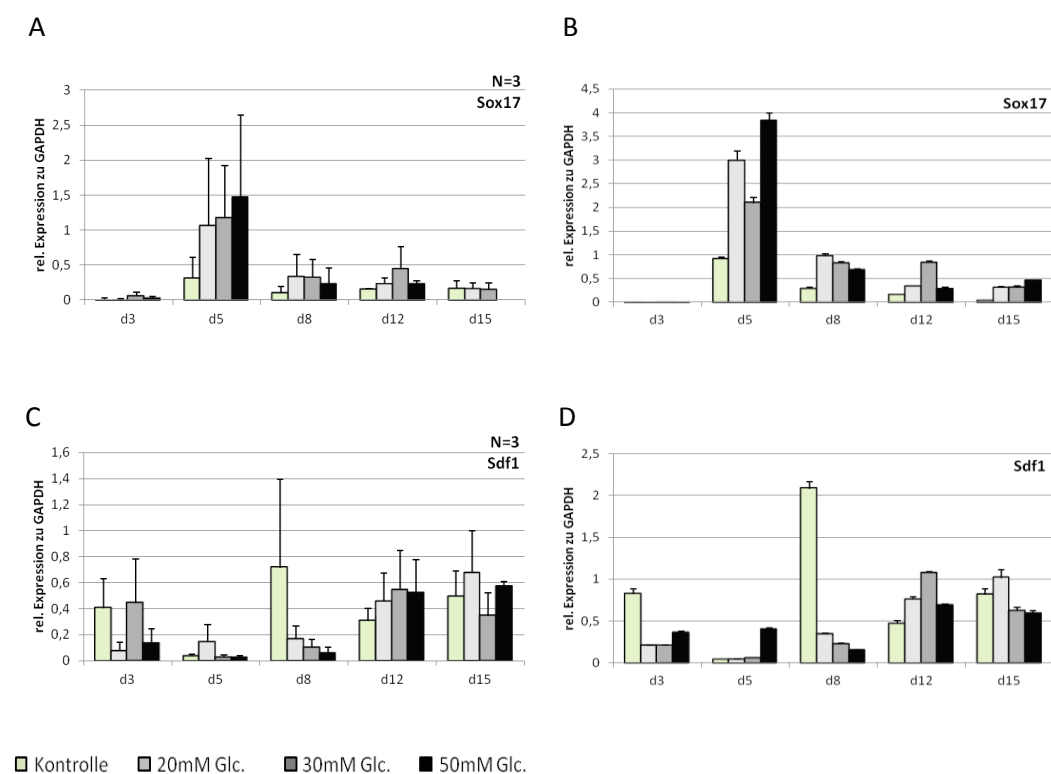


Abb. 36 Transkriptdaten der Expression von Sox17 und Sdf1 in unter 20, 30 und 50 mM Glukose pankreatisch differenzierten CGR8. Linksseitig die gemittelten Werte aller Versuche (N=3, n=3) mit Standardfehler (SEM), rechtsseitig Daten eines Versuchs mit Standardabweichung als repräsentatives Beispiel.

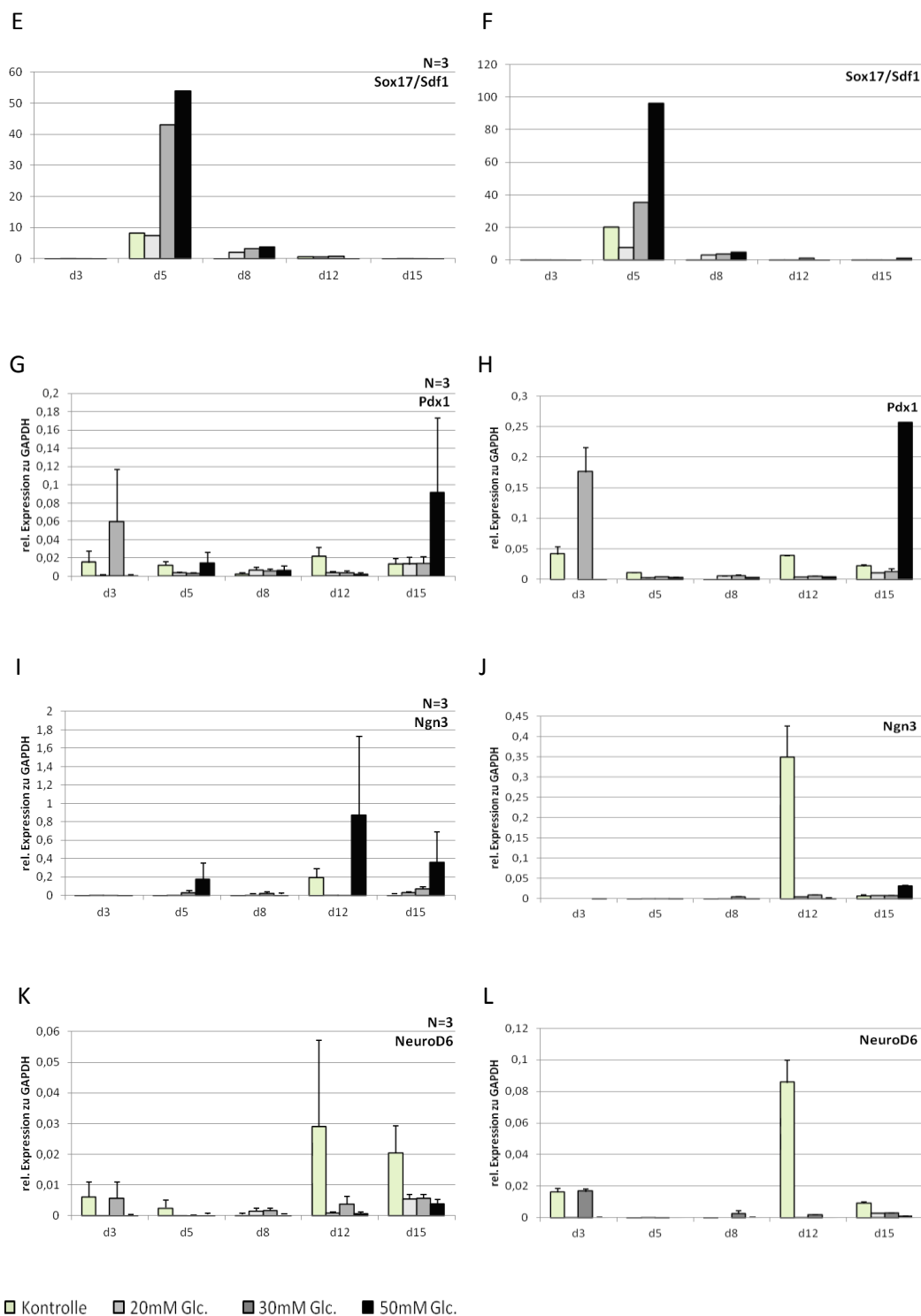


Abb. 37 Transkriptdaten der Expression von Pdx1, Ngn3 und NeuroD6 in unter 20, 30 und 50 mM Glukose differenzierten CGR8. Linksseitig die gemittelten Werte aller Versuche (N=3, n=3) mit Standardfehler (SEM), rechtsseitig Daten eines Versuchs mit Standardabweichung als repräsentatives Beispiel.

Berechnete man nun den Anteil der Zellen, welche allein dem definitiven Entoderm zuzuordnen waren, zeigten sich Parallelen zu den vorherigen Ergebnissen (Abb. 37 (E, F)): die Menge an exprimiertem Sox17 stieg mit zunehmender Glukose-Konzentration an, wobei der größte

Unterschied zwischen der 20 mM und 30 mM Glukose Gruppe zu finden war. Im Gegensatz zu den zwei anderen Konzentrationen wiesen Zellen unter 20 mM Glukose einen viel höheren Anteil an extraembryonalem Entoderm auf, so dass es im Verhältnis an Tag 5 zu derart geringen Werten kam, welche sich kaum über die der spontan differenzierten Zellen erhoben (Abb. 37 (E)). Des Weiteren fiel auf, dass an Tag 8 abhängig von der Höhe des Glukose-Gehaltes im Medium weiterhin definitives Entoderm vorhanden war. Die höchste Expressionsrate war abermals in der letzten Gruppe zu finden.

Pdx1, Marker der pankreatischen Vorläuferzellen, zeigte die stärkste Expression an Tag 15 in den Zellen, welche mit der höchsten Glukose-Konzentration kultiviert worden waren (Abb. 37 (F, G)). In einzelnen Versuchen konnte man eine größere Menge dieses Transkripts auch in anderen Gruppen, zum Beispiel den spontan differenzierten Zellen an Tag 3 (Abb. 37 (G)), nachweisen. Diese Ergebnisse konnten allerdings in den Folgeversuchen nicht reproduziert werden. Anschließend wurde die Expression von Ngn3, repräsentativ für den Anteil endokriner Vorläuferzellen, analysiert. Wurden die Ergebnisse aller 3 Versuche gemittelt, so zeigte sich die größte Expression dieses Markers auch in der 50 mM Glukose-Gruppe, allerdings an Tag 12. Betrachtete man jedoch einzelne Versuche (Abb. 37 (I)) an Tag 15, so ließ sich die stärkste Expression in der Gruppe mit der höchsten Glukose zeigen. Ausreißend in diesem repräsentativ gezeigten Versuch ist die Menge des an Tag 12 in den spontan differenzierten Zellen, welche weitaus höher als in jeder anderen Gruppe ist.

Wie eingangs schon beschrieben, wurde zum Schluss auch die Expression von NeuroD6 untersucht, um den Anteil neuronaler Zellen darstellen zu können, da diese sich auch Ngn3-positiv darstellen können. Betrachtete man nun den hier repräsentativ dargestellten Versuch (Abb. 37 (L)), konnte man den spontan differenzierten Zellen an Tag 12 einen extrem hohen Anteil an NeuroD6 zuordnen. Bei der Analyse der Zellen an Tag 15 fiel jedoch auf, dass mit steigender Glukose-Konzentration die Expressionsmenge dieses Markers abnahm (Abb. 37 (K), (L)).

5 Diskussion

Gegenstand umfangreicher Forschung ist die hochspezialisierte und in ihrer Entwicklung und späteren Funktion in eine Vielzahl komplexer Prozesse eingebundene beta-Zelle, von denen viele noch nicht vollständig untersucht und verstanden worden sind. Schon *in vivo* ist die Proliferationsrate einer beta-Zelle sehr niedrig, weshalb sich Kultur und Differenzierung schwierig gestalten. Um aus einer pluripotenten Zelle eine Insulin-produzierende beta-Zelle zu differenzieren, benötigt es unter anderem eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, welche, zu verschiedenen Zeitpunkten hinzugefügt, den physiologischen Entwicklungspfad *in vitro* nachvollziehen. Wichtige Signalwege werden dabei über Aktivin/Nodal, Hedgehog, Retinsäure, FGF und WNT beschriftet (Kroon et al., 2008; Schroeder et al., 2011). *In vivo* entfalten sich entwicklungsgeschichtlich aus der Stammzelle die 3 Keimblätter, aus dem entstandenen definitiven Entoderm entstehen über die Bildung des primitiven Darmrohrs pankreatische Vorläuferzellen, welche anschließend sich zu dukталen, exo- oder endokrinen Zellen ausdifferenzieren. Letztere wiederum teilen sich in die 5 verschiedenen hormonproduzierenden Zelltypen des endokrinen Pankreas auf, an denen die Insulin-herstellende beta-Zelle den größten Anteil hat.

Die Differenzierungsprotokolle pluripotenter Zellen, seien sie nun muriner oder humaner Herkunft, embryonaler, adulter oder auch induzierter pluripotenter Stammzellen haben die geringe Ausbeute an endokrinen Vorläufern und schlussendlich insulinproduzierenden, Glukose-sensitiven Zellen gemein. Durch Kultur in 3D-Aggregaten wird die spontane Differenzierung der Stammzellen in die Derivate aller 3 Keimblätter gefördert. Unter gleichzeitiger Zugabe von Aktivin A, welches als Mitglied der TGF- β -Familie den Nodal-Signalweg imitiert, wird die Entstehung von definitivem Entoderm gefördert (Sulzbacher et al., 2009). Später hinzugegebene Differenzierungsfaktoren wie das Alkaloid KAAD-Cyclopamin und das so genannte *small molecule* Indolaktam V sollen die entstehenden zukünftigen endokrinen pankreatischen (Vorläufer-) Zellen selektieren. Hierbei ist der Zeitpunkt der Gabe dieser Faktoren essentiell, um optimale Ergebnisse zu erhalten (D'Amour et al., 2006). Doch trotz aller Selektionsbemühungen lässt es sich nicht vermeiden, dass sich am Ende der Differenzierung immer noch ein heterogenes Zellgemisch in Kultur befindet (Sulzbacher et al., 2009). Das gilt auch für die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, in denen immer wieder undifferenzierte Zellen Gene verschiedenster Art fernab von den gewünschten Differenzierungsstadien exprimierten. Die Herausforderung liegt nun darin, die Anteile der verschiedenen Zellfraktionen zum richtigen Zeitpunkt zu Gunsten der pankreatischen Linie zu verschieben.

Es wurde beschrieben, dass zwei *de novo* synthetisierte Moleküle, IDE1 (2- [(6-carboxyhexanoyl)-hydrazonomethyl]benzoic acid) und IDE2 (7-(2-cyclopentylidenehydrazino)-7-

oxohepatoic acid), den Anteil definitiven Entoderms viel stärker erhöhen können als die alleinige Gabe von Aktivin A (Borowiak et al., 2009). Hierbei konnte man keinerlei Unterschiede zwischen den beiden *small molecules* im Hinblick auf ihre Differenzierungseffektivität zeigen, beide aktivieren einen Teil des TGF- β -Signalwegs über die Phosphorylierung von Smad2. Da ein möglichst hoher Anteil an definitivem Entoderm oder sogar die alleinige Generierung dieser Zellen die Voraussetzung für eine effiziente Differenzierung in Folgestadien ist, sollte ein möglicher Effekt dieser Stoffe auf die von uns verwendeten Zelllinien untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden unsere Sox17-DsRed mit denselben Konzentrationen an IDE1 und IDE2, wie in der Originalarbeit beschrieben, behandelt (Borowiak et al., 2009). Im Gegensatz zu den in der Literatur aufgezeigten Ergebnissen konnte anhand unserer murinen embryonalen Stammzellen keine Erhöhung der Ausbeute an definitivem Entoderm detektiert werden. Es gab weder auffällige Unterschiede im Anteil DsRed-positiver EBs, noch exprimierten mit IDE1 und/oder 2 behandelte Zellen mehr Sox17 oder weniger Sox7. Diese Unterschiede könnte man damit erklären, dass die Gruppe um die Autorin Borowiak eine andere murine embryonale Stammzelllinie verwendeten. Es handelte sich zwar auch um eine transgene Zelllinie, der das rot fluoreszierende Protein dTomato (eine Variante des DsRed) eingefügt wurde, aber diese murinen Stammzellen wurden nicht wie unsere CGR8- Zellen (und ihr transgenes Pendant, die Sox17-DsRed) *feederfrei* in Kultur gehalten. Ein weiterer Unterschied, welcher zu beachten wäre, ist der Umstand, dass die Differenzierung von Anfang an im Monolayer erfolgte. In unserem Protokoll erfolgten die ersten Differenzierungsschritte im *embryoid body*, welcher an sich schon fördernd auf die Entstehung aller 3 Keimblätter, ergo auch von definitivem Entoderm, wirkt. All dies beeinflusst den Differenzierungsprozess und letztendlich die Ausbeute an gewünschten Zellen. Folglich ist zu konstatieren, dass bei der Differenzierung embryonaler Stammzellen, genau wie in ihrer Kultivierung, zahlreiche Unterschiede zwischen den einzelnen Linien zu beachten sind, welche einen direkten Vergleich der Ergebnisse nicht immer zulassen. Als Konsequenz dieser Betrachtungen wurde in den folgenden Differenzierungsversuchen allein Aktivin A zur Erlangung definitiven Entoderms verabreicht.

Trotz einer Vielzahl von Untersuchungen zu den Einflüssen von Wachstumsfaktoren und anderen Molekülen wurden bis jetzt nur wenig Schwerpunkte auf die Betrachtung des Nährstoffgehaltes in der Umgebung der sich zukünftigen beta-Zelle gelegt. Die ausreichende Versorgung mit Nährstoffen während der Pränatalzeit ist entscheidend für die korrekte Entwicklung pankreatischer beta-Zellen. Es ist schon seit langem bekannt, dass eine Unterernährung des sich entwickelnden Fetus während dieser Zeit mit einer erniedrigten Anzahl zukünftigen Pdx1-positiver beta-Zellen einhergeht (Limesand et al., 2005; Park et al., 2008). Hierbei ist zudem die Art der zugeführten Nährstoffe entscheidend. Unter niedrigkalorischer Diät gewachsen, wiesen fetale Rattenpankreatata eine weitaus geringere Anzahl Pdx1-positiver

Inseln auf, als nach selektivem Entzug des Proteingehalts der mütterlichen Nahrung. Der Proteingehalt hatte keinerlei Einfluss auf die Entstehung Pdx1 und Ngn3-positiver Vorläuferzellen (Dumortier et al., 2007). Es wurde konstatiert, dass in den frühen Stadien der pankreatischen Entwicklung in Hinblick auf die Anzahl Langerhansscher Inseln eher der Kaloriengehalt der zugeführten Nahrung ausschlaggebend ist. Erst in späteren Stadien erwies sich der Proteingehalt als essentiell für eine ausreichende Vaskularisierung und Möglichkeit der Proliferation des entstehenden Gewebes. Ähnliche Ergebnisse konnten *in vitro* für Glukose gewonnen werden: an explantierten Rattenpankreatata wurde gezeigt, dass Glukose über die Regulation der Wechselwirkung zwischen Ngn3 und NeuroD für die Entwicklung von alpha- als auch beta-Zellen von entscheidender Bedeutung ist (Guillemain et al., 2007).

Die Bildung der EBs *in vitro* ist ein sehr sensibles System, welches gegenüber mechanischen und chemischen Einflüssen stark anfällig ist. Aus diesem Grund wurden die Zellen in den von uns durchgeführten Versuchen erst nach EB-Formierung und gesichertem Vorhandensein von definitivem Entoderm mit den geringen Glukose-Konzentrationen (0-1 mM) belastet. Die Auswirkungen des Glukose-Entzugs waren radikalen Ausmaßes: nach massivem Zellsterben innerhalb von 2 Tagen konnten am Ende der durchgeführten Versuche keine lebenden Zellen mehr detektiert werden. Die Gruppe um Guillemain beschrieb 2007, dass, um eine ausreichende Menge pankreatischer Vorläuferzellen zu erhalten, mindestens 5 mM Glukose im Medium von Nöten wären (Guillemain et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings, dass sich entwickelnde Stammzellen nicht allein mit einer Einschränkung ihrer Differenzierungsfähigkeit auf den Entzug der Glukose reagieren, sondern mit massivem Zellsterben.

Auf der Suche nach anderen Möglichkeiten des rapiden Zelltodes besteht die Möglichkeit, dass die Zellen durch den Mediumwechsel, welcher mit dem Glukoseentzug einherging, beeinträchtigt worden sein könnten. Um Glukose vollständig zu eliminieren, wurden die Zellen mit DMEM (Dulbeccos modified Eagle Medium) ohne Glukose kultiviert, welches im Hinblick auf die Konzentration einzelner Aminosäureverbindungen nicht vollständig mit dem vorherigen CDM (chemisch definiertem Medium) übereinstimmt. Allerdings ist hier auf Dumortiers Gruppe zu verweisen, welche feststellten, dass erst in späteren Differenzierungsstadien der Proteingehalt für die Entwicklung des reifenden Pankreas wichtig ist. Entzieht man jedoch die Glukose, würde *in vivo* reaktiv der Cortikosteroidgehalt des Blutes erhöht werden um auf anderem Wege die energetische Versorgung der Zellen bis zu einem gewissen Maße zu gewährleisten, ein Kompensationsmechanismus, über welchen eine differenzierende Stammzelle *in vitro* nicht verfügt (Silverthorn, 2009).

Folglich ist erneut festzustellen, dass das Modell der differenzierenden Stammzelle nicht mit *in vivo* Bedingungen oder mit Zellen, die erst kürzlich *in vivo* gewonnen wurden (beispielsweise

die erwähnten explantierten Ratten-Pankreata) verglichen werden kann, da sich letztere viel toleranter gegenüber äußeren Einflüssen zu zeigen scheinen.

Das Modell der Sox17-DsRed, welche das Vorhandensein von definitivem Entoderm durch die Produktion eines rot fluoreszierenden Farbstoffes anzeigen, hat sich bei der Untersuchung des Einflusses von Aktivin A auf die effiziente Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen zu definitivem Entoderm bewährt. So konnte der Einfluss von Differenzierungsfaktoren und deren Qualität genauestens überprüft werden. Es zeigte sich jedoch eine stark ausgeprägte Sensibilität dieser Zellen auf mechanische Einflüsse, welche eine weitere Kultur äußerst schwierig gestaltete. Zudem war der direkte Vergleich der Versuche untereinander durch das äußerst variable Verhalten dieser Zelllinie nach Erreichen des definitiven Entoderms mit den zur Verfügung stehenden Ressourcen kaum möglich. Diese Fragilität ist wohl auf die transgene Modifikation dieser Zelllinie und der Tatsache, dass dieser Zelllinie nur ein Allel zur Produktion des Sox17 zur Verfügung steht, zurückzuführen. Somit ist die Zelllinie voraussichtlich nicht in der Lage, Sox17 in ausreichender Menge zu produzieren, um eine weitere Differenzierung in die pankreatische Linie zu initiieren.

Daher wählten wir zur Erlangung von pankreatischen Vorläuferzellen den ursprünglichen Wildtyp, die CGR8. Bei Vergleichen hinsichtlich der Expression von Sox17 und Sdf1, den Markern des definitiven und extraembryonalen Entoderms, wiesen beide Linien unterschiedliche Peaks auf. Die CGR8 zeigten den größten Anteil definitiven Entoderms zwischen Tag 4 und 5 auf, was mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen differenzierter muriner embryonaler Stammzellen übereinstimmt (Chen et al., 2011) und die Hypothese bekräftigt, dass die transgene Zelllinie nur zur Untersuchung bis zum Stadium des definitiven Entoderms vorteilhaft ist. Das folgende Differenzierungsprotokoll versuchte durch die Gabe von Aktivin A, KAAD-Cyclopamin sowie Indolaktam V, welche in bestimmten Zeitintervallen hinzugefügt wurden, die Zellen in die endokrin-pankreatische, Pdx1- und Ngn3-positive Schiene zu differenzieren und gleichzeitig die Entwicklung von Derivaten anderer Keimblätter zu unterdrücken (Chen et al., 2009). Der daraus resultierende Selektionsprozess äußerte sich in fortwährendem Zelltod gehemmter und Proliferation geförderter Zelltypen. Doch auch mit Hilfe unseres verwendeten Protokolls war es nicht möglich, ein heterogenes Zellgemisch komplett zu verhindern. Aus diesem Grund wurde der Einfluss weitaus höherer Glukose-Konzentrationen im Hinblick auf eine mögliche Erhöhung des Anteils pankreatischer Vorläuferzellen untersucht.

In vivo wird eine Blutglukose-Konzentration von 5 mM als physiologisch angesehen. Die maximale Rückresorptionskapazität der Niere liegt in der Regel bei dem Doppelten. Stammzellen, welche unter diesen Konzentrationen differenziert wurden, zeigten abermals einen großen Anteil sterbender Zellen – wenn auch nicht in dem Maße wie in den Versuchen zuvor. Nach einiger Zeit der Differenzierung überwog ein neuer Zelltyp, der bis dato nur in

geringen Maße vorhanden war: unter 5 und 10 mM Glukose zeigten sich an Tag 8 großflächige endothelartige Verbände, welche nach Beendigung des Glukose-Entzugs verschwanden. Während des gesamten Differenzierungsprozesses waren nur sehr wenige Neurone und inselartige Cluster sichtbar. Betrachtet man nur die Morphologie der differenzierenden Zellen, liegt der Schluss nahe, dass die Konzentrationen eher die Differenzierung in die mesodermale Linie fördern und im Gegenzug die neuronale Differenzierung, welche eng mit der endokrinen pankreatischen Entwicklung der Zellen verknüpft ist (Madsen et al., 1996), hemmen. In allen gerichtet differenzierten Gruppen konnte der Anteil an definitivem Entoderm an Tag 5 erhöht werden. Hierbei schien in den Gruppen, welche erst von Tag 3 an behandelt wurden, verstärkt Sox17 exprimiert zu werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass sich diese Zellen 3 Tage lang unter normalen Bedingungen (17,5 mM Glukose im Medium) entwickeln konnten. Gleichwohl konnte in allen Gruppen eine Erhöhung des Anteils an definitivem Entoderm bei niedrigem Gehalt an Sdf1 exprimierenden Zellen verzeichnet werden. Ergo hatte die niedrige Glukose, unabhängig vom Zeitpunkt des Entzugs, zumindest keinen gegenteiligen Effekt auf förderliche Wirkung des verabreichten Aktivin A (Sulzbacher et al., 2009). Betrachtete man den Anteil des reinen definitiven Entoderm (Sox17/Sdf1), schien die Behandlung mit 5 mM Glukose nach 3 Versuchen sogar förderlich auf seine Bildung zu sein. Bezüglich der Entstehung pankreatischer (Pdx1+) und endokriner (Ngn3+) Vorläufer konnte kein positiver Effekt festgestellt werden. Im Gegenteil wurde die Wirkung von Cyclopamin und Indolaktam V (Chen et al., 2009) durch die Reduktion des Glukose-Gehaltes stark beeinträchtigt: der Anteil Ngn3-positiver Zellen an Tag 15 war kaum höher als in spontan differenzierten Zellen. Diese Glukose-Konzentrationen wirkten somit hemmend auf die Gewinnung pankreatischer Vorläufer. Es wurde jedoch in der Vergangenheit beschrieben, dass Glukose dosisabhängig über die Regulation der Wirkungsbeziehung zwischen Ngn3 und NeuroD in die pankreatische Entwicklung eingreift (Guillemain et al., 2007). Fünf und 10 mM Glukose wurden hierbei als optimal für die Entwicklung angesehen.

Für diesen Widerspruch zu oben genannten Ergebnissen gibt es zwei mögliche Erklärungen: Zum ersten wurde bei Guillemain ein anderes Ziel, die Insulin-Produktion nach Differenzierung pankreatischer Vorläufer, untersucht, zum anderen wurde an einem ganz anderen Modell (explantierten Ratten-Pankreata) geforscht. Säugetiere, mit Ausnahme einiger nektarfressender Fledermausarten, haben einen Blutzuckerspiegel zwischen 3,6 und 5,8 mM, so dass die Exposition von 10 mM Glukose zu einer Erhöhung des Zuckergehaltes in der Umgebung des *in vitro* kultivierten Gewebes führte. Das Kultur- und Differenzierungsmedium unserer Zellen *in vitro* beinhaltet mit 17,5 mM dreimal so viel Glukose, wodurch die so behandelten Stammzellen einen massiven Glukose-Entzug erfuhren.

Unter Einbeziehung dieser Schlussfolgerungen gelangen wir zu folgenden Erkenntnissen: die Bedingungen der pankreatischen Entwicklung *in vivo* lassen sich nicht mit den erforderlichen

Gegebenheiten der Differenzierung *in vitro* vergleichen, jedes ist ein System für sich. Geht man allerdings davon aus, dass bei explantierten Ratten-Pankreata der Anteil an endokrinen pankreatischen Vorläuferzellen durch Erhöhung auf 10 mM Glukose gesteigert werden konnte, so könnten derartige Ergebnisse auf unser Modell übertragen werden – nur mit höheren Konzentrationen.

Mit dem anschließend gewählten Extrem, einer Glukose-Konzentration von 50 mM im Differenzierungsmedium, wurden in den anschließend durchgeführten Versuchen mögliche Effekte durch eine Gabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung untersucht.

Der erste große Differenzierungsendpunkt eines jeden Protokolls ist, wie oben erwähnt, die Gewinnung einer möglichst hohen Menge definitiven Entoderms, welches die Grundlage für die weiteren Schritte bildet. Vergleich man hierbei an Tag 5 die Mittelwerte aller 3 Versuche von spontan und nach Standardprotokoll differenzierten Zellen, zeigte sich ein bekannter Effekt: die Erhöhung der Sox17-Expression durch Aktivin A. Betrachtete man die 3 Gruppen, welche mit 50 mM Glukose entweder von Tag 0 oder von Tag 3 an behandelt wurden, so wurde kein positiv erhöhender Effekt der Sox17-Expression ersichtlich. Vielmehr fiel die starke Varianz der sich in Kultur befindenden Zellen auf (Abb. 38 (A)).

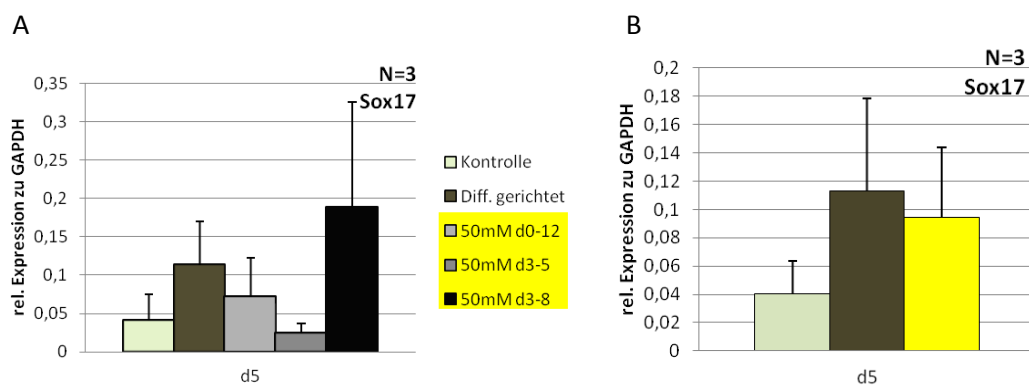


Abb. 38 Transkriptdaten der Expression von Sox17 an Tag (d) 5. Während der gerichteten Differenzierung steigt der Anteil Sox17-exprimierender Zellen. Eine zusätzliche Gabe von hoher (50 mM) Glukose bringt keinen zusätzlichen differenzierungsfördernden Effekt. (A) Daten aller gerichtet differenzierten Zellen mit SEM an Tag 5. (B) Mittelung mit SEM aller mit Glukose behandelten Gruppen (gelber Balken) im Vergleich zur spontan und gerichtet differenzierten Kontrolle.

Die höchsten und niedrigsten Werte zeigten sich in den beiden Gruppen, welche bis zu Tag 5 dieselbe Behandlung erfuhren. Mittelte man sämtliche Werte der mit 50 mM Glukose behandelten Zellen unabhängig von dem Zeitpunkt der Gabe (Abb. 38 (B)), zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede zu den unter 17,5 mM Glukose differenzierten Zellen. Das Mittel wies sogar eine dezent geringere Expression von Sox17 auf. Ergo war anhand unseres Modells nach 3 durchgeführten Versuchen kein Effekt von sehr hohen Glukose-

Konzentrationen auf die Bildung von definitivem Entoderm ableitbar. Die Wirkung des zugefügten Aktivin A wurde jedoch abermals nicht gehemmt.

Unter Zellkulturbedingungen erreichen differenzierende Zellen das Pdx1-positive Stadium der pankreatischen Vorläuferzellen zwischen Tag 11 und 20 (Chen et al., 2011) und exprimieren wenig später auch Ngn3. Unsere differenzierten Zellen erreichten diese Differenzierungsstufe zwischen Tag 12 und 15. Hierbei ist jedoch auffällig, dass unter dem Einfluss von 50 mM Glukose in Abhängigkeit vom Zeitpunkt ihrer Gabe die Menge des exprimierten Pdx1 variierte. Hohe Glukose, von Tag 3 bis Tag 8 hinzugefügt, schien die Selektion und Proliferation zukünftiger pankreatischer Vorläuferzellen zu fördern. Allerdings wies diese Gruppe auch den höchsten Standardfehler auf, da in den einzelnen Versuchen diese Zellen zwar im Vergleich zu den anderen Gruppen die stets höchste Menge an Pdx1 exprimierten, jedoch auf unterschiedlich hohem Niveau. Eine Tendenz war jedoch abzuleiten und müsste durch zusätzliche Wiederholungen bestätigt werden. Eine frühere oder kürzere Gabe konnte keine derartigen Effekte erzielen. In einzelnen Versuchen kam es auch an früheren Zeitpunkten zur Produktion von Pdx1, was durch die gemischte Population undifferenzierter Zellen, in der einige Subpopulationen determinierter als andere sind, erklärbar wäre, da sich diese Ergebnisse auch in den Wiederholungen nicht reproduzieren ließen.

Für den Erfolg des Differenzierungsprotokolls an sich spricht, dass auch Marker der endokrinen pankreatischen Vorläufer Ngn3, Pax6 und NeuroD1 in jeder gerichtet differenzierten Gruppe nachgewiesen werden konnten. Inwiefern ihre Quantität jedoch durch Glukose beeinträchtigt wurde, zeigte die Analyse der relativen Expression von Ngn3 mittels *realtime* PCR. Wieder konnte in den Zellen, welche von Tag 3 bis 8 die hohe Glukose erfahren hatten, den mit Abstand höchsten Peak aufweisen. Ergo muss es in dieser Zeit zu einem durch die vorhandene Glukose geförderten Selektionsprozess gekommen sein, welcher bevorzugt die weitere Differenzierung Pdx1-positiver in Ngn3-positive Zellen erlaubte. Da die Vorläufer zukünftiger Inselzellen durch die Expression dieses Markers charakterisiert werden (Gu et al., 2002; Desgraz et al., 2009) ist somit zu konstatieren, dass 50 mM Glukose, gegeben von Tag 3 bis 8, die Gewinnung von endokrinen pankreatischen Vorläuferzellen förderte.

Auch die lichtmikroskopisch beschriebene Morphologie dieser Zellen passte zu ihrem Erscheinungsbild auf RNA-Ebene. Im Vergleich zu Zellen, die nach dem Standard-Protokoll differenziert worden waren, konnte man in dieser Gruppe eine Vielzahl inselartiger Cluster finden, welche sich deutlich von den umliegenden Zellen abhoben. Im Gegenzug proliferierten unter normalen Kulturbedingungen viel mehr neuronale Zellen.

Diese Effekte spiegelten sich auch auf Protein-Ebene wieder. Die inselartigen Cluster, welche in der Gruppe, die von Tag 3 bis 8 mit 50 mM Glukose behandelt worden war, schon lichtmikroskopisch aufgefallen waren, konnten nun PDX1-positiv dargestellt werden. Bei

näherer Betrachtung wies hier der Großteil der Zellen eine Lokalisation im Zellkern auf, während Zellen außerhalb sich auch im Zytoplasma PDX1-positiv zeigten. Spontan differenzierte Zellen wiesen gar kein PDX1 auf, während bei Zellen der gerichtet differenzierten Kontrolle ohne Glukosezusatz PDX1 meist im Zytoplasma und nur selten im Zellkern vorgefunden werden konnte. In der aktiven, proliferierenden Zelle wird es jedoch im Zellkern erwartet, da PDX1 zu den Transkriptionsfaktoren gerechnet wird. Eine zytoplasmatische Sequestration wird eher als Kompensationsmechanismus zur Abschwächung seiner nukleären Tätigkeit angesehen (Fujimoto et al., 2009). PDX1 wurde beispielsweise im Zytoplasma von beta-Zellen nach Belastung mit Fettsäuren gefunden und als Ausdruck der Reaktion auf pathologische Mechanismen gedeutet (Hagman et al., 2005). Auffällig war in dieser Gruppe zudem, dass sich auch teilweise das Zytoplasma gebildeter Neurone anfärben ließ. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die pankreatische Entwicklung eng mit der neuronalen Differenzierung verknüpft ist (Madsen et al., 1996) und PDX1 in frühen Stadien von neuronal differenzierenden Zellen gebildet wird (Perez-Villamil et al., 1999). Ergo konnte das Standard-Protokoll allein keine ausreichende Verweildauer des PDX1 im Zellkern erreichen, um im Anschluss eine weitere endokrine Differenzierung der Zellen zu fördern. Die Zugabe von 50 mM Glukose während des Differenzierungsprozesses förderte hingegen die Verweildauer und Aktivität des PDX1 im Zellkern und Formierung zu inselförmigen Clustern aus pankreatischen Vorläuferzellen.

NGN3-positive Zellen, welche als Vorläufer der endokrinen pankreatischen Zellen betrachtet werden (Desgraz et al., 2009), konnten nach durchgeführter Immunfluoreszenz-Färbung in keiner Gruppe detektiert werden. Da das Ngn3 jedoch auf RNA-Ebene exprimiert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die zeitliche Dauer des Differenzierungsprotokolls für seine Synthese auf Protein-Ebene nicht lang genug war. Folgeversuche müssten somit die Differenzierungsdauer verlängern.

Da diese Ergebnisse die Bedeutung des Zeitpunktes der Glukose-Gabe für die Ausbeute Pdx1- und Ngn3-positiver Zellen nahelegten, wurde im Anschluss die benötigte Glukose-Konzentration untersucht. Dafür wurden die Zellen von Tag 0 bis 12 sowie von Tag 3 bis 8 mit 20, 30 oder 50 mM Glukose behandelt.

Zellen, die von Differenzierungsbeginn an dem veränderten Glukose-Gehalt ihres Mediums ausgesetzt worden waren, berührte die steigende Glukose hinsichtlich des Durchmessers der von ihnen gebildeten EBs kaum. Jedoch war mit steigender Konzentration eine Abnahme der Festigkeit des Zellverbandes zu verzeichnen. Gegen Ende des Differenzierungsprotokolls wies die 20 mM Gruppe vermehrt neuronale Strukturen und wenige inselartige Cluster auf. Schlagende Cluster sah man vermehrt bis 30 mM, allerdings kaum unter 50 mM Glukose. In dieser Gruppe fanden sich zudem kaum Neurone, dafür aber wirbelartige Formationen. Die Analyse der Transkriptdaten zeigte, dass den höchsten Anteil (Sox17-positiven) definitiven

Entoderms an Tag 5 bis zu einer Glukose-Konzentration von 30 mM. Foxa2 jedoch konnte nur unter Konzentration von 20 mM nachgewiesen werden. Nimmt man das Vorhandensein aller 3 Marker des definitiven Entoderms als Voraussetzung für den Erfolg der Differenzierung, so ist jede Konzentration über 20 mM nicht für die Gewinnung von definitivem Entoderm förderlich. Allerdings wird nicht nur die Bildung des definitiven, sondern auch des extraembryonale Entoderms durch die hohe Glukose eingeschränkt, so dass, nach Ausschluss Sox17- und Sdf1-ko-exprimierender Zellen, die Gruppe unter 30 mM Glukose den im Mittel schnellsten und höchsten Anstieg verzeichnete.

Hinsichtlich der weiteren Differenzierung stimmten die Ergebnisse mit den Erkenntnissen der vorhergehenden Versuche überein. In den Gruppen, die von Tag 0 bis Tag 12 mit erhöhter Glukose behandelt worden waren, konnte keine Erhöhung des Anteils Pdx1-positiver Vorläuferzellen verzeichnet werden. Im Gegenteil wirkte sich diese Behandlung hemmend auf den Erfolg des Differenzierungsprotokolls aus, da sich das Expressionslevel kaum über das Niveau der spontan differenzierten Zellen herausheben konnte. Dieser Störprozess äußerte sich in dem deutlichen Vorhandensein von Markern anderer Keimblätter: die Detektion von Meox1, Marker des Mesoderms, welches in allen Gruppen vorhanden war, aber unter 20 mM an Tag 12 die stärkste Bande zeigte, war konform mit dem hohen Anteil kardialer schlagender Cluster, die lichtmikroskopisch ersichtlich waren. Vorhandenes Ngn3 scheint eher neuronalen Ursprungs zu sein, da es gemeinsam mit einer deutlichen Expression von Shh von Tag 8 bis 15 einherging. Letzteres induziert in der neuronalen Entwicklung die Splittung der dorsalen von den ventral gelegenen Anteilen des Neuralrohrs (Le Dre'au et al., 2012). Die Expression von *Sonic hedgehog* sollte laut Differenzierungsprotokoll nach Gabe von Cyclopamin ab Tag 6 gehemmt werden (eine Repression dieses Gens ist in frühen Stadien der Differenzierung notwendig; erst spät, wenn das Pankreas sich zu seiner endgültigen Gestalt formiert, wird Shh wieder vermehrt exprimiert (ChamperisTsaniras et al., 2010)). Parallel zu den vorherigen Versuchen war zu konstatieren, dass eine Glukose-Erhöhung von Differenzierungsbeginn bis Tag 12 nicht förderlich auf die Gewinnung pankreatischer Vorläuferzellen schien. Die Zellen adaptierten sich an die sie umgebende Mediumkonzentration, wie aus der geringen Veränderung der EB-Größe zu entnehmen war. Die Bildung von definitivem Entoderm fand trotzdem unter starker Belastung der Zellen statt, was sich in der mangelhaften Festigkeit des Zellverbandes äußerte. Die weitere pankreatische Differenzierung verzögerte sich und gab Raum für Zellen anderer Keimblätter.

Betrachtet man im Gegenzug Zellen, denen erst an Tag 3 entweder 20, 30 oder 50 mM Glukose hinzugefügt wurde, zeigt sich schon während der EB-Bildung ein anderes Bild. Nach Überführung der EBs aus dem *hanging-drop* in Suspensionskultur an Tag 3 erfuhren diese in Abhängigkeit von der hinzugefügten Glukose einen starken Wachstumsknick. Die kritische

Belastungsgrenze scheint hierbei zwischen 20 und 30 mM zu liegen. Zusätzliche Erhöhungen in der Konzentration führten zu keiner weiteren Größenminderung. Vergleich man jetzt die Transkriptdaten hinsichtlich der Expression von Sox17, so wurde es in allen gerichtet differenzierten Gruppen verstärkt exprimiert, ein Effekt, der auf die Wirkung von Aktivin A zurückzuführen ist. Wurde dazu noch der Glukose-Gehalt des Mediums erhöht, steigerten die Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration die Expression von Sox17 nochmals. Der Anteil Sdf1-positiver Zellen verminderte sich ab einer Konzentration von 30 mM im Vergleich zu 20 mM. Diese Ergebnisse stehen jedoch in Widerspruch zu den Resultaten der Versuche, während derer 50 mM Glukose in verschiedenen Intervallen zu den Zellen gegeben worden war. Dort konnte kein Effekt im Vergleich zur Differenzierung unter normalen Bedingungen (17,5 mM Glukose im Medium) beschrieben werden. Und auch bei der Mittelung dieser Versuche wies die Sox17-Expression einen hohen Standardfehler ohne signifikante Unterschiede auf. Der Unterschied ist jedoch, dass trotz fehlender Signifikanz eine Tendenz zugunsten der hohen Glukose sichtbar war. In allen 3 durchgeführten Versuchen konnte durch 50 mM Glukose eine Erhöhung des Sox17/Sdf1 nachgewiesen werden. Der hohe Standardfehler ist dem Umstand geschuldet, dass die Zellen die entsprechenden Gene in jedem Versuch auf unterschiedlichen Niveaus exprimieren.

Vergleich man aber die Gruppen unter 20 und 50 mM Glukose, so zeigte sich in allen 3 Versuchen ein Anstieg des Anteils definitiven Entoderms, welcher nicht allein dem Aktivin A zugeschrieben werden kann (Abb. 39). Dieser Trend muss jedoch durch weitere Versuche verifiziert werden.

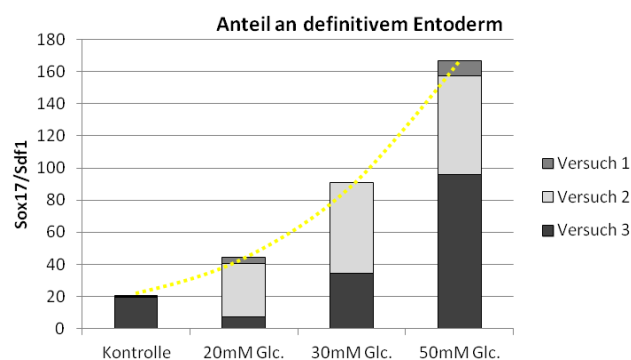


Abb. 39 Darstellung des Anteils an definitivem Entoderm an Tag 5 in 3 durchgeführten Versuchen. Der Anteil rein Sox17-positiver Zellen steigt mit Zunahme der Glukose-Konzentration im Medium (gelbe Linie).

Betrachtet man die weitere Differenzierung der Zellen, so entspricht dieses Mal das Bild den vorherigen Versuchen: Pdx1 ist an Tag 15 in der 50 mM Gruppe mit Abstand am stärksten vertreten – Zellen, welche unter geringeren Konzentrationen kultiviert worden waren,

exprimierten deutlich geringere Mengen an Pdx1. Diese Ergebnisse zeigten sich im Mittel als auch in allen 3 Einzelversuchen. Die Expression von Pdx1 zu früheren Zeitpunkten, zum Beispiel an Tag 3, entspricht nicht dem laut Literatur erwarteten Peak, welcher wie schon beschrieben zwischen Tag 11 und 20 liegen sollte (Chen et al., 2011). Zum anderen differenzierten diese Zellen nicht zu Ngn3-positiven endokrinen Vorläufern aus, so dass man auch hier von der spontanen Expression undifferenzierter Zellen ausgehen kann.

In der 50 mM Gruppe wiesen die Zellen zudem Charakteristika endokriner pankreatischer Vorläufer auf. Der Ngn3-Gehalt stieg parallel zum Pdx1 mit dem Glukose-Gehalt des Mediums von Tag 3 bis 8 an. In 2 von 3 durchgeführten Versuchen wurde dabei an Tag 15 die höchste Ngn3-Expression in der 50 mM Gruppe gemessen. Im 3. Versuch konnte der Peak von Pdx1 und Ngn3 schon an Tag 12 ermittelt werden, weshalb im Mittel 2 Expressions-Peaks bei einem sehr hohen Standardfehler zu bestehen schienen. Dies war mit den unterschiedlichen Differenzierungsgeschwindigkeiten der Stammzellen während der einzelnen Versuche zu begründen und ist der Grund, weshalb in der Literatur auch die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen in Zeitspannen statt Zeitpunkten angegeben werden. Die Ursache der unterschiedlichen Differenzierungsgeschwindigkeiten und -effizienz könnte in Abhängigkeit zur Passage der verwendeten Stammzellen stehen: aus hohen Passagen verwendete ESC schienen langsamer zu differenzieren als Zellen, die noch nicht so lange in Kultur gehalten wurden. Auch die Peaks exprimierter Gene lassen sich bei niedrigeren Passagen mitunter zeitiger und höher detektieren. Aus diesem Grunde bemühten wir uns, vergleichbare Passagen für die einzelnen Versuche zu verwenden.

Setzt man die Zellen unter 20 mM Glukose mit den 17,5 mM des Standard-Protokolls gleich, so ist folgendes zu konstatieren: in 5 von 6 durchgeführten Versuchen war der Anteil Pdx1- und Ngn3-positiver Zellen nach Zugabe von 50 mM Glukose von Tag 3 bis 8 im Vergleich zu Zellen, die unter Normalbedingungen differenziert worden waren, an Tag 15 deutlich erhöht. Die Mittelung aller Versuche kann abermals nur Tendenzen aufzeigen, da aufgrund der beschriebenen, stammzellbedingten Schwankungen der Standardfehler sehr hoch ist. Für konkrete Ergebnisse müsste ein Vielfaches der Versuche durchgeführt werden, um die bereits aufgezeigte Tendenz zu verifizieren.

Der zuletzt analysierte Aspekt betraf die Unterscheidung zwischen neuronal und pankreatisch differenzierten Zellen, da diese beiden Differenzierungswege eng miteinander verbunden sind und Ngn3-positiv Zellen auch zu zukünftigen Neuronen differenzieren können (Madsen et al., 1996). NeuroD6 wurde quantitativ bestimmt, da es essentiell für die neuronale Entwicklung und Zellerhaltung ist (Uittenbogaard et al., 2010). Hierbei zeigte sich, dass spontan differenzierte Zellen, welche einen hohen Anteil Ngn3 aufgewiesen hatten, auch eine außerordentlich hohe Menge NeuroD6 exprimierten. Folglich entwickelten sich unter spontanen Bedingungen Zellen eher bevorzugt in die neuronale als pankreatisch endokrine Linie. Dieser Anteil konnte durch

unser Differenzierungsprotokoll wirksam vermindert werden, wie die Expressionsanalysen zeigte.

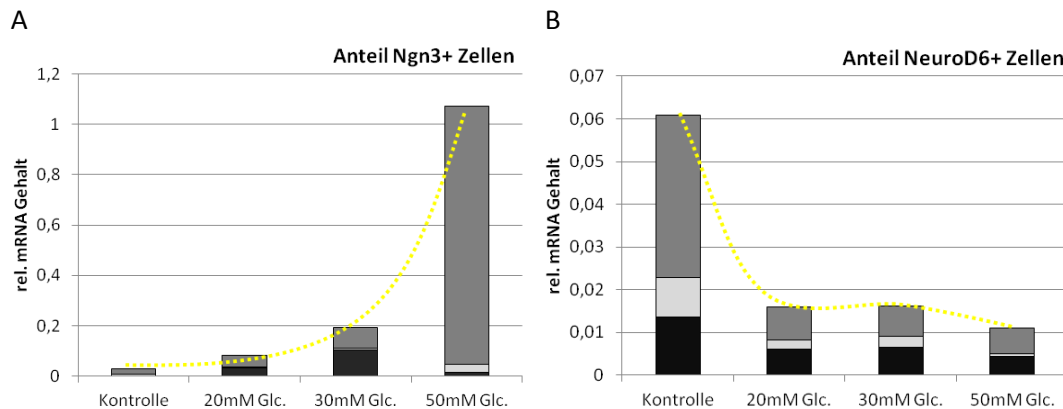


Abb. 40 Darstellung der Expression von Ngn3 (A) und NeuroD6 (B) an Tag 15 in 3 durchgeführten Versuchen. Unter 50 mM Glukose kann der höchste Anteil Ngn3-exprimierender Zellen verzeichnet werden. Im Gegenzug dazu nimmt der Anteil an NeuroD6 ab.

Nach Zufuhr von 50 mM Glukose wird die neuronale Differenzierung gehemmt, was morphologisch zu beobachten war: Zellen, die von Tag 3 bis 8 lediglich 20 mM Glukose ausgesetzt waren, wiesen deutlich mehr neuronale Strukturen auf als Zellen unter 50 mM Glukose. Die Expressionsanalyse von NeuroD6 konnte in allen 3 Versuchen eine Minderung seines Gehaltes verzeichnen, allerdings nicht in dem Umfang, welcher durch das Differenzierungsprotokoll an sich zustande gekommen war. Letzteres wurde aus dem Vergleich der spontan differenzierten mit den gerichtet differenzierten Zellen ersichtlich.

Folglich ist festzustellen, dass eine höhere Ausbeute an definitivem Entoderm und die weitere Bildung von pankreatischen endokrinen Vorläuferzellen nicht nur von der umgebenden Glukose-Konzentration, sondern auch von dem Zeitpunkt ihrer Gabe abhängig zu sein scheint.

In vivo wird ab einer bestimmten Glukose-Konzentration, 10 mM, von Glukosetoxizität gesprochen. Ihr Ausmaß ist abhängig von der Höhe und Dauer der Exposition. Das Spektrum der Folgen dieser Belastung reicht von einer Verminderung der Glukosesensitivität über die verminderte Expression von GLUT2 und PDX1 sowie erhöhte Expression von Stress- und Apoptose-assoziierten Genen bis hin zur Apoptose der Zelle (Bensellam et al., 2012). Zu den Mechanismen, die hierbei von Bedeutung sind, gehören die Autooxidation durch Glukose, die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die Bildung von Methylglyoxal und Glykierung, der Hexosamin Metabolismus, die Bildung von Sorbitol und die oxidative Phosphorylierung (Robertson, 2004). All diesen ist gemein, dass sie in der Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen münden. Durch den resultierenden chronischen oxidativen Stress kommt es zu Defekten der Genexpression und anschließenden Apoptose der betroffenen beta-Zelle.

Bisher gibt es erst sehr wenige Daten zu sich entwickelnden pankreatischen Zellen. Einzelne der genannten Signalwege überschneiden sich aber mit Pfaden, welche *in vitro* während der pankreatischen Differenzierung durch Beigabe von Differenzierungsfaktoren gefördert oder gehemmt werden. Eine Aktivierung der PKC führt zu einer vermehrten Expression von Wachstumsfaktoren, unter anderem von TGF- β 1. Die TGF- β Superfamilie ist eng mit der pankreatischen Differenzierung verknüpft. Es ist bekannt, dass TGF- β eine zentrale Rolle in der Generierung von Mesentoderm und definitivem Entoderm spielt (Brownlee, 2001). Über die Zugabe von Aktivin A, welches auch ein Mitglied dieser Familie ist, kommt es nach Bindung an zwei Transmembranrezeptoren zur Phosphorylierung von Smad2 und 3. Letzteres transloziert in den Kern und fördert dort die Differenzierung der Zelle zu definitivem Entoderm. TGF- β 1 an sich begünstigt die Entwicklung von endokrinen Zellen aus fetalen murinen pankreatischen Zellen (Sanvito et al., 1994; Tei et al., 2005).

Dass Glukose die embryonale pankreatisch-endokrine Differenzierung über die Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen NeuroD und Ngn3 beeinflusst, wurde bereits beschrieben (Guillemain et al., 2007). Dieselben fördernden Ergebnisse konnten jedoch auch festgestellt werden, nachdem die Zellen mit Glucosaminen behandelt worden waren. Es wurde gezeigt, dass Glucosamine den Signalweg der Hexosaminbiosynthese (HBP) aktivieren, welcher wiederum über dieselben Schritte wie Glukose die beta-Zell-Entwicklung fördert. Die vermehrte Expression von MafA, einen Transkriptionsfaktor, welcher die Insulin-Gen-Transkription unterstützt, wird via HBP angestoßen. Genaue molekularbiologische Zusammenhänge sind zwar noch unbekannt, man weiß jedoch, dass eine Blockade des HBP zu einer geringeren beta-Zell-Differenzierung führt (Filhoulaud et al., 2009).

Folglich weiß man von zwei Signalwegen, welche zum einen eng mit der pankreatischen Differenzierung, zum anderen mit der Schädigung der adulten Zelle infolge zu hoher Glukose-Konzentrationen verknüpft sind.

Es ist bekannt, dass Pdx1 das nicht nur Entwicklung und Funktion, sondern auch das Überleben der beta-Zellen reguliert (Fujimoto et al., 2009). Die genaue Funktionsweise ist allerdings noch nicht untersucht. In adulten Zellen kann jedoch nach Gabe von α -Liponsäure über eine erhöhte Expression von Pdx1 die Apoptoserate unter Belastung mit hoher Glukose verringert werden (Yang et al., 2012). Die DNA-Bindefähigkeit von Pdx1 in beta-Zellen wiederum wird durch Glukose über eine Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK2) stimuliert (Macfarlane et al., 1999; Vaultont et al., 2000). Diese Kinase, welche auch als p38MAPK bekannt ist, wird unter anderem auch durch Stressstimuli wie UV-Strahlung, Hitze und osmotischen Schock aktiviert und gilt als Schlüssel zur möglichen folgenden Apoptose der betroffenen Zelle.

Betrachtet man diese Erkenntnisse, so ist ein möglicher Zusammenhang zwischen einem hohen Anteil Pdx1-positiver Vorläuferzellen nach Exposition mit hoher Glukose während der Differenzierung durchaus denkbar. Die Zellen entwickelten sich jedoch nur dann bevorzugt in die pankreatische Richtung, wenn sie sich in den ersten 3 Differenzierungstagen unter normalen Bedingungen und Aktivin A entwickeln konnten. Im Stadium des Mesentoderms könnte dann eine rapide Erhöhung des Glukose-Gehaltes im Medium der beginnenden durch Aktivin A geförderten Differenzierung über TGF- β 1 vermehrten Auftrieb geben.

Inwiefern andere Kompensationsmechanismen der Glukotoxizität auch zu einer Erhöhung des Anteils pankreatischer Vorläuferzellen führen, muss noch eingehend untersucht werden. Die Herausforderung besteht nun darin, die Balance zwischen Begünstigung der pankreatischen Differenzierung mit Hilfe der Erhöhung des Glukose-Gehaltes auf der einen und der zunehmenden Apoptoserate auf der anderen Seite zu finden.

6 Zusammenfassung

Der Diabetes mellitus, vor allem Diabetes Typ 2, welcher mit einer peripheren Insulinresistenz einhergeht, ist eine Volkskrankheit stetig steigender Inzidenz. Per definitionem liegt ein Diabetes mellitus vor, wenn beim nüchternen Patienten wiederholt ein Blutzuckerspiegel von mehr als 7 mmol/l gemessen wird. Durch die gravierenden Folgeerkrankungen der resultierenden chronischen Hyperglykämie, welche aus Makro- und Mikroangiopathie entstehen, sind Diabetiker einer erhöhten Morbidität und Mortalität ausgesetzt. Die antihyperglykämische Therapie, welche durch Antidiabetika und Insulin eine Senkung des Blutzuckerspiegels anstrebt, stößt allzu oft an ihre Grenzen. Der Blutzuckerspiegel kann meist nicht 24 h am Tag auf physiologische Werte eingestellt werden. Hypo- oder hyperglykämische Spitzen führen über kurz oder lang zu gefürchteten Folgeschäden. Aus diesem Grund strebt die Forschung patientenspezifische Therapieansätze an; zum einen, um gezielt während des Erkrankungsverlaufs intervenieren zu können, und zum anderen, um Modelle zur genauen Darstellung des individuellen Krankheitsverlaufs entwickeln zu können.

In vitro kann über die Manipulation verschiedener Signalwege die Entwicklung der beta-Zelle nachvollzogen werden. Durch Zugabe unter anderem von Aktivin A, KAAD-Cyclopamin und Indolaktam V können embryonale Stammzellen zu definitivem Entoderm und weiter zu pankreatischen Vorläuferzellen differenziert werden. Problem aller existierenden Protokolle ist jedoch ihre sehr geringe Differenzierungseffizienz und der Charakter der gewonnenen Insulinproduzierenden beta-Zellen, welcher nicht immer mit dem der *in vivo* vorkommenden Originalen übereinstimmt.

Am Modell zweier muriner embryonaler Stammzelllinien, der CGR8 und ihrer transgenen Schwesterlinie, der Sox17-DsRed, sollten Möglichkeiten der Erhöhung der Ausbeute an definitivem Entoderm und pankreatischen Vorläuferzellen mittels RNA-Analyse sowie licht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Bei der Differenzierung von Sox17-DsRed zu definitivem Entoderm konnte kein synergistischer Effekt nach Zugabe von Aktivin A und/oder IDE1 und IDE2 detektiert werden. Nach Etablierung eines geeigneten Protokolls zur Differenzierung von CGR8 zu pankreatischen Vorläuferzellen konnte gezeigt werden, dass für die pankreatische Entwicklung *in vitro* eine bestimmte Glukose-Konzentration des Mediums essentiell ist. Das standardmäßig verwendete Differenzierungsmedium enthält 17,5 mM Glukose, eine Verringerung der Konzentration bis 5 mM hatte keinen fördernden Effekt auf die Differenzierung. Ein noch geringerer Glukose-Gehalt des Mediums führte zu einem massiven Zellsterben und behinderte folglich nicht nur die Differenzierung, sondern auch die Kultur an sich. Durch Zugabe von sehr hohen Glukose-Konzentrationen (50 mM) konnte im Gegenteil eine Erhöhung des Anteils an pankreatischen Pdx1-positiven Vorläuferzellen erreicht werden. Der Anteil Pdx1-exprimierender Zellen war jedoch nur dann bei diesem Glukose-Gehalt erhöht, wenn die Glukose vom Stadium des Mesentoderms (Differenzierungstag 3) bis zur beginnenden

Bildung pankreatischer Vorläuferzellen (Tag 8) hinzugegeben wurde. Andere Differenzierungsintervalle zeigten sich weniger glukosesensibel. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Pdx1-Expression im Intervall von Tag 3 bis Tag 8 mit steigender Konzentration zunimmt. Unter Konzentrationen von 20 und 30 mM konnten keine derartigen Expressionslevel verzeichnet werden.

Die *in vivo* vorliegende physiologische Glukose-Konzentration liegt bei 3,9-5,5 mM. Eine Schädigung der beta-Zellen beginnt ab einer chronischen Hyperglykämie von circa 10 mM (Glukotoxizität). Hierbei werden Mechanismen aktiviert, welche eng mit der pankreatischen Differenzierung verknüpft sind, wie beispielsweise die Expression von TGF- β 1 oder die Aktivierung des Hexosamin-Synthese-Signalwegs (HBP). Es ist zu vermuten, dass durch eine Erhöhung des Glukose-Gehalts im Differenzierungsmedium, welcher über das doppelte der üblichen Konzentration (17,5 mM) hinausgeht, über diese Signalwege eine Zunahme des Anteils pankreatischer endokriner Vorläuferzellen erreicht werden kann.

7 Literaturverzeichnis

- Bensellam M, Laybutt DR, Jonas JC (2012)** The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: Recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol* 364(1-2):1-27.
- Boeuf H, Hauss C, Graeve FD, Baran N, Kedinger C (1997)** Leukemia Inhibitory Factor-dependent Transcriptional Activation in Embryonic Stem Cells. *J Cell Biol* 138(6):1207-1217.
- Böhm BO, Dreyer M, Fritsche A, Füchtenbusch M, Götz S, Martin S (2011)** Therapie des Typ 1 Diabetes, S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes - Version 1.0; September
- Borowiak M (2010)** The New Generation of Beta-Cells: Replication, Stem Cell Differentiation, and the Role of Small Molecules. *Rev Diabet Stud* 7(2):93-104.
- Borowiak M, Maehr R, Chen S, Chen AE, Tang W, Fox JL, Schreiber SL, Melton DA (2009)** Small Molecules Efficiently Direct Endodermal Differentiation of Mouse and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3;4(4):348-358.
- Brownlee M (2001)** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 13;414(6865):813-820.
- Bundesärztekammer:** Richtlinien zur Organtransplantation gem. § 16 Abs. 1. *Richtlinien für die Wartelistenführung und die Organvermittlung zur Pankreastransplantation*. [Online] Bundesärztekammer, 08. 03 2013. [Zitat vom: 12. 09 2013.] <http://www.bundesaerztekammer.de/downloads/RiliOrgaPankreas20130308.pdf>.
- Champeris Tsaniras S, Jones PM (2010)** Generating pancreatic β -cells from embryonic stem cells by manipulating signaling pathways. *J Endocrinol* Jul;206(1):13-26.
- Chen C, Chai J, Singh L, Kuo CY, Jin L, Feng T, Marzano S, Galeni S, Zhang N, Iacovino M, Qin L, Hara M, Stein R, Bromberg JS, Kyba M, Ku HT (2011)** Characterization of an In Vitro Differentiation Assay for Pancreatic-Like Cell Development from Murine Embryonic Stem Cells: Detailed Gene Expression Analysis. *Assay Drug Dev Technol* 9(4):403-419.
- Chen S, Borowiak M, Fox JL, Maehr R, Osafune K, Davidow L, Lam K, Peng LF, Schreiber SL, Rubin LL, Melton D (2009)** A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nat Chem Biol* 5(4):258-265.
- Chen YG, Wang Q, Lin SL, Chang CD, Chuang J, Ying SY (2006)** Activin Signaling and Its Role in Regulation of Cell Proliferation, Apoptosis and Carcinogenesis. *Exp Biol Med* (Maywood) 231(5):534-544.
- D'Amour KA, Bang AG, Eliazzer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE (2006)** Production of Pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24(11):1392-1401.
- Desgraz R, Herrera PL (2009)** Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors. *Development* 136(21):3567-3574.
- DSO:** Deutsche Stiftung Organtransplantation. [Online] [Zitat vom: 12. 09. 2013.] <http://www.dso.de/organspende-und-transplantation/transplantation/pankreastransplantation.html>.

Dumortier O, Blondeau B, Duvill   B, Reusens B, Br  ant B, Remacle C (2007) Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet. *Diabetologia* 50(12):2495-2503.

Europe I: The International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*. 2009; 4th edition: <http://www.idf.org/atlasmap/atlasmap> [Zitat vom: 01.04. 2013.]

Filhoulaud G, Guillemain G, Scharfmann R (2009) The Hexosamine Pathway Is Essential for Pancreatic Beta Cell Development. *J Biol Chem* 284(36):24583-24594.

Fujimoto K, Polonsky KS (2009) Pdx1 and other factors that regulate pancreatic β -cell survival. *Diabetes Obes Metab* 11 Suppl 4:30-37.

Giani G, Janka HU, Hauner H, Standl E, Schiel R, Neu A, Rathmann W, Rosenbauer J: Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. In: Scherbaum W A, Kiess W (Hrsg): *Evidenzbasierte Leitlinie des DDG - Aktualisierung 05/2004*. 2. Auflage. Deutsche Diabetes-Gesellschaft, 2004.

Groebner M, David R, Franz WM (2006) Embryonale Stammzellen Zukunftige M  glichkeiten. *Internist* 47:502-508.

Gu G, Dubauskaite J, Melton DA (2002) Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129(10):2447-2457.

Guillemain G, Filhoulaud G, Da Silva-Xavier G, Rutter GA, Scharfmann R (2007) Glucose Is necessary for Embryonic Pancreatic Endocrine Cell Differentiation. *J Biol Chem* May 18;282(20):15228-15237.

Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD, Poitout V (2005) Palmitate inhibits insulin gene expression by altering pdx-1 nuclear localization and reducing mafa expression in isolated rat islets of langerhans. *J Biol Chem* 280(37):32413-32418.

Hauner H: Diabetesepidemie und Dunkelziffer. In: *diabetesDE – Deutsche Diabetes-Hilfe* (Hrsg.): *Deutscher Gesundheitsbericht 2013*, Kirchheim Co.GmbH Mainz, 2013.

Herold G: *Innere Medizin*. Gerd Herold, K  ln, 2012, S. 700-719.

Herrera PL (2000) Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 127(11):2317-2322.

Hien P, B  hm B: *Diabetes-Handbuch eine Anleitung f  r Praxis und Klinik- nach den Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG)*. 6. Aufl. Springer, Heidelberg, 2010: S. 17-25, 91-119.

Inoue T, Kido Y, Asahara S, Matsuda T, Shibutani Y, Koyanagi M, Kasuga M (2009) Effect of intrauterine undernutrition during late gestation on pancreatic beta cell mass. *Biomed Res* 30(6):325-330.

Keane D, Newsholme P (2008) Saturated and unsaturated (including arachidonic acid) non-esterified fatty acid modulation of insulin secretion from pancreatic β -cells. *Biochem Soc Trans* 36(5):955-958.

- Kerner W, Brückel J (2011)** Definition, Klassifikation und Therapie des Diabetes mellitus. *Diabetologie* 6:107–110.
- Kim SK, Melton DA (1998)** Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22):13036-13041.
- Koestenbauer S, Zech NH, Dohr G (2006)** Trans-Differenzierung von adulten Stammzellen - Ist eine Veränderung in Richtung naiverer Zellen möglich. *Reproduktionsmed Endokinol* (5): 324.
- Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazer S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE (2008)** Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26(4):443-452.
- Le Dréau G, Martí E (2012)** Dorsal–Ventral Patterning of the Neural Tube: A Tale of Three Signals. *Dev Neurobiol* 72(12):1471-1481.
- Limesand SW, Jensen J, Hutton JC, Hay WW Jr (2005)** Diminished beta-cell replication contributes to reduced beta-cell mass in fetal sheep with intrauterine growth retardation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(5):1297-1305.
- Lüllmann-Rauch R:** Taschenlehrbuch Histologie. 3. Aufl., Thieme, Stuttgart, 2009, S. 409-413.
- Macfarlane WM, McKinnon CM, Felton-Edkins ZA, Cragg H, James RF, Docherty K (1999)** Glucose Stimulates Translocation of the Homeodomain Transcription Factor PDX1 from the Cytoplasm to the Nucleus in Pancreatic β -Cells. *J Biol Chem* 274(2):1011-1016.
- Madsen OD, Jensen J, Blume N, Petersen HV, Lund K, Karlsten C, Andersen FG, Jensen PB, Larsson LI, Serup P (1996)** Pancreatic development and maturation of the islet B cell, Studies of pluripotent islet cultures. *Eur J Biochem* 15;242(3):435-445.
- Newsholme P, Bender K, Kiely A, Brennan L (2007)** Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *Biochem Soc Trans* 35(5):1180-1186.
- Nichols J, Evans EP, Smith AG (1990)** Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* 110(4):1341-1348.
- Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M (2006)** Fatty Acid Signaling in the β -Cell and Insulin Secretion. *Diabetes* 55 Suppl 2:16-23.
- O'Connor MD, Kardel MD, Iosfina I, Youssef D, Lu M, Li MM, Vercauteren S, Nagy A, Eaves CJ (2008)** Alkaline Phosphatase-Positive Colony Formation Is a Sensitive, Specific and Quantitative Indicator of Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 26(5):1109-1116.
- Okada T, Liew CW, Hu J, Hinault C, Michael MD, Krtzfeldt J, Yin C, Holzenberger M, Stoffel M, Kulkarni RN (2007)** Insulin receptors in β -cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(21):8977-8982.

Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA (2008) Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest* 118(6):2316-2324.

Perez-Villamil B, Schwartz PT, Vallejo M (1999) The pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 is expressed in neural cells during brain development. *Endocrinology* 140(8):3857-3860.

Robertson RP (2004) Chronic Oxidative Stress as a Central Mechanism for Glucose Toxicity in Pancreatic Islet Beta Cells in Diabetes. *J Biol Chem* 279(41):42351-42354.

Sanvito F, Herrera PL, Huarte J, Nichols A, Montesano R, Orci L, Vassalli JD (1994) TGF-beta 1 influences the relative development of the exocrine and endocrine pancreas in vitro. *Development* 120(12):3451-3462.

Schroeder IS, Sulzbacher S, Nolden T, Fuchs J, Czarnota J, Meisterfeld R, Himmelbauer H, Wobus AM (2011) Induction and Selection of Sox17-Expressing Endoderm Cells Generated from Murine Embryonic Stem Cells. *Cells Tissues Organs* 195(6):507-523.

Shi Y, Hou L, Tang F, Jiang W, Wang P, Ding M, Deng H (2005) Inducing Embryonic Stem Cells to Differentiate into Pancreatic β Cells by a Novel Three-Step Approach with Activin A and All-Trans retinoic Acid. *Stem Cells* 23(5):656-662.

Silverthorn DU: Physiologie. Pearson Deutschland GmbH, München, 2009, S. 1074-1075.

Smith RG, Thorner MO: Ghrelin in Health and Disease. Humana Press, Springer, New York, 2012, S. 51-72

Smith SB, Watada H, German MS (2004) Neurogenin3 activates the islet differentiation program while repressing its own expression. *Mol Endocrinol* 18(1):142-149.

Spinas GA, Lehmann R (2001) Der Diabetes mellitus: Diagnose, Klassifikation und Pathogenese. *Schweiz Med Forum*, 20:519-525.

Sulzbacher S, Schroeder IS, Truong TT, Wobus AM (2009) Activin A-Induced Differentiation of Embryonic Stem Cells into Endoderm and Pancreatic Progenitors - The Influence of Differentiation Factors and Culture Conditions. *Stem Cell Rev* 5(2):159-173.

Tam PP, Kanai-Azuma M, Kanai Y (2003) Early endoderm development in vertebrates: lineage differentiation and morphogenetic function. *Curr Opin Genet Dev* 13(4):393-400.

Tei E, Mehta S, Tulachan SS, Yew H, Hembree M, Preuett B, Snyder CL, Yamataka A, Miyano T, Gittes GK (2005) Synergistic endocrine induction by GLP-1 and TGF-beta in the developing pancreas. *J Biol Chem* 280(37):32209-32217.

Uittenbogaard M, Baxter KK, Chiaramello A (2010) NeuroD6 genomic signature bridging neuronal differentiation to survival via the molecular chaperone network *J Neurosci Res* 88(1):33-54.

Van Hoof D, D'Amour KA, German MS (2009) Derivation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 3(2-3):73-87.

Vaulont S, Vasseur-Cognet M, Kahn A (2000) Glucose Regulation of Gen Transcription. *J Biol Chem* 275(41):31555-31558.

Yang Y, Wang W, Liu Y, Guo T, Chen P, Ma K, Zhou C (2012) α -lipoic acid inhibits high glucose-induced apoptosis in HIT-T15 cells. *Dev Growth Differ* 54(5):557-565.

Zorn AM, Wells JM (2009) Vertebrate Endoderm Development and Organ Formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:221-251.

8 Anhang

8.1. Kulturmedien

Tab. 1 Kulturmedium Stammhaltung CGR8

	Σ 100ml	Endkonzentration
GMEM	85ml	
FCS	10ml	10%
L-Glutamin	1ml	2mM
NEAA	1ml	1x
Sodium Pyruvate	1ml	1mM
Penicillin/Streptomycin	1ml	1x
β -Mercaptoethanol	1ml	100 μ M
LIF	10 μ l	10ng/ml

Tab. 2 Kulturmedium Stammhaltung Sox17-DsRedExpressNLS

	Σ 100ml	Endkonzentration
GMEM	85ml	
FCS	10ml	10%
L-Glutamin	1ml	2mM
NEAA	1ml	1x
Sodium Pyruvate	1ml	1mM
Penicillin/Streptomycin	1ml	1x
β -Mercaptoethanol	1ml	100 μ M
G418 Sulfate	66,65 μ l	200 μ g/ml
LIF	10 μ l	10ng/ml

Tab. 3 Chemisch definiertes Medium (CDM)

	Σ 100ml	Endkonzentration
IMDM	43,5ml	
Ham's F12	43,5ml	
Panexin NTS	10ml	10%
L-Glutamin	1ml	2mM
Lipide	1ml	1%
Transferrin	500 μ l	150 μ g/ml
MTG	300 μ l	450 μ M
Insulin	70 μ l	7 μ g/ml
LIF	20 μ l	2U/ml
Aktivin A	10 μ l	50ng/ μ l

Tab. 4 Differenzierungsmedium I

	Σ 100ml	Endkonzentration
IMDM	76,7ml	
FCS	20ml	20%
L-Glutamin	1ml	2mM
NEAA	1ml	1x
Penicillin/Streptomycin	1ml	1x
MTG	300 μ l	450 μ M

Tab. 5 Differenzierungsmedium II

	Σ 10ml	Endkonzentration
IMDM	4,76	
Ham's F12	4,67	
FCS	200 μ l	2%
L-Glutamin	100 μ l	2mM
NEAA	100 μ l	1x
Penicillin/Streptomycin	100 μ l	1x
MTG	30 μ l	450 μ M
KAAD-Cyclopamin	25,8 μ l	0,75 μ M
B27	200 μ l	1%
(-)-Indolaktam V	3 μ l	300 μ M

Tab. 6 Differenzierungsmedium IIa

	Σ 10ml	Endkonzentration
DMEM w/o Glukose	4,76	
Ham's F12	4,67	
FCS	200 μ l	2%
L-Glutamin	100 μ l	2mM
NEAA	100 μ l	1x
Penicillin/Streptomycin	100 μ l	1x
MTG	30 μ l	450 μ M
B27	200 μ l	1%

8.2 Primer und Antikörper

Tab. 7 RT-PCR-Primer sense (s) und antisense (as)

Zielgen	Sequenz (3' - 5')	Produktgröße	Annealingtemperatur	Zyklen	Zielgewebe
TubV	s: GGG AGG TGA TAA GCG ATG AA as: GGG CAC CAC ACT GAA GGT AT	452bp	57	35	housekeeping-Gen
Pax6	s: TCT AAT CGA AGG GCC AAA TG as: ATG CAC GAG TAC GAG GAG GT	296bp	59	30	Ektoderm
Shh	s: TAT TCC CAA CGT AGC CGA GA as: CAG TGG ATG TGA GCT TTG GA	409bp	58	39	neuronales Ektoderm
Sox7	s: GAC CGA GGG ACT GGA GTGT as: GTT GGG GTA ATC CTG CAT GT	304bp	58	45	extraembryonales Entoderm
CXCR4	s: CAT GGA ACC GAT CAG TGT GA as: TTT CAG CCA GCA GTT TCC TT	467bp	58	35	definitives Entoderm
Sox17	s: GGA GGG TCA CCA CTG CTT TA as: TGC TCA TGG CTC TCC AGAC	358bp	55	45	definitives Entoderm
Sox17-DsRed RNA	s: GCC TTC CTA TTT CCC CAA GA as: GGG TGC TTC ACG TAC ACC TT	330bp	60	45	
Sox17-DsRed DNA	s: GCA TTC CTA GGG GTC TTT CC as: GTG GGT TGT GGC AAG CTT AT	444bp	60	45	
Meox1	s: AGA AGA TAG CAG CGC CTC AG as: CTC CGT TCT CCT GGT TGT CT	401bp	57	45	Mesoderm
FoxA2	s: CCC GGG ACT TAA CTG TAA CG as: TAG CAG CCG TTC TCG AAC AT	801bp	57	39	Endoderm des Darmrohrs
Hnf4	s: AGA GGT TCT GTC CCA GCA GA as: TGA GGC AGG CAT ATT CAT TG	395bp	55	35	hepatische Vorläuferzellen
Pdx1	s: ACA GCA GTC TGA GGG TGA GC as: TCC GTA TTG GAA CGC TCA AG	317bp	52	45	pankreatische Vorläuferzellen
Ngn3	s: GAG GCT CAG CTA TCC ACT GC as: TCT TCG CTG TTT GCT GAG TG	347bp	55	45	pankreatische endokrine Vorläuferzellen
NeuroD1	s: GCT CCA GGG TTA TGA GAT CGT as: AGC TGC TCC TCT TTC TTG TCT G	186bp	60	40	pankreatische endokrine Vorläuferzellen

Tab. 8 Realtime-PCR Primer

Zielgen	Sequenz (3' - 5')	Produktgröße	Annealingtemperatur	Zyklen	Zielgewebe
GAPDH	s: CCT GCA CCA CA ACT GCT TA as: TCA TGA GCC CTT CCA CCA TG	75bp	60°	45	housekeeping-Gen
Sdf1	s: GCA CCA CGC TCT CCA TCC T as: AAT ATT GCC AGG TGA GGG TAG TG	109bp	60°	45	extraembryonales Entoderm
Sox17	s: AGA AAC TGC AGA CCA GAA GCT ATC A as: GCT CAT TGT ATC CAT GAG GTG ACA	121bp	60°	45	definitives Entoderm
NeuroD6	s: GCT CCA GGG TTA TGA GAT CGT as: CTG AGG CTC GCC CAT CAG	129bp	60°	45	Neurales Ektoderm
Pdx1	s: GTT GGG TAT AGC CGG AGA GAT G as: TTG GAG CCC AGG TTG TCT AAA	149bp	60°	45	pankreatische Vorläuferzellen
Ngn3	s: TGA CTG AC TGC TGC TCT CTA TTC T as: TCC GGG AAA AGG TTG TTG TG	113bp	60°	45	endokrine Vorläuferzellen

Tab. 9 Immunzytochemische Antikörper

primäre Antikörper	Hersteller	Ziel	Erzeuger	Konzentration	Ig
	Anti-NGN3	Millipore	Mensch Maus	Kaninchen	1 : 50
Anti-PDX1	Abcam	Mensch Maus, Ratte	Kaninchen	1 : 5000	polyklonal
sekundäre Antikörper					
Goat Anti-Rabbit IgG (Alexa 488)	Hersteller	Ziel	Erzeuger	Konzentration	Ig
	Invitrogen	Kaninchen	Ziege	1 : 200	polyklonal

9 Thesen

1. Durch Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen in 3D-Aggregaten (*embroid bodies*) wird die spontane Differenzierung in Derivate aller 3 Keimblätter gefördert.
2. Die transgene Zelllinie Sox17-DsRed ist aufgrund ihrer transgenen Modifikation zu fragil um in ausreichenden Mengen definitives Entoderm zu differenzieren.
3. Sox17-DsRed und CGR8- Zellen unterscheiden sich in der Differenzierungsgeschwindigkeit.
4. Eine Mindestglukosekonzentration von 5 mM Glukose ist zum Erhalt der kultivierten Zellen notwendig.
5. Die Wirkung von Cyclopamin und Indolaktam V wird durch geringere Glukosekonzentrationen als 17,5 mM verringert.
6. Die benötigten Glukosekonzentrationen der pankreatischen Differenzierung *in vivo* und *in vitro* können nicht miteinander verglichen werden.
7. Eine höhere Ausbeute pankreatischer Vorläuferzellen lässt sich erzielen, wenn sehr hohe Glukosekonzentrationen im Laufe der Differenzierung hinzugefügt werden.
8. Es gibt Glukose-sensible Intervalle im Laufe der pankreatischen Differenzierung *in vitro*.
9. Derivate anderer Keimblätter werden durch hohe Glukosekonzentrationen in ihrer Entwicklung gehemmt.

10 Lebenslauf

Schulbildung:

06/2005	Abitur
08/1996 – 07/2005	Domgymnasium Merseburg (Sachsen-Anhalt)
04/1996 – 07/1996	Grundschule Rosenthal in Merseburg
08/1992 – 04/1996	St. Antonius – Grundschule Geldern OT Hartefeld (NRW)

Berufliche Ausbildung:

10/2005 – 05/2012	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg (MLU)
07 – 08/2007	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01/2009 – 2012	Promotion im Institut für Anatomie und Zellbiologie an der MLU Thema: „Untersuchung des Einflusses von Nährstoffen auf die pankreatische Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen“
10/2010 – 02/2011	Forschungssemester an der MLU zur Beendigung des Laborteils der Promotion
04 – 05/2012	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2012	Approbation
09/2012 – heute	Assistenzärztin in Weiterbildung Gefäßchirurgie, Carl-von-Basedow-Klinikum Saalekreis gGmbH, Merseburg

Halle (Saale), den

Sandrina Schweyen

11 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken und Websites wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), den

Sandrina Schweyen

12 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich noch keine andere Arbeit als Promotion an dieser oder einer anderen Medizinischen Fakultät eingereicht habe.

Halle (Saale), den

Sandrina Schweyen

13 Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Dr. Bernd Fischer, für seine freundliche Unterstützung danken, mit welcher er meine Arbeit über die Jahre begleitet hat.

Frau Dr. Insa Schröder möchte ich für die Überlassung des hochinteressanten Themas und liebe Aufnahme als medizinische Doktorandin in ihre Arbeitsgruppe herzlich danken. Darüber hinaus verdanke ich ihr jede erdenkliche hilfreiche Unterstützung und viele anregende Diskussionen in allen Phasen dieser Arbeit. Ihre konstruktive Kritik und Geduld haben mir immer den benötigten Aufschwung gegeben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dipl. biol. (bald Dr.) Matthias Jung, welcher mir während der gesamten Zeit – vor allem im Bereich der Zellkultur – immer außerordentlich sachkundig, freundlich und geduldig zur Seite gestanden hat. Seine wegweisenden Ideen, Kritik und die gemeinsam konsumierten Liter Kaffee haben maßgebend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Die für mich wirklich anstrengenden – und ihn wohl recht enervierenden – Rechenstunden werde ich nie vergessen. Herzlichen Dank für seine Freundschaft und alle anderen wertvollen, unterstützenden Beiträge.

Großer Dank gebührt auch Frau Bernadette Harwardt und Frau Dr. Sabine Sulzbacher für die vielen Tipps zur Zellkultur und Handling jedweder Vorgänge im Labor. Ohne ihre geduldige und gut gelaunte Unterstützung während der Versuchsdurchführung würde ich immer noch unter einer Banche sitzen und am EB-Ansatz tröpfeln.

Danke allen Mitdoktoranden sowie allen Mitarbeiter(innen) des Instituts für die gute Zusammenarbeit. Ohne sie wäre das Arbeiten im Institut bei weitem nicht so lustig gewesen.

Ich möchte mich weiterhin bei allen bedanken, die mir im großen und kleinen unterstützend zur Seite standen: vor allem bei meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und mir auch während der Fertigung meiner Doktorarbeit immer liebevoll zur Seite standen. Ein großes Danke geht auch an meine beiden Schwestern, vor allem an Ramona – sie hat mich nicht nur unermüdlich auf der Zielgeraden zur Fertigstellung dieser Arbeit angehalten, sondern hatte auch zu jeder Tageszeit ein geduldiges, offenes Ohr und einen guten Rat bezüglich aller Formatierungen. Ohne ihren Langmut würde es dieser Arbeit definitiv an Seriösität in Form und Formulierung mangeln. Und natürlich danke an meine liebe Isabell – für die Ablenkung in schweren, trüben Stunden.

Zusammenfassend hatte ich im Rahmen dieser Promotion nicht nur die Gelegenheit, gut in die Forschung eingearbeitet zu werden, sondern auch sehr gute Freunde zu finden. Ich weiß mein Glück zu schätzen. Vielen Dank euch allen!!